MONOGRAFÍAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

BIOCATÁLISIS APLICADA A LA OBTENCIÓN DE FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO

MONOGRAFÍA XXXV

Editores: José María Sánchez Montero
Fidel Ortega Ortiz de Apodaca
Antonio Doadrio Villarejo

Madrid 2012 ISBN: 978-84-938172-7-5

INSTITUTO DE ESPAÑA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

MONOGRAFÍA XXXV:

BIOCATÁLISIS APLICADA A LA OBTENCIÓN DE FÁRMACOS Y PRODUCTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO

Coordinador: José Mª Sánchez Montero

Editores: José Mª Sánchez Montero, Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, Antonio Luis Doadrio Villarejo

ISBN: 978-84-938172-7-5

Email : edicion@ranf.com

Monografías: http://www.analesranf.com/index.php/mono/index

Real Academia Nacional de Farmacia, Farmacia 11, 28004 Madrid. Spain

Teléfonos-Phones: +34915310307-+34915223147. Fax: +34915310306

PUBLICACIÓN SUBVENCIONADA POR EL MINISTERIO DE EDUCACIÓN. GOBIERNO DE ESPAÑA

Prólogo

Fidel Ortega Ortiz de Apodaca

Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia

El uso de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una práctica habitual complementaria a los procesos industriales convencionales, introduciendo novedosas utilidades y aplicaciones, especialmente en la obtención de moléculas de alto valor añadido.

A lo largo de esta monografía, que representa la nº 35 de esta Real Academia, los lectores descubrirán un abanico de opciones y posibilidades que introduce el empelo de los biocatalizadores y que inciden de lleno en el ámbito de la biología molecular, la biotecnología y la química sostenible.

Los autores abordan de manera magistral los diferentes campos asociados haciendo especial hincapié en la síntesis selectiva de fármacos como, por ejemplo, la preparación de fármacos homoquirales de importancia fundamental en la eficacia y seguridad de numerosos medicamentos.

En el capítulo 1º el profesor Ballesteros, hace una revisión en la que se presenta una interesante secuencia de la evolución del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, abordando los diferentes temas de investigación desarrollados por él y su equipo desde el año 1969. Comenzando con las enzimas de biosíntesis de Histidina *en Escherichia coli*, consiguiendo obtener y mapear excelentes mutantes

reguladores en el operón y mapear los genes reguladores hisO, hisR, hisS y hisT. En 1973 profundizaron en la investigación con nucleasa de *Staphylococcus aureus* inmovilizada sobre soportes sólidos insolubles para su utilización en catálisis heterogénea, ensayando con soportes de agarosa y diferentes sistemas de inmovilización para aplicaciones prácticas, lo que dio origen ori a numerosas tesis doctorales, en una línea de investigación que se prolongó has el año 1991. En el año 1976, iniciaron otra línea de investigación con hidrogenasas de *C. pasterianum* y de *C. vinosum*, fruto de una estancia del profesor Ballesteros en el laboratorio del profesor Nathan Kaplan en la universidad de California. A medida que progresó la investigación utilizaron hidrogenasas de otras procedencias como el alga verde *Chlamydomonas reinhardii* o la *Bradyrhizobium japo*nicum, profundizando en el complejo sistema de la biofotolisis del agua con fines prácticos. En el año 1987 se inicia la línea de investigación del Instituto con mayor potencial industrial. El uso de las lipasas y las enzimas relacionadas. Se comienza con la presente en *C. rugosa* inmovilizada sobre Sepharosa, consiguiendo importantes avances en la desacilación de derivados de beta-D-galactopiranosa y en la acilación regioselectiva de la sacarosa y en la preparación enzimática de aditivos alimentarios. La incorporación de las nuevas tecnologías de inmovilización sol-gel en el año 1993, abrió las puertas a nuevas alternativas de atrapamiento de biocatalizadores y también al desarrollo de biosensores y de ligandos para biodiagnóstico. Dentro del IV Programa Marco de la Unión Europea se financió un proyecto europeo que les permitió investigaciones sobre enzimas cuyos sustratos fueran glúcidos, como la Ciclodextrina glucosiltransferasa (CGTasa) y la Dextran-sacarasa (DSasa) del que salieron también numerosas tesis doctorales con diferentes aplicaciones de interés, como la

obtención de oligosacáridos prebióticos como los fructoologisacáridos (FOS). En el año 2006, introdujeron una nueva línea de investigación usando enzimas diversas para la modificación química de vitaminas antioxidantes (vitaminas C y E) y de resveratrol, así como en la aplicación de nuevas herramientas moleculares aplicadas en biocatálisis, tales como la mutagenómica y la evolución molecular dirigida. El autor finaliza con unas reflexiones finales sobre los años pasados, con especial énfasis en las posibilidades que, a su juicio, tendrán mayor impacto y relevancia en el futuro. Aporta 130 citas bibliográficas de gran interés.

En el tema 2º se aborda la fermentación industrial para la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. En el capítulo, los doctores Francesco Molinari y Flavia Marinelli, introducen el tema resaltando su importancia en los últimos 5 años, con un mercado de 50 billones de dólares y resumiendo su interesante evolución histórica desde el siglo XIX, destacando que la mayoría de los antibióticos del mercado hoy en día son modificaciones semisintéticas de los productos microbianos de fermentación. Continúa detallando los procesos productivos, describiendo diferentes síntesis de medicamentos utilizando estrategias avanzadas como la mutagénesis o los programas de mejora de líneas, profundizando en las síntesis de estatinas, de antibióticos antibacterianos, reseñando en estos últimos el problema de las resistencias y los avances con nuevos medicamentos para minimizarlas, los antibióticos antitumorales y de los agentes inmunosupresores. Aporta 51 citas bibliográficas.

En el capítulo 3º, el Dr. José Manuel Guisán describe los diferentes sistemas de enzimas inmovilizados con la finalidad de conseguir su mejora funcional. En primer lugar, describe las estrategias de purificación de éstos a través de las

diferentes variantes cromatográficas y diferenciando las metodologías que se utilizan con las enzimas nativos y los de naturaleza recombinante. Relaciona las diferentes alternativas de inmovilización en función de las características de los soportes y la activación de sus grupos funcionales. Entre las mejoras que el autor refiere con los sistemas de enzimas inmovilizados, indica: Hiperactivación de lipasas, la rigidificación orientada y dirigida, la estabilización frente a codisolventes orgánicos o la reactivación de enzimas con recuperación de la actividad catalítica inicial. Aporta 23 referencias bibliográficas.

En el capítulo 4, el Dr. Josep-Vicent Sinisterra desarrolla diferentes aplicaciones del empleo de células enteras como biocatalizadores en la síntesis de moléculas de alto valor añadido. Aborda distintas reacciones de síntesis orgánica que utilizan procesos bioespecíficos como la reducción bioselectiva de fármacos homoquirales, la oxidación de alcoholes empleando las ADHs intracelulares de *Acetobacter acetii* o *Gluconobacter oxidans*, la oxidación de arenos mediante un complejo multienzimático utilizando un mutante de *Pseudomonas putida*, la hidroxilación asimétrica de alcanos y terpenos utilizando hongos como *Rhizopus nigricans* o la monohidroxilación estreoselelctiva de alquilbencenos usando células enteras de *Bacillus megaterium* inmovilizadas en alginato. Describe, también con detalle, la hidroxilación de esteroides por su interés farmacológico, pormenorizando por ejemplo, como la hidroxilación microbiana para dar derivados de cortisona, simplificó la síntesis de corticoides reduciendo el precio de la cortisona de 200 a 2 $USA/g. Especifica también, la oxidación microbiana de Baeyer-Villiger por su gran interés en la obtención de lactinas a partir de cetonas de manera regioselectiva y el uso de las haloperidasas para la halogenación selectiva de compuestos orgánicos.

Aborda la síntesis de nucleósidos utilizando células enteras debido a su potencial terapéutico como antivíricos y antitumorales, empleando la nucleósido-oxidasa de *Stenotrophomonas maltophila* o las nucleósido fosforilasas que catalizan la fosforolisis reversible de nucleósidos en su síntesis por transglicosilación. Aporta 52 citas bibliográficas.

En el capítulo 5º el Dr. José María Sánchez Montero, académico correspondiente de la RANF, describe los medios no convencionales en la ingeniería del medio de reacción. El autor, se centra en los procesos biocatalíticos utilizando medios no acuosos. Detalla en primer lugar las ventajas y los inconvenientes del uso de las enzimas en medios orgánicos, continuando con las estrategias utilizadas para trabajar con ellas en estos medios y en particular los cuatro sistemas principales: mezclas miscibles agua cosolvente orgánico en sistemas monofásicos, agua disolvente orgánico inmiscible en sistemas bifásicos, sistemas micelares reversos y medios orgánicos secos. Repasa posteriormente, los efectos del agua y la naturaleza del disolvente sobre la actividad, selectividad y estabilidad de las enzimas. Realiza una importante contribución a los métodos de modelado molecular en el estudio del efecto de los disolventes, terminando con un repaso del empleo de los líquidos iónicos y de los fluidos supercríticos en biocatálisis. Aporta 86 citas bibliográficas.

En el capítulo 6º, la Dra. María J. Hernáiz, aborda el estudio de la Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos a través del uso de enzimas hidrolíticas, cuya utilización representa el 60% de los procesos biocatalíticos. A lo largo del capítulo la autora profundiza en el empleo de las lipasas destacando su versatilidad ante sustratos tanto naturales como no naturales en diferentes condiciones

experimentales y en un amplio número de metodologías sintéticas y en particular la enantioselectiva. Hace especial hincapié en la lipasa procedente de la *Candida rugosa* para la síntesis de antiinflamatorios no esteroídicos (profenos), la lipasa de *Candida antarctica* en la síntesis del antifúngico SCH56592, 14, del antitrombótico Lotrafibran S-16 y en la de nuevos antibióticos β -lactámicos que presentan una estructura tricíclica; la lipasa de páncreas porcino en la síntesis de ariloxipropanolaminas que constituyen un extenso e importante grupo de fármacos β–bloqueantes utilizados en el tratamiento de la hipertensión y cuya actividad terapéutica sólo aparece en los enantiómeros (S), la lipasa de Serratia marescens en la síntesis de Diltiazem y la lipasa de Pseudomonas fluorescens en la síntesis del Carbovir. Profundiza, igualmente, en el empleo de las proteasas, destacando el papel de la tripsina en la síntesis de la insulina con el concurso de células de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente, la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* en la síntesis de remikiren y ciprokiren, inhibidores directos de renina. Finaliza el capítulo detallando la utilización de las enzimas Penicilin G acilasas para la síntesis de antibióticos β-lactámicos, incorporando una valiosa tabla descriptiva de los procesos de síntesis abordados. Aporta 88 citas bibliográficas.

En el capítulo 7º, el Dr. Andrés Rafael Alcántara, perteneciente al grupo de Biotransformaciones del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, continúa con el estudio de la Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos, ahora mediante el uso de enzimas redox. El autor, después de una interesante introducción donde clasifica las diferentes enzimas empleadas, aborda en primer lugar las bioxidaciones catalizadas por oxidorreductasas, particularizando el interés de la regioselectividad

de las reacciones catalizadas por deshidrogenasas, la oxidación enantioselectiva mediada por oxidasas, biotransformaciones selectivas con oxigenasas a través de la introducción específica de átomos de oxígeno en el sustrato en condiciones de reacción muy suaves, como la 6β-Monohidroxilación de la simvastatina para producir un metabolito con mayor actividad anticolesterolémica o la biotransformación de la compactina para la obtención de la pravastina. Continúa con las reducciones catalizadas por oxidorreductasas y por su interés, clasifica en 4 superfamilias las enzimas utilizadas para la biorreducción de compuestos carbonílicos, para las que se utiliza el término genérico de Carbonil Reductasas. Destaca su utilización tanto con células enteras como con enzimas aisladas en la química sostenible y el grado de estereoselectividad y productividad que cada una de las opciones conlleva, así como la necesaria utilización de cofactores y los procesos empleados para su regeneración. Detalla en una tabla de gran interés más de 50 reacciones de biorreducción empleadas a escala preparativa o industrial y clasificada según el tipo de sustrato utilizado. Finaliza, comentando algunos ejemplos interesantes como: la síntesis de del (S)-3,5-bistrifluorometilfenil etanol, un intermedio de antagonistas de receptores K-1, puesta a punto a través de la reducción asimétrica de la 3,5-bistrifluorometil acetofenona utilizando como biocatalizador una alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropoli* o la síntesis de Atazanavir, un inhibidor de la proteasa del VIH, a través de la producción un alcohol intermediario mediante la biorreducción del ácido (1S)-[3-cloro-2-oxol-(fenilmetil)propil] carbámico empleando células enteras de *R. erythropolis*. Aporta 139 citas bibliográficas.

En el capítulo 8º, el Dr Miguel Alcalde, del Departamento de Biocatálisis en el Instituto de Catálisis del CSIC en Madrid, aborda los fundamentos de evolución

molecular dirigida de enzimas *in vitro*, como una herramienta de ingeniería de proteínas para la mejora de características determinadas o para crear nuevas funciones enzimáticas no requeridas en ambientes naturales, haciendo hincapié en la evolución molecular dirigida o evolución. En este sentido, profundiza en los pasos necesarios para su desarrollo, tales como la necesaria selección del organismo hospedador para la expresión funcional de la enzima a evolucionar, los métodos de generación de diversidad para abordar el estudio del espacio de secuencia proteica, analizando la mutagénesis aleatoria, los métodos de recombinación del DNA, tanto *in vitro* como *in vivo*, y el diseño de métodos de screening o exploración para mejorar la característica enzimática marcada como objetivo evolutivo. Finaliza, describiendo las nuevas metodologías de exploración del espacio de secuencia proteica mediante estudios "semi-racionales". Aporta 99 referencias bibliográficas.

En el capítulo 9º, los doctores María-Eugenia Guazzaroni, Lucía Fernández, Nieves López-Cortés y Manuel Ferrer, pertenecientes al Instituto de Catálisis del CSIC, describen la era postgenómica para el desarrollo de nuevos biocatalizadores, analizando las diferentes estrategias para aislar nuevas enzimas y como la aplicación directa de la (meta-) genómica sobre las comunidades microbianas y sus enzimas revierte en una amplia gama de aplicaciones biomédicas, industriales y ambientales. Introducen las características del biocatalizador ideal y abordan las técnicas para el descubrimiento de nuevos biocatalizadores, haciendo particular hincapié en los métodos de tamizado clásico de microorganismos usando una colección establecida de cepas microbianas, los tamizados moleculares empleando herramientas genómicas, proteómicas y metabolómicas, acopladas con análisis bioinformáticos y computacionales, y los métodos de evolución molecular mediante

ingeniería iterativa de proteínas. Finalizan el capitulo abordando los biocatalizadores desarrollados por (meta-) genómica y proporcionan un valioso listado con aquellos con un potencial interés en biotransformaciones desarrollados por estas técnicas en los últimos años. Aportan 200 citas bibliográficas.

En el capítulo 10º y último, los doctores Andrés Rafael Alcántara y José María Sánchez Montero, desarrollan los modelos de predicción y simulación de procesos y su aplicación en el campo de la Biocatálisis, profundizando de manera detallada en los diferentes niveles de intervención de acuerdo con los modelos desarrollados en este campo y que clasifican en cuatro áreas diferentes, según su nivel de aplicación: el **Catalizador**: en el que proponen modelos que describen la catálisis a nivel molecular, posibilitando una predicción de la selectividad de la reacción, la **Reacción**: a través de modelos cinéticos que describan el mecanismo y velocidades intrínsecas, el **Reactor**: desarrollando modelos cinéticos que describan la cinética de la reacción observada en los mismos, incorporando tanto balances de materia como condiciones hidrodinámicas, y el **Proceso**: mediante modelos para el análisis de los resultados globales del mismo, incluyendo las interacciones entre las diferentes unidades y operaciones implicadas en un diagrama de flujo del proceso. Abordan los modernos métodos de modelado molecular como el “docking” que permite interpretar la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor o el análisis comparativo de las características estructurales de sustancias conocidas activas o inactivas, mediante las Relaciones Espaciales Cuantitativas Estructura Actividad (QSAR 3D), aplicándolos al reconocimiento enzima-sustrato y selectividad de la enzima, la simulación de

análogos del estado de transición y la predicción de la enantioselectividad, entre otros. Aportan 58 citas bibliográficas.

No cabe duda de que la profundidad, el enfoque y el contenido de los temas tratados en esta monografía confiere a la obra un indudable valor, no sólo por la actualidad de los mismos sino también por el rigor y la profesionalidad con que los diferentes autores los han desarrollado. Considero que la Real Academia Nacional de Farmacia se enriquece una vez más promoviendo este tipo de iniciativas. Por ello, me permito en nombre de esta Corporación agradecer a los autores el esfuerzo realizado, con la seguridad de que su trabajo se verá recompensado con la satisfacción que los lectores obtengan de su lectura.

Biografías

Miguel Alcalde



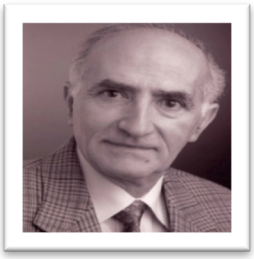
Miguel Alcalde cursó la licenciatura en Ciencias Biológicas en la UCM (1988-1993) y obtuvo el grado tras la lectura de su Tesina en 1994 bajo la supervisión de la catedrática María Eugenia Ron, en el Departamento de Fisiología Vegetal de la UCM. Posteriormente, realizó su Tesis Doctoral sobre glicosiltransferasas en el Departamento de Biocatálisis del Instituto de Catálisis del CSIC bajo la dirección del Prof. Antonio Ballesteros y el Dr. Francisco J. Plou, y se doctoró en 1999 en la UCM. Realizó una estancia postdoctoral (2001-2003) en la Chemistry and Chemical Engineering Division del California Institute of Technology (CALTECH), bajo la tutela de la Profª. Frances H. Arnold en la temática de evolución dirigida de enzimas. A su vuelta a España, montó una línea de trabajo sobre diseño de enzimas mediante evolución dirigida y enfoques semi-racionales. En su trayectoria científica ha disfrutado de becas pre-doctorales de la Fundación Caja de Madrid, del Instituto Danone y la Comunidad de Madrid y becas post-doctorales de la OTAN, el programa Fullbright, así como contratos postdoctorales I3P y Ramón y Cajal. En el 2007 obtuvo su plaza de Científico del CSIC y actualmente lidera un laboratorio en el que dirige varios proyectos nacionales y europeos en aplicaciones medioambientales y biomédicas. También participa activamente en varias redes europeas (programa COST) y nacionales sobre enzimas y sus aplicaciones. Es coautor de 80 trabajos de investigación entre los que destacan 49 publicaciones CSI y 6 patentes. Es director de varias Tesis Doctorales y trabajos de DEA.

Andrés Alcántara



El Prof. Dr. D. Andrés R. Alcántara (Córdoba, España, 1962), estudió Ciencias Químicas en la Universidad de Córdoba, licenciándose en 1985, y doctorándose en 1989, gracias al disfrute de una Beca FPI (Formación del Personal de Investigación). Realizó una estancia post-doctoral en la *University of Kent at Canterbury* (Reino Unido) en tres períodos, entre 1989 y 1991. En 1989, comenzó su carrera docente como Profesor Ayudante LRU de 1er ciclo en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, siendo posteriormente Ayudante 2º Ciclo, Profesor Titular Interino y Profesor Titular en 1993. En Abril de 2012, ha recibido de la ANECA la acreditación a Catedrático de Universidad. Como Director-Gestor del Grupo de Biotransformaciones de la Univ. Complutense, trabaja en la obtención de compuestos enantioméricamente puros, precursores de fármacos, por vía quimioenzimáticas, habiendo publicado más de 80 trabajos científicos, con 4 sexenios de investigación reconocidos por la ANECA; asimismo, tiene más de 90 comunicaciones a Congresos, y ha participado en más de 30 proyectos de investigación financiados, siendo Investigador Principal en 4 de ellos. Dentro de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT), ha sido Coordinador de la Sección de Biocatálisis Aplicada, Vocal de la Junta Directiva, Secretario Electo y desde 2008 hasta hoy día Secretario General.

Antonio Ballesteros



Antonio Ballesteros Olmo es licenciado en Química (Premio Extraordinario) por la Universidad de Sevilla, 1962. Accesit al Premio Nacional Fin de Carrera, 1963. Doctor. en Química (Premio Extraordinario) por la Universidad Complutense de Madrid (UCM), 1966. Premio Antonio de Gregorio Rocasolano, 1969. Licenciado en Farmacia por la UCM, 1972. Ha trabajado 5 años en Centros de investigación de Estados Unidos, Inglaterra, Alemania y Japón. Iniciador (1969) en el CSIC de las investigaciones en biocatálisis. Profesor de Investigación. Delegado español en la Sección Europea de Biocatálisis Aplicada (durante 1996 – 2000 fue su Presidente), perteneciente a la European Federation of Biotechnology. Miembro de la E.U. delegación al Sudeste asiático para colaboración en Industrial Enzymes. Third European Prize A-IQS in Enzyme Technology. Ha sido presidente del Comité organizador de los simposios internacionales "Stability and Stabilization of Biocatalysts (1998) y Environmental biocatalysis (2006), ambos celebrados en Córdoba. Editor de la revista *Biocatalysis and Biotransformation*; Editor ejecutivo (1996 – 2011), Editor en jefe (2011 –). Miembro del Consejo editorial de *Microbial Cell Factories* (2003 –) y de otras revistas Open. Miembro de sociedades internacionales (The Biochemical Society - London; The American Society for Microbiology; The New York Academy of Sciences) y nacionales (de Química; de Bioquímica y Biología Molecular; de Microbiología; de Biotecnología; de Catálisis). Ha investigado sobre inmovilización/estabilización de enzimas, Nucleasas, Hidrogenasas, Lipasas, Carbohidrasas/síntesis de prebióticos, Modificación química de proteínas, Modificación enzimática de azúcares y antioxidantes, Lacasas para biorremediación y Enzimas de metagenomas.

Manuel Ferrer



Manuel Ferrer es licenciado en Química por la Universidad de Granada y Doctor en Química por la Universidad Autónoma de Madrid. El Dr. Ferrer realizó su Tesis Doctoral en el Instituto de Catálisis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IC-CSIC) en el marco de una investigación relacionada con la purificación y uso de lipasas en biotecnología. Finalizada su Tesis Doctoral (1999), realizó una estancia post-doctoral (2000-2003) financiada por la Fundación Humboldt y la Unión Europea (contrato Marie Curie) en el *German Center for Biotechnology* (GBF), actualmente *Helmholtz Centre for Infection Research* (HZI), en Brauschweig (Alemania). Sus investigaciones iniciales se centraron en la aplicación de técnicas genómicas y proteómicas para identificar enzimas de interés biotecnológico, para posteriormente estudiar sistemas microbianos en su conjunto: adaptación microbiana a diferentes ecosistemas, secuenciación de genomas, métodos masivos para identificación de enzimas e ingeniería de proteínas. En 2003, el Dr. Ferrer regresa al IC-CSIC con un contrato Ramón y Cajal, obteniendo en 2006 una plaza de Científico Titular en dicho centro y promocionando a Investigador Científico en 2009. Sus investigaciones, se han centrado en el entendimiento de sistemas biológicos, tanto en sistemas sencillos como complejos que han originado contribuciones científicas y tecnológicas en el uso de enzimas en catálisis, estudios de diversidad y evolución de proteínas, estudios de adaptación de proteínas a estímulos externos, estudios de secuenciación de genomas y metagenomas y, recientemente, biología de sistemas. Ha participado y/o dirigido en los últimos cinco años en 30 proyectos de Investigación, y contribuido a más de 90 publicaciones científicas y 10 patentes, dos de ellas en explotación.

Flavia Marinelli



Flavia Marinelli es Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Roma en el campo de la Microbiología Industrial y Química de la Fermentación, Doctor en Ciencias Químicas por la Scuola Normale Superiore di Pisa, realizó su estancia postdoctoral en la Universidad de Friburgo en Alemania trabajando en la bioquímica del metabolismo secundario. En el año 1990, se unió a Lepetit Research de Marion Merrell Dow en Gerenzano, para trabajar en la genética y la fisiología de microorganismos de interés industrial (actinomicetos y hongos) que producen los antibióticos. En este centro, se convirtió en Directora de la Planta Piloto de Fermentación y de los Laboratorios de Microbiología. En el año 1996, fue una de las fundadoras y miembro del Consejo de Administración de la primera empresa italiana de Biotecnología, Italia Biotec Biosearch, (dedicada a la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos anti-infecciosos), citada en el Nasdaq en el año 2000. En diciembre de 2004 fue nombrada Profesora Asociada de Química de la Fermentación y Biotecnología en Insubria, Universidad de Varese, donde se ha instalado una Unidad de Investigación en Biotecnología Microbiana y Fermentación. Sus temas principales de investigación son: actinomicetos, resistencia y modo de acción de los antibióticos, así como cepas y la mejora de procesos para la producción de péptidos bioactivos y proteínas. Hasta ahora ha publicado 65 trabajos en revistas internacionales indexadas, es co-inventora de 4 patentes de moléculas anti-infecciosas y ha contribuido a congresos nacionales e internacionales y cursos con más de 100 comunicaciones orales, posters, seminarios y conferencias.

Francesco Molinari



Francesco Molinari es licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Milán; realizó el doctorado en Ciencias Químicas en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Milán (1988-1992) bajo la supervisión del Prof. César Gennari y el Prof. Carlo Scolastico. Durante estos años sus campos de interés han sido síntesis orgánica aplicada a problemas de reconocimiento molecular, catálisis bifuncional y formación estereoselectiva carbono-carbono. Después de haber realizado un año de post-doctorado trabajando en biotransformaciones aplicadas a la química orgánica con el profesor Fabrizio Aragozzini en la Sección de Microbiología Industrial del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Microbiología (Universidad de Milán), ha centrado su interés en el uso de nuevos enzimas microbianos procedentes de diferentes especies microbianas como catalizadores. Desde diciembre de 1992 a 2000 fue Profesor en el Departamento de Ciencia de los Alimentos y Microbiología (Universidad de Milán) y sus intereses científicos han estado relacionados con la biotecnología (estudios de los mecanismos de biotransformación, biotransformaciones microbianas de compuestos orgánicos, producción de metabolitos microbianos). Desde noviembre de 2000 es Profesor Titular de Química de la Fermentación y Biotecnología en la Universidad de Milán. También realizó una estancia post-doctoral con el profesor. Cabral en el Instituto Técnico de Lisboa, donde trabajó en bioconversiones extractivas asistidas por membranas. Actualmente está colaborando con diferentes grupos en Italia y en el extranjero, desarrollando bioconversiones selectivas y bioprocesos microbianos. Ha publicado 88 artículos en revistas internacionales indexadas, es co-inventor de 3 patentes sobre biotransformaciones industriales. Ha contribuido a congresos nacionales e internacionales y cursos con más de 70 comunicaciones orales, posters, seminarios y conferencias.

José Manuel Guisan



Jose Manuel Guisan Seijas nació en La Coruña en 1951. Estudió Ciencias Químicas en la Universidad de Santiago de Compostela y se doctoró en Bioquímica en la Universidad Autónoma de Madrid en 1979. En 1975 realizó una estancia en el Departamento De Bioquímica del St. Bartholomew´s Hospital Medical School en Londres bajo la supervisión del Prof. Blockerhurst. En 1980, se incorporó al equipo científico del Instituto de Catalisis y Petroleoquímica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Desde 2001, es Profesor de Investigación del CSIC y dirige el laboratorio de Ingeniería Enzimático. Es miembro de la Real Sociedad Española de Química, de la Sociedad Española de Catálisis y de la Sociedad Española de Biotecnología (siendo miembro de su comité ejecutivo en 2000-2001). Sus principales líneas de investigación son las siguientes: **i.- Ingenieria Enzimática;** purificación, inmovilización, estabilización, reactivación de enzimas industriales, modulación de la selectividad, etc. **ii.- Ingenieria de Biotransformaciones:** a.- Química Fina (síntesis de péptidos y antibióticos, procesos enantioselectivos y asimétricos, etc.), b.- Química de Alimentos (hidrólisis de lactosa, producción de ingredientes funcionales, etc.), c.- química analítica (enzimas, anticuerpos, sondas de ADN, etc). Es autor de 324 artículos incluidos en la ISI Web of Science que han sido citados 8.280 veces. Posee un Índice H de 45 (SCOPUS) o de 44 (ISI Web of Science). Director de la Oficina de Transferencia de Tecnología del CSIC (2001-2005); Vice-director del Instituto de Catálisis del CSIC (2006-); Vice-Gestor del área de Desarrollo Industrial del Programa CYTED (2009-); Jefe del Departamento de Biocatálisis del Instituto de Catalisis del CSIC (1995-2001); Responsable de mas de 20 proyectos nacionales e internacionales.

María José Hernáiz



La Profª. Drª. D. María J. Hernáiz Gómez-Dégano (Albacete, España, 1968), estudió Farmacia en la Universidad Complutense de Madrid, licenciándose en 1991, y doctorándose en 1996 con premio extraordinario de doctorado, gracias al disfrute de una Beca FPI (Formación del Personal de Investigación). Realizó una primera estancia post-doctoral en la *University of Warwick* (Reino Unido) durante dos años, 03/1997-3/1999. En Abril de 1999 realizó una segunda estancia Post-doctoral en la *University of Iowa* (EEUU) durante un año y medio, 04/1999-09/2000. En octubre 2000, comenzó su carrera investigadora en España con un contrato de reincorporación de Doctor. de la Comisión Europea (programa Marie Curie) en el departamento de Química Bio-orgánica del Instituto de Investigaciones Químicas del Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC), siendo posteriormente Investigador contratado por el CSIC dentro del programa I3P (11/2001-01/2002). En Febrero de 2002, comenzó su carrera docente como Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Como Director-Gestor del Grupo de Biotransformaciones de la Univ. Complutense, trabaja en la síntesis quimioenzimática de oligosacáridos y glicoconjugados de interés biuológico y su implicación en procesos de reconocimiento molecular, habiendo publicado más de 60 trabajos científicos, asimismo, tiene más de 90 comunicaciones a Congresos, y ha participado en más de 30 proyectos de investigación financiados, siendo Investigador Principal en 5 de ellos. Dentro de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT) es en la actualidad Secretario Electo desde 2010.

José María Sánchez Montero



José María Sánchez Montero es Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Córdoba (1985), donde se doctoró en 1989, gracias al disfrute de una Beca Predoctoral de la Junta de Andalucía. Realizó su estancia post-doctoral en el Centre de Technologie enzimatique de la Universite de Conpiegne (Francia) bajo la supervisión del Prof. Daniel Thomas. Actualmente es Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense y desde abril de 2012 se encuentra acreditado por la ANECA como Catedrático de Universidad. Ha impartido cursos y seminarios (grado y post-grado) en diferentes universidades nacionales e internacionales y ha sido invitado para impartir conferencias y participar en mesas redondas en diferentes instituciones. Pertenece al Grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense, y dirige un equipo multidisciplinar encaminado a la obtención de fármacos anti Alzheimer. Colabora asimismo en diferentes proyectos de nanotecnología y ***Nanobiocatalisis***, habiendo publicado más de 85 trabajos científicos, y tres patentes de invención; ha dirigido 8 Tesis doctorales, así como diferentes capítulos de libros. Ha participado en más de 30 proyectos de investigación financiados, siendo Investigador Principal en 3 de ellos. Es académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, donde ha ocupado el puesto de Director adjunto de los Servicios Informáticos. Actualmente, es Coordinador de la Sección de Biocatálisis Aplicada de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT) y coordinador del Master y Doctorado interuniversitario en Quimica Sostenible. Ha recibido diferentes premios entre los que cabe destacar el Premio de investigación Cinfa en 2006, Alcaliber y Juan Abelló en 2008 de la Real Academia Nacional de Farmacia.

José Vicente Sinisterra



El Dr. José Vicente Sinisterra nació en Madrid en 1950 y se licenció en Ciencias Químicas (Química Orgánica) en 1972 en la UCM. Se doctoró en Ciencias Químicas en 1975 en la Facultad de Químicas de la UCM. Realizó su estancia postdoctoral (1981-1982) en el laboratorio de Catálisis de *L'Ecole Polytechnique* (Toulouse, Francia) con el Prof. Gaset. Ha sido profesor invitado en el *Laboratoire de Technology Enzymatique* del CNRS - Marseille (1986-87) y en el Biology Department de la Universidad de Warwick (1996). Ha sido profesor en las Universidades de Les Illes Balears y Córdoba. Desde Febrero de 1988, es catedrático en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM. Ha fundado el grupo de investigación de calidad de la UCM y de la CAM, *Biotransformations Group.* En 2004, creó el Servicio de Biotransformaciones Industriales y apoyo a la Bioincubadora de empresas del Parque Científico de Madrid (PCM), del cual sigue siendo responsable científico en la actualidad. Asimismo, es asesor de calidad del PCM. El Dr. Sinisterra es académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Sus principales líneas de investigación en la actualidad son: i) estudio de reacciones catalizadas por células enteras; ii) biocatálisis; iii) producción quimio-enzimática de intermedios de Síntesis Orgánica con estructura homoquiral, iv) Química Verde y v) búsqueda de microorganismos activos en la producción de enzimas. Ha publicado mas de 270 artículos en revistas científicas internacionales de Biocatálisis, Biotransformaciones y Química Orgánica. Ha sido Investigador principal en 17 proyectos de investigación nacionales y dos de la UE. Ha sido conferenciante invitado en diversas universidades europeas y ha impartido cinco lecciones magistrales en congresos internacionales de Biotecnología, Biocatálisis y Química Verde.

ÍNDICE

1. Biocatálisis: un proyecto personal 19

2. Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacáutico 61

3. Purificación e inmovilización de enzimas industriales 105

4. Aplicación de las células enteras como biocatalizadores a la síntesis de productos farmacéuticos 130

5. Ingeniería del medio de reacción: medios no convencionales 155

6. Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I):enzimas hidrolíticas 194

7. Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (II):enzimas redox. 238

8. Fundamentos de evolución molecular dirigida de enzimas. 289

9. Era post-genómica para el desarrollo de nuevos Biocatalizadores. 317

10. Modelos de predicción y simulación de procesos y su aplicación en el campo de la Biocatálisis 371

Capítulo I

BIOCATÁLISIS: UN PROYECTO PERSONAL

Antonio Ballesteros Olmo

RESUMEN

Se describe la fundación del Departamento de Biocatálisis, hace 40 años. El autor, después de realizar su Tesis doctoral en catálisis química en el Instituto de Química Física Rocasolano, volvió de una larga estancia posdoctoral para iniciar esa línea de trabajo en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Los temas desarrollados desde entonces por el autor en el nuevo Instituto de Catálisis, incluyen enzimas de biosíntesis de histidina, nucleasa de *Staphylococcus aureus*, hidrogenasas, Lipasas, inmovilización sol-gel, enzimas de azúcares, modificación enzimática de antioxidantes, Metagenómica para biocatálisis y evolución molecular dirigida. Esta hoja de ruta de lo que hemos realizado en este tiempo, ha servido de ejemplo a seguir por laboratorios internacionales y nacionales para iniciarse en biotecnología industrial. Finalmente, se dan unas reflexiones sobre temas/investigaciones importantes en biocatálisis aplicada que podrían tener un gran impacto en el futuro.

Palabras clave: Biocatálisis aplicada**;** Enzimas; Metagenómica; Evolución molecular dirigida.

ABSTRACT

Biocatalysis: A personal project

The foundation of the Department of Biocatalysis forty years ago is described. The author, after obtaining his Ph.D. thesis on chemical catalysis in the Institute of Physical Chemistry Rocasolano, came back from a long postdoc

stay to initiate this new line of research in the CSIC (Spanish Research Council). The research themes developed since include Enzymes of the histidine operon, *Staphylococcus aureus* nuclease, Hydrogenases, Lipases, Sol-gel immobilization, Carbohydrate-active enzymes, Enzymatic modifications of antioxidants, Metagenomics in biocatalysis and Directed molecular evolution. This route map of ours, have been an example for other international and national laboratories to initiate research on industrial biotechnology. Lastly, the author presents his opinions on important themes/lines that could also have a great impact in the future.

Keywords: Applied Biocatalysis; Enzymes; Metagenomic; Direct Evolution.

1. INTRODUCCIÓN

El fundador de la Sección de Catálisis en el Instituto de Química Física Rocasolano CSIC (sección que más tarde se transformaría en Departamento de Catálisis, y posteriormente en Instituto de Catálisis y Petroleoquímica), Prof. Juan Francisco García de la Banda, ya en los primeros años de la década de los 60 acariciaba la idea de que junto a la continuación del estudio de los catalizadores inorgánicos -bien en fase heterogénea, bien en fase homogénea- y sus aplicaciones, abrir una nueva línea: el estudio de los catalizadores biológicos. Su razonamiento era que de esta manera, y dado que los principios fisicoquímicos de funcionamiento de cualquier catalizador eran los mismos, la investigación simultánea en ambas líneas de abordaje -aunque los materiales y técnicas eran muy diferentes-permitiría un enriquecimiento en ambas temáticas, puesto que los conocimientos adquiridos serían extrapolables de una línea de trabajo a otra.

En 1965, me encontraba realizando la Tesis doctoral en Química (sobre acidez de catalizadores de sílice/alúmina empleados en el craqueo de petróleo), al mismo tiempo que cursaba la Licenciatura en Farmacia. En esta fecha, comuniqué al Dr. García de la Banda mi disposición a desarrollar la Biocatálisis en el futuro. Esto requería realizar una larga etapa postdoctoral en

el extranjero aprendiendo sobre catálisis enzimática, para lo cual elegí el laboratorio del Prof. Christian Anfinsen, de los National Institutes of Health, Bethesda, USA -quien más tarde recibiría el Premio Nobel-. Con una beca del US Public Health Service; en 1967 comencé una estancia de 2 años muy fructíferos. Allí me familiaricé con dos temas de trabajo que después desarrollaría en profundidad a mi vuelta a España: 1) principalmente, la investigación sobre el operón de la histidina en *Salmonella typhimurium*, y 2) el estudio de la enzima nucleasa de *Staphylococcus aureus*.

2. TEMAS INVESTIGADOS

2.1. Enzimas de biosíntesis de histidina (1969-1976)

Una vez de vuelta al CSIC (Instituto Rocasolano en Madrid), decidí continuar estudiando las enzimas del operón de la histidina, pero no en *S. typhimurium* sino en *Escherichia coli*, bacteria en la que apenas había nada hecho. Para ello, llegaron los primeros colaboradores: D. Rafael Martín del Río, D. Víctor M. Fernández López y D. Alfredo Rodríguez Tébar, el segundo Dr. en Farmacia y Profesor Adjunto de la U. de Granada, para una estancia postdoctoral, y los otros dos, licenciados en Medicina, para realizar su Tesis doctoral. Fue un periodo de una intensa actividad ya que había que empezar de cero, encontrar espacio y montar el laboratorio, y al mismo tiempo, hacer una buena investigación.

Mediante diversos agentes mutagénicos, fuimos capaces de obtener unos excelentes mutantes reguladores en el operón, cuyo nivel de enzimas de la ruta de biosíntesis del aminoácido era constitutivo y 30 veces más alto que el nivel estándar del tipo silvestre (1). Además, mediante experimentos de conjugación y también de transducción -técnica ésta aprendida por el autor en el Institut für Genetik de la U. de Colonia-, se consiguió mapear los genes reguladores hisO, hisR, hisS e hisT, que resultaron estar en posiciones similares a las encontradas en el cromosoma del *S. typhimurium*. Llegamos a la conclusión (1, 2) de que el control del operón de la histidina era más complejo de lo que podría esperarse de acuerdo con el modelo de control negativo de

Jacob y Monod (en el que la histidil-tARN sintetasa estaría implicada formando el co-represor, his-tARN). Ampliando nuestros datos cinéticos sobre la primera enzima de la ruta (3, 4), y con la utilización de resonancia de espín electrónico (5, 6) -en colaboración con el Dr. Javier Soria (CSIC Madrid)-, fluorescencia (7), y microcalorimetría (8) -junto con el Dr. José Laynez (CSIC Madrid)-, encontramos que esta enzima, cuando su sitio "*feedback*" está intacto, ejerce un control positivo en la represión-desrepresión.

2.2. Nucleasa de Staphylococcus aureus (1973–1991)

Esta proteína de solo 149 aminoácidos había sido estudiada a fondo por Anfinsen. Presentaba la singularidad (y ventaja) de no poseer ningún enlace disulfuro (- S–S -), por lo que no presentaba el inconveniente de que éstos se redujesen a sulfhidrilos (- SH -) -y viceversa- en condiciones reductoras -u oxidantes- apropiadas. Precisamente trabajando con esta nucleasa, Cuatrecasas, Wilchek y Anfinsen publicaron en 1968 el descubrimiento del método de la "*affinity chromatography*". Además, Anfinsen y col. demostraron en elegantes experimentos cómo funcionaba el mecanismo catalítico en esta endonucleasa. Y un "*tour de force*" del laboratorio fue la demostración de que si se sintetizaban por síntesis orgánica clásica varios fragmentos polipeptídicos de nucleasa, y luego se ponían en contacto en solución apropiada, se podía reconstituir la actividad enzimática propia de la enzima.

Pues bien, con esta enzima nativa, tan conocida en fase soluble, empezamos en el grupo de biocatálisis del CSIC a investigar, después de fijar la proteína a soportes insolubles adecuados; de esta manera pasábamos de la catálisis homogénea de Anfinsen a la catálisis heterogénea (en la que la entidad enzima/soporte se encontraba en la fase sólida, y los demás componentes de la reacción, en fase líquida). La primera Conferencia de Ingeniería Enzimática (Enzyme Engineering I,1971, USA) definió a las enzimas inmovilizadas como "enzimas que están físicamente confinadas o localizadas en una cierta región del espacio, con retención de su actividad catalítica y que pueden ser usadas de forma repetida y continua". En los primeros experimentos, elegí como posibles soportes el vidrio de poro controlado -muy popular por entonces-, y además también uno de los componentes del agar (la

agarosa, que sería el que mejor resultado nos daría como soporte para inmovilizar por enlace covalente la nucleasa). Una característica importante de la agarosa como soporte, es la gran cantidad de grupos hidroxilo que presenta, los cuales son fácilmente activables para posteriormente poder reaccionar químicamente con los grupos R de la cadena polipeptídica. Otra característica de los geles de agarosa es que se pueden utilizar en reactores enzimáticos agitados formados por cubetas (2 x 2 cm) del espectrofotómetro y no producen interferencias notables en el paso de la luz -muy al contrario del caso del vidrio poroso-. Los primeros experimentos los realizó D. Jose M. Guisán; años más tarde llegaría D. Joaquín Serrano. Ambos realizarían con estas investigaciones sus Tesis doctorales (1979 y 1981).

En nuestros trabajos, utilizamos una agarosa entrecruzada y así estabilizada, comercialmente disponible ("Sepharose") de la casa Pharmacia, comprada ya activada con CNBr. En primer lugar, se prepararon derivados insolubilizados de nucleasa/Sepharose (9), en los que la enzima estaba enlazada covalentemente por sus grupos amino. En segundo lugar, se estudiaron las propiedades cinéticas del mejor derivado obtenido, utilizando un sustrato pequeño, una timidina sintética, para así minimizar los posibles efectos negativos de la difusión del sustrato en los poros (10). En tercer lugar, se estudió en qué casos la difusión de sustratos o productos era el paso controlante de la catálisis y en cuáles no (11). A continuación, se compararon los resultados con los obtenidos con un sustrato natural de la enzima, un ADN de gran tamaño molecular (12). Los resultados obtenidos, señalaban la posibilidad de que la enzima estuviese distribuida en la partícula del soporte, bien de forma uniforme a lo largo de toda la partícula, bien que estuviese principalmente repartida en la parte más externa, a modo de cáscara ("*shell*"); en este último caso, la enzima inmovilizada presentaba una eficiencia catalítica (kcat/Km) mucho mayor. Además de comprar agarosa ya activada con bromocianógeno, pusimos a punto en el laboratorio este método de activación -método en el que hay que tomar muchas precauciones para que no se forme cianuro de hidrógeno, altamente tóxico-, lo que nos permitió después conseguir un intervalo muy grande (hasta 40 veces) en la activación del soporte (13).

Posteriormente, se hizo una caracterización textural a fondo (diámetro de poro, área de poros) de las agarosas activadas preparadas. J. Kohn and M. Wilchek (Weizmann Institute) habían reportado cuáles eran las especies activas en la reacción de activación con CNBr: cianatos e imidocarbonatos, lo que nos fue de una gran utilidad para medir el número de grupos activos por unidad de volumen de gel.

Al mezclar la disolución de enzima y la suspensión del soporte, según sean las concentraciones y cantidades relativas que utilicemos, el tiempo, la temperatura, se obtienen derivados con la enzima uniformemente distribuida, o con la enzima no uniformemente ligada (p.e., en shell) (14); en uno u otro caso se pudieron obtener las ecuaciones teóricas que siguen los modelos planteados. Nuestros datos (15), nos llevaron claramente a la hipótesis de que la enzima en los casos en que el soporte estaba muy activado, estaría unida al soporte por múltiples enlaces covalentes. En una detallada caracterización fisicoquímica de los derivados (por espectroscopia UV-Vis, estudios cinéticos, equilibrio enzima inmovilizado/inhibidor, titulación con un inhibidor especifico del centro activo, y midiendo el nº de grupos aminos libres antes y después de la insolubilización), se concluyó que existían 4–5 enlaces covalentes entre soporte y enzima (16). Este multienlace hizo que los derivados preparados fueran 700 veces más estables a la temperatura, comparados con el derivado unido por un solo enlace (13).

Allá por 1983 los Profs. José Mª Marinas y José V. Sinisterra, del Departamento de Química Orgánica de la U. de Córdoba, decidieron ampliar sus investigaciones previas en catálisis heterogénea al estudio de los catalizadores biológicos, para lo que contactaron con el autor. Como tema de trabajo elegí la inmovilización de esta (y otras) nucleasa(s) -como RNasa A, fosfodiesterasa de bazo o benzonasa- por otros métodos, proyecto dentro del cual D. José Mª Sánchez-Montero y D. Andrés R. Alcántara realizaron sus Tesis doctorales (1989 y 1989). El objetivo de preparar estos nuevos biocatalizadores inmovilizados era su aplicación a la hidrólisis de los ácidos nucleicos presentes en concentrados de proteínas provenientes de organismos unicelulares (“*single cell proteins*”) antes de poder usarse para alimentación

humana: los nucleótidos originados en la hidrólisis no precipitan con las proteínas, por lo que pueden ser fácilmente eliminados (de no eliminarse, al ser ingeridos ocasionarían enfermedades del tipo de la gota, ya que precipitaría ácido úrico en las articulaciones).

Se investigaron dos soportes muy diversos (agarosa o partículas procedentes del corazón de la mazorca de maíz una vez quitados los granos). Se utilizaron/mejoraron nuevos métodos de activación de agarosa y de zuro (17, 18). El comportamiento (actividad, estabilidad) de las nucleasas nativas o inmovilizadas en medios agua-disolventes orgánicos miscibles fue objeto de detalladas investigaciones, en las que incluso se aplicaron las técnicas de dispersión óptica rotatoria y de espectrometría diferencial después de choque térmico (19-21). Sendas muestras inmovilizadas de RNasa A y de endonucleasa se emplearon -de forma secuencial y en un reactor agitado provisto de una cesta que separaba la enzima inmovilizada- para reducir la concentración de ácidos nucleicos en muestras de extractos de levaduras. El funcionamiento fue excelente ya que el porcentaje de ácidos nucleicos (ARN + ADN) se redujo desde 5-15% -según la muestra- hasta el 0,5%, sin pérdida de proteína (22).

2.3. Biofotolísis del agua: hidrogenasas desde 1976

La guerra árabe-israelí de 1973 hizo subir casi 4 veces el precio del petróleo, lo que disparó todas las alarmas para empezar a investigar otras alternativas energéticas renovables, entre ellas la fotólisis del agua para producir hidrógeno, la cual se puede conseguir tanto con catalizadores inorgánicos como mediante biocatalizadores acoplados a sistemas fotosintéticos (BioH_2). Las hidrogenasas son enzimas que catalizan la reacción más simple conocida, la combinación -reversible- de dos protones y dos electrones para dar H_2. Las hidrogenasas, son un tipo de enzimas ampliamente distribuidas en bacterias y algas. Todas las hidrogenasas caracterizadas tienen agrupamientos (“clusters”) hierro-azufre y muchas contienen níquel. Las mejor estudiadas pertenecen a dos tipos de microorganismos: i) Las hidrogenasas de bacterias anaerobias tienen diferente sensibilidad al oxígeno y que

generalmente contienen tres {4Fe-4S} clusters. En este grupo, la mejor conocida es la hidrogenasa bidireccional de *C. pasterianum*, muy sensible a la inactivación por oxígeno -en 4 minutos al aire pierde el 50% de su actividad-. ii) Las hidrogenasas de bacterias fotosintéticas son muy termoestables y relativamente insensibles a la inactivación por oxígeno. Tienen un solo cluster 4Fe-4S. La más estudiada ha sido la de *C. vinosum*.

Los Profs. Nathan Kaplan y M.D. Kamen, de la U. de California San Diego (UCSD), demostraron entonces que se podían acoplar cloroplastos de espinaca a una hidrogenasa en presencia de un mediador de electrones expuesto el sistema a la luz, daba lugar a la evolución de hidrógeno (23). Ellos estaban estudiando las hidrogenasas de *Clostridium pasterianum* y de *Chromatium vinosum*. Durante una estancia sabática en UCSD con el Dr. Kaplan en 1975-1976, me familiaricé con este tema emergente, aprendí a trabajar con el manejo y purificación de hidrogenasas lábiles al oxígeno, tema éste de las hidrogenasas que a mi regreso empecé a poner a punto en mi grupo de biocatálisis.

Ya en Madrid, decidí empezar a estudiar las hidrogenasas de *C. pasterianum* y de *C. vinosum*. Para el manejo y la purificación de la primera, diseñamos un complicado aparato de purificación en anaerobiosis, idóneo también para cualquier proteína o sustancia lábil al oxigeno (24), el cual nos fue muy útil para progresar en nuestras investigaciones futuras. El método estándar de medida de actividad implica la extracción de electrones de un mediador (metil-viológeno) previamente reducido -usualmente por ditionito sódico (hidrosulfito sódico) -, para formar hidrógeno. Los primeros datos que obtuvimos fueron sobre la influencia del potencial redox en la actividad de ambas hidrogenasas; concluimos que en *C. pasterianum* implicaba dos pasos de un electrón, mientras que en *C. vinosum* era un proceso reductivo de dos electrones (25). Otras contribuciones consistieron en métodos alternativos al ditionito para la reducción del metil-viológeno, empleando zinc, alojado todo en un dispositivo anaerobio; como conclusión, el zinc es de elección a pH ≤ 7, mientras que el ditionito debe utilizarse sólo a valores de pH superiores (26). D. Roberto Munilla (quien leyó su Tesis doctoral en 1986), el Dr. Carlos

Montuenga y la Prof. Maria Fatima Morais (U. de Lisboa) trabajaron en estos temas.

Durante un año sabático del Dr. Vicente Torres Pascual (INIA Madrid) y con la ayuda también del Dr. Manuel Núñez (INIA), fuimos capaces de demostrar que algunos cereales -cebada axénica- en condiciones de estrés anaerobio inducían una hidrogenasa (27, 28), lo que iba en contra de lo admitido en la literatura: que los organismos superiores no tenían hidrogenasa. Asimismo, en una colaboración con el Dr. Pedro J. Aparicio (CIB-CSIC) se demostró la influencia de la intensidad de la luz y de la presencia de fuentes de nitrógeno oxidado -nitratos o nitritos- en la producción de hidrógeno por el alga verde *Chlamydomonas reinhardii* (29).

En colaboración con el Prof. T. Ruiz Argüeso (U. Politécnica de Madrid), se llevó a cabo un proyecto de investigación ambicioso con la *Bradyrhizobium japonicum*, tanto en los bacteroides de nódulos de leguminosas (soja) como en células libres. Esta hidrogenasa, funciona fundamentalmente como recuperadora del H_2 que se pierde a la atmósfera cuando la nitrogenasa fija N_2, siendo máxima la actividad a pH 8; también pudimos demostrar su actividad de formación de H_2, cuya producción máxima se daba a pH 4 (30). Nuestra contribución al mecanismo de evolución de hidrógeno por esta hidrogenasa activante de H_2 demostró claramente que en el centro activo de la enzima falta la base B, lo que explica el por qué la producción de H_2 se hace muy lenta a pH neutro o ligeramente alcalino (31). En todas estas investigaciones participaron la Dra. Mirta Barate y Dª Presentación Reyes Lorite (quien leyó su Tesis doctoral en 1990).

En paralelo, intentamos poner a punto el sistema acoplado para producir hidrógeno (constituido por cloroplastos de espinaca + metil-viológeno + hidrogenasa). Los pobres resultados obtenidos, nos indicaron que todavía este sistema necesitaba mucha investigación básica para resolver el problema de la inactivación de hidrogenasas por O_2. Por lo que entonces nuestros esfuerzos se dirigieron a profundizar en el estudio de las hidrogenasas, tema que ha avanzado enormemente en los últimos años, y en el que todavía se sigue

investigándose en nuestro Departamento bajo la dirección del Prof. Víctor M. Fernández. Precisamente ahora es cuando está de moda en todo el mundo la investigación sobre energía biorrenovable, incluida la biofotólisis del agua.

2.4. Lipasas (y enzimas relacionadas) desde 1987

En la hoja de ruta del autor para desarrollar la biocatálisis en el CSIC figuraba ir cambiando a temas cada vez más aplicados en la industria. Después de una larga y meditada búsqueda, y de conversaciones con expertos, vi claro que las lipasas tenían un gran potencial para la industria, pero que apenas estaban siendo estudiadas en los laboratorios de empresas punteras. Tampoco eran investigadas en laboratorios universitarios o de organismos de investigación, ya que era de todos conocido -sobre todo por las excelentes investigaciones sobre lipasas por el grupo de P. Desnuelles, en Francia (Marsella)- que eran unos sistemas complejos, cuya reproducibilidad era muy baja; lógico, si se tiene en cuenta que por actuar las lipasas sobre sustratos insolubles en agua, para poder actuar la enzima sobre el lípido, éste debía estar en la interfase lípido/agua. Al principio de los años 80 los *papers*/patentes publicados provenían principalmente de algunas universidades en Japón (que empezaban a estudiar lipasas insolubilizadas en soportes) y de la industria europea (principalmente Unilever en Inglaterra, y también Novozymes en Dinamarca). Otro factor importante que influyó en mi decisión fue el que España era el primer productor mundial de aceite de oliva, y el enorme exceso de grasas y aceites de la Unión Europea.

Una vez tomada la decisión, era fundamental hacerse con una excelente colección de los –no muchos- trabajos sobre el tema que ya había en la bibliografía. El Dr. Alasdair Macrae (Unilever UK) fue de gran ayuda en los primeros momentos para poner a punto los métodos más usuales en la investigación sobre lipasas, lo que se completó con una visita a su laboratorio. Otro punto a favor era que algunas lipasas eran asequibles comercialmente, y además a bajo precio. Desde el punto de vista de la hidrólisis de grasas neutras (triglicéridos) las lipasas han sido clasificadas en: inespecíficas, 1,3-específicas, y ácido-graso-específicas. La Dra. Cristina Otero comenzó la experimentación con la lipasa de *Candida cylindracea* (después catalogada

como *C. rugosa*), que -a través de sus grupos amino- fue inmovilizada sobre Sepharosa 6B previamente activada por nosotros -por reacción con glicidol-, en condiciones en que se conseguía un soporte muy activado, lo cual redundaba en una enzima unida covalentemente por múltiples puntos a la matriz sólida (32-34). Los derivados obtenidos, mostraron una mayor resistencia a la inactivación comparados con la enzima soluble -eran 140 veces más estables-; asimismo, fueron mucho más resistentes al efecto desnaturalizador de disolventes orgánicos polares cuyo log P -definido como el coeficiente de partición entre 1-octanol y agua- difería (acetonitrilo, dioxano, alcoholes alifáticos). Estos datos, coincidían con lo reportado en la literatura; ya en 1982 A. Klibanov (Massachusetts Institute of Technology) en una revisión comentaba que la unión covalente enzima-soporte por multipuntos era un buen método para conseguir enzimas inmovilizados más estables. Por este tiempo, se incorporó a nuestro grupo el Dr. Eitel Pastor, experto en análisis cromatográficos.

Con nuestras lipasas, comenzamos una colaboración con los Drs. M. Martín-Lomas y M. Bernabé (CSIC Madrid), expertos en carbohidratos y RMN. Así, aplicando lipasas solubles e inmovilizadas, conseguimos una excelente desacilación de derivados de beta-D-galactopiranosa (35) y resultados muy prometedores en la acilación regioselectiva de la sacarosa (36). Igualmente, y a consecuencia de una estancia del autor en el Dept. of Chemistry, U. of Canterbury (Prof. R. Freedman), colaboramos con el Dr. C. Oldfield sobre el tema de catálisis micelar (37). Otero et al. (38) consiguieron demostrar que el empleo de ciclodextrinas para solubilizar sustratos de lipasas conducía a incrementar la solubilidad del sustrato y la estabilidad de la enzima y a los mismos valores en los parámetros cinéticos determinados.

La Tesis doctoral de Dª Maria Luisa Rúa (1991) versó sobre la purificación, caracterización molecular y propiedades catalíticas en fase acuosa y en microemulsiones w/o -water in oil- de la lipasa de *Candida rugosa*. Después de que el grupo de L. Alberghina (U. di Milano) encontrase la presencia de varios genes con actividad lipasa, fuimos los primeros que

purificamos dos isoenzimas (A y B) de esta lipasa, y las caracterizamos desde el punto de vista de su composición de glúcidos y su actividad catalítica (39). Estas isoformas han sido después estudiadas muy exhaustivamente en todo el mundo (previamente habíamos solicitado una patente).

Posteriormente –y coincidiendo con el traslado del Instituto desde el campus de Serrano al de la U. Autónoma de Madrid en Cantoblanco- empezamos una línea sobre la preparación enzimática de aditivos alimentarios. Los mono y diglicéridos de ácidos grasos están clasificados en el grupo 4 de aditivos alimentarios (agentes emulsificantes, estabilizantes, espesantes y gelificantes), con el código E471 en la nomenclatura internacional. Dado que según Brown (40) los restos de ácido graso C12:0, C14:0 y C16:0 aumentan el colesterol en humanos y no así el C18:0 (acido esteárico) -porque un sistema enzimático tipo desaturasa lo convierte en ácido oleico (C18:1)-, nuestras investigaciones se dirigieron a preparar glicéridos de restos cortos –e.g. de ácido butírico(C4:0)- y también los correspondientes con restos C18. Para obtener la mezcla E471, se puede hidrolizar el triglicérido, o bien sintetizar mono + di esteres partiendo de glicerina y un donador de acilo. Así, estudiamos la influencia del soporte en el curso de la reacción de hidrólisis de tributirina por lipasas solubles e inmovilizadas (41), en las que los soportes se eligieron por su distinta acuafilia: el mejor resultado -p.e., 90% de monobutirina- se obtuvo con lipasa de *C. rugosa* inmovilizada sobre tierra de diatomeas (Celita), el soporte menos acuafílico. Similarmente, la preparación de E471 fue abordada desde la síntesis, utilizando lipasas solubles inmovilizadas y químicamente modificadas. En todos los casos, la reacción entre glicerol y butirato de etilo condujo a la formación del monobutirato (42). Los mejores resultados se obtuvieron con las siguientes lipasas: *C. rugosa* soluble, *Mucor miehei* inmovilizada en una resina fenol-formaldehido (Lipozyme IM), y *C. rugosa* inmovilizada sobre Celita.

Pasando a la preparación de mono y diglicéridos de ácido oleico, en el planteamiento a través de una síntesis, la mejor lipasa resultó ser Novozym 435 (lipasa B de *Candida antarctica* insolubilizada sobre una resina acrílica macroporosa) (43). En todas condiciones, la transesterificación con oleato de

etilo resultó muy superior a la esterificación de glicerina con ácido oleico. La reacción en heptano para obtener mono y dioleína dio los mayores rendimientos cuando la adición de agua era del 3%; en todos los casos, las cantidades de mono y diglicérido formadas eran similares. Sin embargo, cuando la reacción se hizo en una sola fase (adicionando 3% de acetonitrilo o acetona), la reacción era mucho más selectiva a monooleína. En el planteamiento a través de hidrólisis, lipasas de diversos orígenes -en forma soluble o inmovilizada en soportes de diversa acuafilia- fueron utilizadas para preparar E471 hidrolizando trioleína emulsionada (44). La lipasa pancreática porcina adsorbida sobre Celita resultó ser el mejor biocatalizador, dando un 80% de rendimiento a monooleína + dioleína. Los datos fueron ajustados a un mecanismo secuencial de hidrólisis, las diferencias en constantes catalíticas siendo debidas a la regioselectividad de la enzima y/o la acuafilia de cada soporte. En el caso de la preparación de mono y diestearina por glicerólisis del estearato de etilo y por esterificación directa de glicerol con Novozyme 435 (45); los resultados fueron en el mismo sentido que en el caso de mono y dioleína.

En la Tesis doctoral de D. Manuel Ferrer Martínez (1999) se estudió la utilización de lipasas comerciales y aisladas de hongos filamentosos para la síntesis de esteres carboxílicos de di- y oligosacáridos. Se trataba de preparar esteres (puros) de sacarosa, pero también de maltosa, maltotriosa, alquilmaltósidos, etc. y calibrar/medir sus propiedades tensioactivas. Además de emplear las lipasas comerciales disponibles, estudiamos otras fuentes de ellas: a partir del cultivo de hongos filamentosos, y a partir de residuos industriales procedentes de caldos de fermentación originados en la producción de antibióticos (a través de nuestra colaboración con la Dra. Fuensanta Reyes, CIB, CSIC Madrid). Describimos entonces un nuevo método para detectar actividad lipolítica en placa Petri, basado en Tween 80 como sustrato de lipasas/esterasas (46), proyecto en el que participó el Dr. Oscar Nuero. Así, a partir de unos caldos industriales empleados en la síntesis de acido penicilánico, se aisló y caracterizó una lipasa de *Penicillium chrysogenum* (47)

Por lo que respecta a la síntesis de esteres de sacarosa y de otros di- y oligosacáridos, estas investigaciones fueron realizadas dentro de sendos proyectos europeos en las que también participaron grupos académicos de Francia, Grecia y Reino Unido, y dos empresas (de Dinamarca -Novozymes- y de Francia –Prabil-). Pronto se comprobó que la disolución de la sacarosa en la mezcla de reacción era un paso muy lento que podría ser el limitante de la reacción global catalizada (48). Nuestro laboratorio, encontró un método de síntesis (49, 50) muy superior a todos los que había en la literatura hasta la fecha -y que todavía no ha sido mejorado-, mediante transesterificación con esteres de vinilo, basado en el empleo de mezclas de alcohol tert-amílico y dimetilsulfóxido; además, se realizó un estudio comparativo del soporte/método de inmovilización de la misma lipasa en la producción de los esteres de sacarosa (51) Estos estudios se ampliaron -coincidiendo con la llegada de la Dra. M. Angeles Cruces- a otros di y oligosacáridos -maltosa, leucrosa, maltotriosa y n-dodecil-maltósido- (52, 53). Todos estos compuestos son muy interesantes por sus propiedades tensioactivas, antitumorales y anticaries, las cuales se determinaron –respectivamente- en colaboración con los Drs. José L. Parra y F. Comelles (CSIC Barcelona) (54), con el Prof. José V. Castell (U. de Valencia) (55), y con el Prof. Mooser (U. of Southern California) (56). Un hallazgo interesante fue que demostramos que la catálisis química por el sólido empleado como soporte también daba reacción (57) y podía así haber falseado algunos datos de la literatura que se atribuían únicamente al poder catalítico del enzima. A estas investigaciones se incorporó (2002-2005) la Dra. D. Reyes-Duarte (México) (58). Finalmente, las propiedades antimicrobianas de los esteres de carbohidratos se estudiaron en colaboración con los Profs. José L. Copa y Juan Soliveri (U. de Alcalá) (59).

La Tesis doctoral (2002) de Dª Gloria Fuentes versó sobre lipasas y otras proteasas, utilizando principalmente herramientas bioinformáticas. Sus resultados demostraron el importante papel de los efectos entrópicos en los mecanismos de reacción (60- 62).

En nuestras insolubilizaciones de enzimas hemos trabajado con muchos soportes, entre los que sobresalen los soportes acrílicos activados con grupos

epóxido (p.e. Eupergit C, Sepabeads, Dilbeads). En su detallada caracterización física nos ayudaron la Profª. M. L. Rojas-Cervantes (UNED) y el Dr. M. Yates (CSIC) (Figura 1.1).

Los soportes Dilbeads fueron los mejores para inmovilizar la esterol esterasa de *Ophiotoma piceae* y aplicarla después en el procesado de madera de eucalipto por disminución del residuo resinoso –"pitch"- (trabajos en colaboración con los Drs. Angel T. Martínez y M. Jesús Martínez (CIB-CSIC)). Para visualizar la distribución del enzima dentro de las esferillas Dilbeads, se usó –después de marcar (en verde) la posición de las moléculas de enzima con isotiocianato de fluoresceína- la microscopia confocal (Figura 1.2).

En un proyecto cooperativo con el Prof. P. T. Vasudevan (U. of New Hampshire, USA) -quien disfrutó de un sabático en nuestro laboratorio- caracterizamos un interesante soporte hidrofílico para inmovilizar enzimas, CoFoam, basado en poliuretano (63).

Modificación química de hidrolasas

Durante mi estancia sabática en la U. de Chicago (con el Prof. E. T. Kaiser), conseguimos modificar la papaína con un derivado de flavina, y así transformar una hidrolasa en una oxidorreductasa (64). Siguiendo este abordaje, y dentro de mi filosofía (hoja de ruta) de preparar en nuestro laboratorio los mejores biocatalizadores -más activos, estables, selectivos, y/o con nuevas actividades-, realizaron su Tesis doctorales D. Francisco J. Plou Gasca (sobre subtilisina, 1993) y Dª Mª Visitación Calvo (lipasas, 1997). La subtilisina se modificó -tal como ocurre *in vivo*- con residuos de ácidos grasos (65); la octanoil- y palmitoil-subtilisina resultaron ser las enzimas más promiscuas (actividad con muchos sustratos distintos) y mucho más estables. El Dr. F.J. Plou realizó su estancia postdoctoral en la Universidad de Londres (con el Prof. K. Brocklehurst), donde estudió con técnicas muy sofisticadas el mecanismo de acción de la subtilisina y otras hidrolasas, lo que fue muy importante para poder continuar en el laboratorio con este tipo de estudios durante muchos años; allí colaboró con el Dr. Chandra Verma, de la University of York, experto en bioinformática.

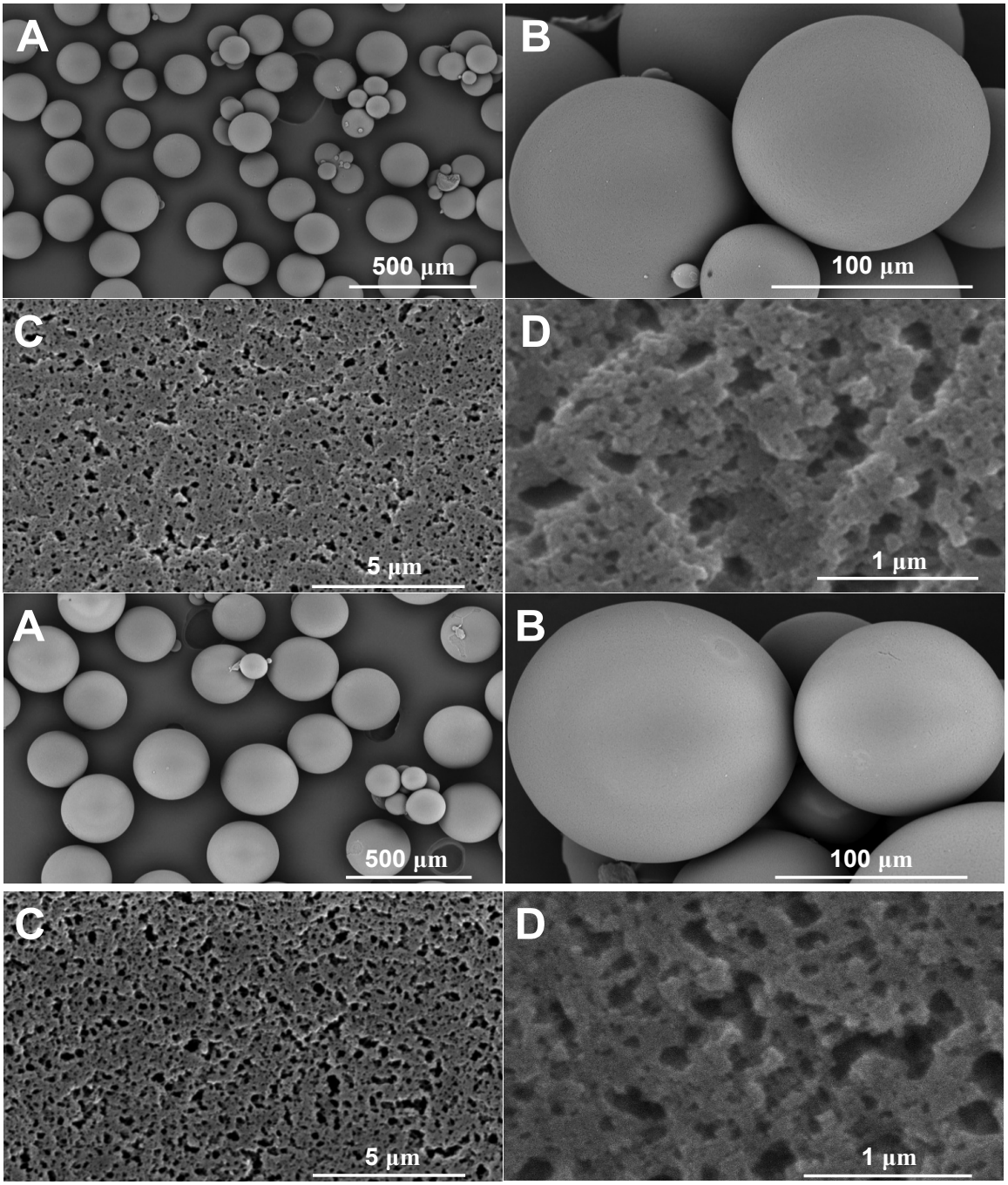


Figura 1.1.- Fotografías de microscopia electrónica de barrido de Dilbeads: EZ tiene menor área especifica y menor volumen de poro que TA (P. Torres Salas, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 2009).

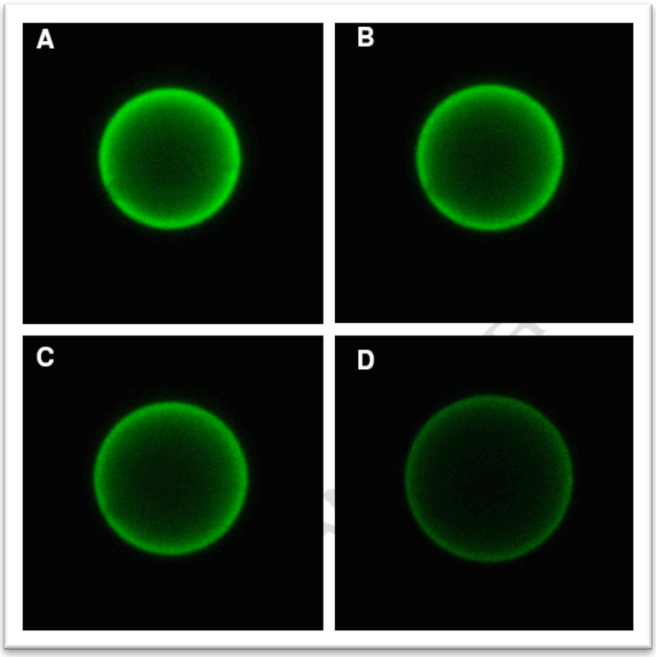


Figura 1.2- Las imágenes fueron obtenidas en secciones de 5 µm a lo largo de un diámetro (100 µm) (P. Torres Salas, Tesis doctoral).

Por otra parte, las lipasas A y B de *C. rugosa* fueron modificadas con residuos C8:0 y con polietilenglicol –el cual confiere a la proteína modificada o "PEGilated" una mayor resistencia a destrucción por proteasas- (66, 67); la actividad de síntesis, su estabilidad a valores de pH alcalinos y su resistencia a surfactantes resultó aumentada de manera significativa. Asimismo, un estudio cinético detallado de estas isoformas actuando en micelas fue realizado en colaboración con los Profs. Javier Burguillo y Manuel G. Roig (U. de Salamanca) (68). Dentro de esta línea y procurando siempre diseñar y obtener en el laboratorio los mejores biocatalizadores, conseguimos obtener (investigaciones del Dr. O. Nuero) -mediante modificación química de un enzima nativo- una enzima semisintética novedosa (69): una ribonucleasa que se convirtió en glicoenzima por reacción con azúcares reductores, la enzima artificial resultó ser mucho más estable a la temperatura que la enzima nativa.

2.5. Metodologia de inmovilizacion sol-gel (1993–2001)

Con la incorporación del Dr. Iqbal Gill (Institute of Food Research, Reading, UK) al grupo, se desarrolló un nuevo tema, la encapsulación de enzimas (y otras moléculas lábiles) en matrices robustas a base de poliol-silicatos y poliol-siloxanos -especialmente matrices basadas en glicerol-, siguiendo un protocolo de condiciones de reacción suaves (70). Los vidrios y cerámicas obtenidos eran de mejores prestaciones que los previamente obtenidos por otras metodologías alternativas, lo que abría la puerta para el atrapamiento de biocatalizadores (71), pero también de biosensores y de ligandos para biodiagnóstico. En esta línea, los biocomposites lipasa-silicona preparados (72) resultaron ser unos biocatalizadores inmovilizados muy eficientes y versátiles; demostraron hiperactividad, y poseían altas densidades de Unidades catalíticas por gramo, y alta actividad en operación, así como estabilidad tanto en medios acuosos como orgánicos. Utilizando la enzima organofósforo-hidrolasa, los materiales obtenidos se ensayaron para la degradación de agentes neurotóxicos fosforados, resultando materiales biocatalíticos eficientes en la protección personal y en la destoxificación a gran escala (73). Usando metodología similar se prepararon inmunoglobulina-polidiacetileno sol-gel nanocomposites, los cuales demostraron ser unos excelentes estado-sólido nanosensores cromáticos, buenos candidatos para plataformas de "*microarrays*" (74). Como consecuencia de estas investigaciones, se publicaron sendas y largas revisiones en *Trends in Biotechnology* sobre bioencapsulación dentro de polímeros sintéticos, tanto referentes a encapsulación sol-gel (75) como a no-sol-gel biocomposites proteína-polímero (76).

2.6. Enzimas que actúan sobre carbohidratos (desde 1994)

La Unión Europea dentro del IV Programa Marco empezó a financiar investigaciones sobre enzimas cuyos sustratos fueran glúcidos. En colaboración con 8 equipos europeos (2 empresas, 6 Universidades) de 6 países, conseguimos un proyecto excelentemente financiado para 1994 a 1996. Se trataba de estudiar dos enzimas inéditos hasta la fecha en nuestro laboratorio: Ciclodextrina glucosiltransferasa (CGTasa) y Dextran-sacarasa

(DSasa) -ésta era de *Leuconostoc mesenteroides* y suministrada dentro de una colaboración con el Prof. Pierre Monsan (INSA Toulouse)-. La puesta a punto de los nuevos métodos y los primeros resultados constituyeron la Tesis doctoral de D. Miguel Alcalde Galeote (1999). Los primeros estudios consistieron en la modificación química de la CGTasa (para lo cual contamos con la colaboración del Dr. Enrique Méndez (CNB, CSIC Madrid)) y su efecto en su actividad normal -formación de ciclodextrinas-, estabilidad y selectividad a productos (77-80). Después, Dª M. Teresa Martín trabajó (Tesis doctoral 2001) en su inmovilización en sílice y en Sepharosa (81), y sobre Eupergit C (82). Además, las investigaciones continuaron con la síntesis de maltooligosacáridos con CGTasa (83), en condiciones no naturales de reacción --introduciendo un aceptor en la reacción, de manera que la formación de ciclodextrinas estaba totalmente inhibida-. En estos y otros temas relacionados trabajó con nosotros durante 3 años el Dr. H. García-Arellano (México).

En el caso de la DSasa cepa 512 -que forma dextranos con enlaces alfa-D-1→6 y alfa-D-1→3, se estudió la estabilidad de la enzima atrapada en esferillas de alginato cálcico, en presencia de diversos disolventes orgánicos, consiguiéndose la máxima estabilización en dimetilsulfóxido (84).

Posteriormente, se investigó la inmovilización -por enlace covalente en sílice y por atrapamiento en alginato- de dextransacarasa nativa y libre-de-dextrano, para la síntesis de glucooligosacáridos (85). Asimismo, la inmovilización en LentiKats -hidrogeles de polivinilalcohol, desarrollados por W.A. Ding y K.D. Vorlop en 1993, resultó ser un método superior al usual de atrapamiento en alginato en la reacción de aceptor con metil-alfa-D-glucopiranósido, probablemente debido a la disminución de las limitaciones difusionales (86, 87). Posteriormente, la DSasa -previamente tratada con dextranasa para eliminar el dextrano ligado- fue insolubilizada sobre soportes Eupergit C (polímero acrílico epoxi-activado) que poseían muy distintas propiedades texturales (88); los derivados obtenidos resultaron ser muy adecuados para reactores en batch y de lecho fijo. En un estudio posterior, se sintetizaron metil-alfa-D-glucooligosacáridos con DSasa *L. mesenteroides*

cepa 1299 (atrapada en alginato; esta cepa forma dextranos que tienen también enlaces alfa-D-1→2 entre los monosacáridos) (89). Dª Aránzazu Gómez de Segura realizó su Tesis doctoral con estas investigaciones.

El Prof. Emilio Cepeda León, del Departamento de Ingeniería Química, Universidad del País Vasco, contactó con el autor porque quería iniciar una línea de biocatálisis. Sugerí que podíamos investigar sobre glucoamilasa y beta-amilasa, lo que se concretó en la Tesis doctoral de D. Marcelino Hermosa Abajo (1999) (90). Se realizó una investigación detallada sobre la optimización de la hidrólisis de maltodextrina por glucoamilasa en un reactor tipo batch, que se ajustaba bien al modelo matemático planteado (91).

Estas investigaciones sobre "la reacción de aceptor" fueron derivando en nuestro interés hacia los alimentos prebióticos, tema de gran relevancia en el laboratorio y cuyo responsable es el Dr. Francisco J. Plou.

Alimentos prebióticos

Los alimentos prebióticos son ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un limitado grupo de bacterias y otros microorganismos en el colon. Y dentro de los prebióticos, los oligosacáridos prebióticos constituyen el grupo más importante: fundamentalmente estamos hablando de fructooligosacáridos (FOS), aunque también tienen gran aplicación los isomaltooligosacáridos (IMOS) y los transgalactooligosacáridos (GalOS). Los oligosacáridos prebióticos son específicamente metabolizados por la microbiota bacteriana beneficiosa (géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides, Lactobacillus*), que crecerá selectivamente en detrimento de la flora intestinal patógena (enterobacterias, clostridia, etc.).

El primer paso en la investigación fue la obtención de FOS, estudios en los que participó (2004-2007) el Dr. Iraj Ghazi (Irán), junto con Dª L. Fernández Arrojo, quien realizó su Tesis doctoral (2009). Los enzimas implicados poseen no sólo la propiedad de transferir un grupo fructosa, sino también la actividad para hidrolizar los oligosacáridos presentes, por lo que se debe trabajar con enzimas con una ratio alta entre la actividad transferasa y la de hidrólisis.

Martín et al. (92) investigaron la síntesis de maltooligosil-fructofuranósidos por CGTasa inmovilizada en Eupergit C usando almidón como donador. Ghazi et al. (93) encontraron que una preparación comercial de la enzima pectinasa de *Aspergillus aculeatus* contenía una gran actividad fructosiltransferasa y escaso poder hidrolizante; la ratio entre estas dos actividades es máxima cuando la concentración de sacarosa en el medio de reacción es superior a 630 g/L.

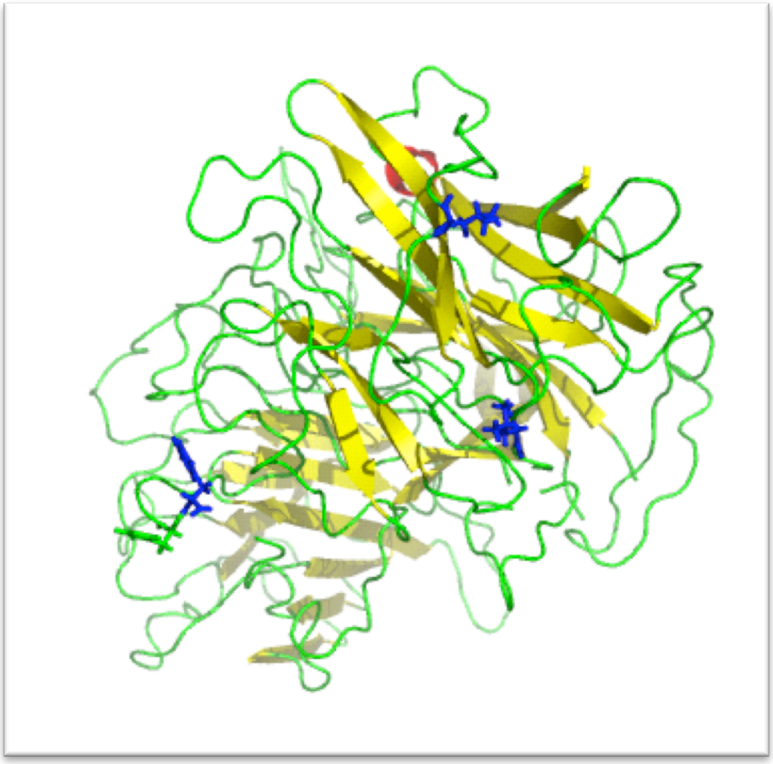


Figura 1.3.- Determinación del número y situación de residuos potencialmente reactivos a pH 8 en un modelo 3D estimado para la β -fructofuranosidasa de *Aspergillus niger* según los cálculos realizados con el software de PROPKA. En azul, los residuos reactivos a pH 8 (grupos anino desprotonados): N-terminal, LYS 170 y LYS 374.

Para explicar la diferente reactividad relativa de *A. aculeatus* y *Aspergillus niger* a pH 8, se aplicó el programa PROPKA (L. Fernandez Arrojo, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 2009).

También se usaron subproductos industriales, como el jarabe y la melaza de remolacha. Con su inmovilización en Eupergit C de distinta

porosidad se consiguió, en reactor tipo batch, una concentración de 390 g/L de FOS (93). Esta interesante enzima fue posteriormente purificada y caracterizada; se trata de un dímero de 135 kDa y 20% de azúcares en su composición (94). En un estudio en colaboración con la Profª. Mª Fernández Lobato (CBM, UAM-CSIC), el Dr. Julio Polaina (IATA-CSIC) y el Dr. Jesús Jiménez-Barbero (CIB-CSIC), se caracterizó una beta-fructofuranosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* que tenía actividad de transfructosilación: el resultado fue la producción con buen rendimiento del prebiótico 6-kestosa (95).

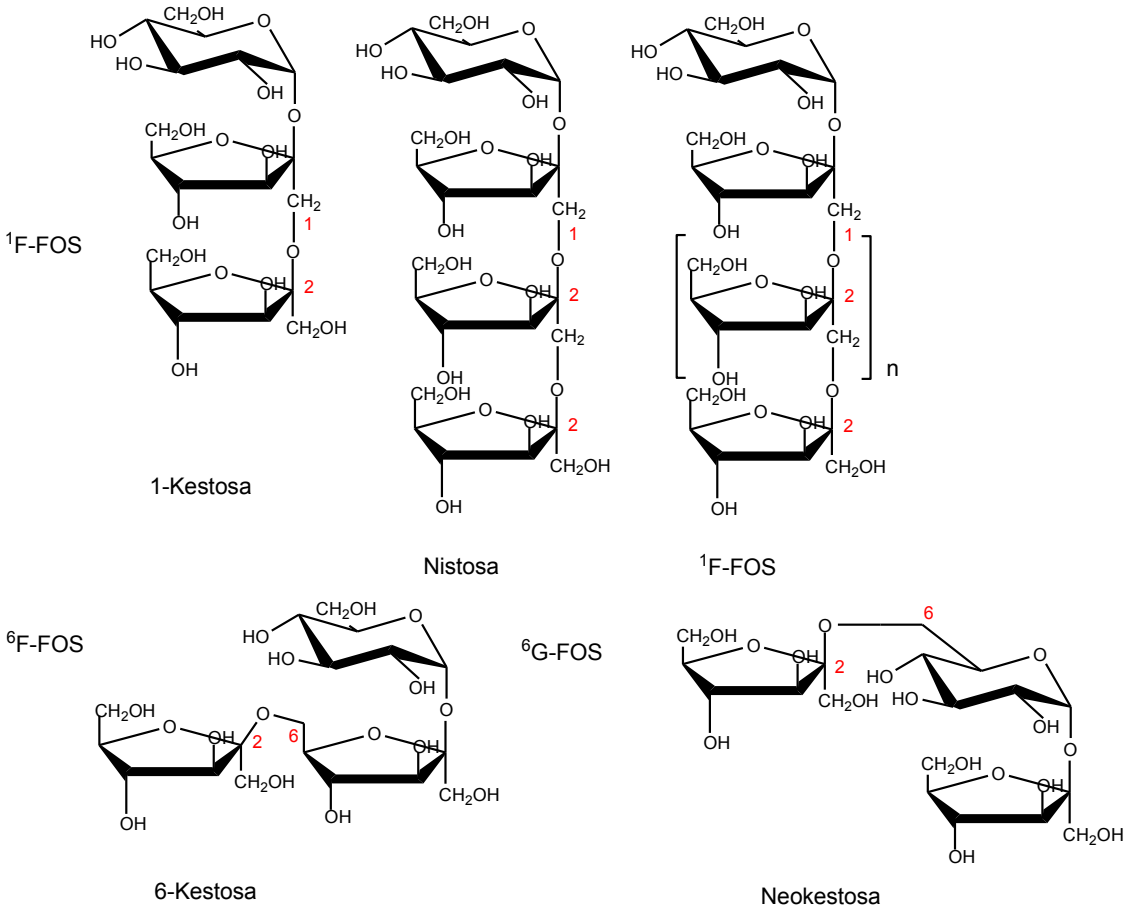


Figura 1.4.- Estructuras de posibles FOS que pueden formarse en este tipo de reacciones (L. Fernández Arrojo, Tesis doctoral).

2.7. Investigación sobre compuestos antioxidantes, desde 2006

Un alimento funcional puede definirse como aquél que ejerce un efecto beneficioso sobre una o varias funciones biológicas con el objetivo de paliar o prevenir la aparición de diferentes procesos patológicos. Dentro de los

ingredientes funcionales, por lo que respecta a nuestro laboratorio debemos citar los prebióticos y los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son aquellos que tienen al menos un anillo aromático con un grupo OH en su estructura. Se ha demostrado diferentes actividades biológicas para estos compuestos, siendo su actividad antioxidante la más relevante, ya que los procesos oxidativos son causa de muchas enfermedades debido a la acumulación de radicales libres. La teoría oxidante de la enfermedad consiste en que determinadas situaciones de estrés o patologías diversas provocan un aumento exagerado de la concentración de radicales libres, produciéndose entonces daño tisular, el cual puede desembocar en enfermedad.

En nuestros estudios hemos investigado --usando enzimas diversas-- la modificación química de vitaminas antioxidantes (vitaminas C y E) (96-98) y de resveratrol. El resveratrol es una molécula que está siendo actualmente muy estudiada por ser la responsable de la "paradoja francesa" (baja incidencia en Francia de enfermedades cardiovasculares, a pesar del que es el primer consumidor de vino del mundo). En muchos casos, el resveratrol se encuentra en la naturaleza en forma de 3-O-beta-D-glucosil-resveratrol (piceido). Dª Pamela Torres, en su Tesis doctoral, ha desarrollado métodos de acilación y de glicosilación regioselectiva de resveratrol utilizando lipasas y CGTasas respectivamente (99-101). El Dr. A. Kunamneni (India) ha participado (2005-2008) en estos y en otros estudios.

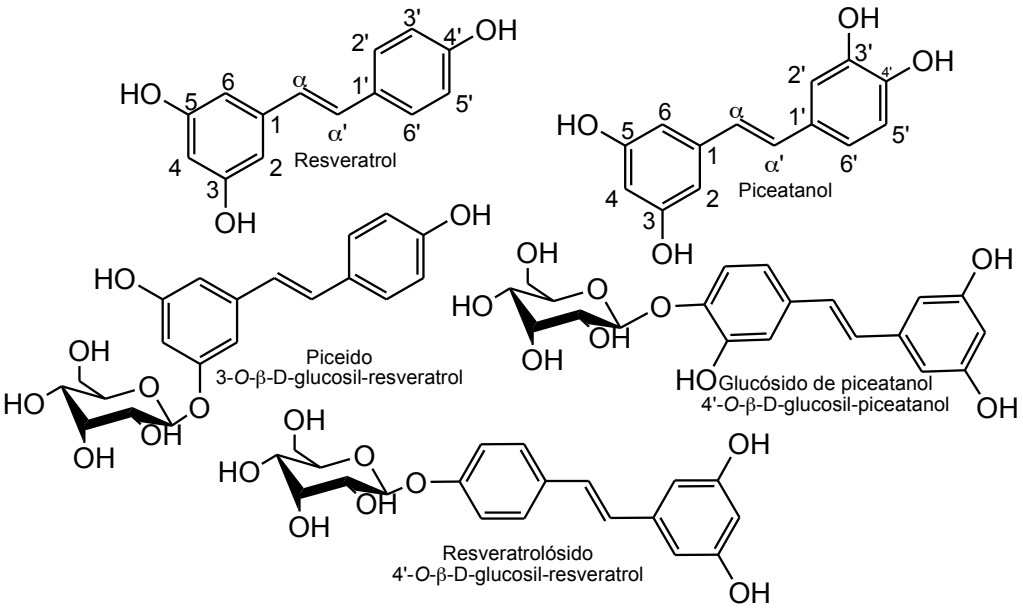


Figura 1.5.- Algunos estilbenos de la familia del resveratrol (P. Torres Salas, Tesis doctoral).

2.8. Investigaciones aplicando las nuevas herramientas moleculares aplicadas en biocatálisis

Como apuesta de futuro, y teniendo en cuenta las tecnologías del ADN recombinante que empezaban a aplicarse en los laboratorios punteros en Biocatálisis, seleccionamos cuidadosamente los laboratorios extranjeros en que los Drs. Miguel Alcalde y Manuel Ferrer deberían aprenderlas, para posteriormente a su regreso poderlas implementar en nuestro laboratorio. Y que la formación de excelencia obtenida les fuese importante a la hora de optar a plazas de investigador.

2.8.1. Metagenómica para biocatálisis (2004-2007)

Este abordaje ha sido iniciado en nuestro grupo por el Dr. Manuel Ferrer, después de realizar una estancia postdoctoral de 3 años en el Centro Federal de Biotecnología con el Prof. K. Timmis (GBF, Alemania). El Dr. Timmis tiene acceso a metagenomas en localizaciones extremas (102), como una fosa marina en el Mediterráneo, o incluso un volcán en Japón; también al del rumen de vaca (103-106). Esto ha hecho que a partir de estas muestras inéditas se haya podido rescatar estructura de ADNs de organismos que no se saben cultivar en el laboratorio, y que se hayan podido encontrar actividades

enzimáticas muy especiales. Así, se han obtenido una carboxilesterasa que se ha podido transformar en lipasa mediante una mutación al azar (103), una polifenol oxidasa de propiedades inéditas (104), se ha profundizado en el mecanismo de una acetilxilano-esterasa perteneciente a la familia carbohidrato 6 (105) y una ciclodextrinasa novedosa (106). Dª Ana Beloqui ha realizado en estos y otros sistemas su Tesis doctoral (2009). (En el capítulo del Dr. M. Ferrer, incluido en esta Monografía, puede encontrarse información detallada sobre la herramienta de metagénomica en biocatálisis).

2.8.2. Evolución molecular dirigida (desde 2003)

La Evolución Molecular Dirigida es una herramienta para diseñar funciones enzimáticas novedosas nunca antes requeridas en ambientes naturales, y que tiene un gran potencial científico y tecnológico. Se trata de reproducir en el laboratorio los procesos clave de la evolución natural, pero con una escala de tiempos de sólo meses (en vez de millones de años).

Para formarse en Evolución Dirigida, el Dr. Miguel Alcalde realizó una estancia de dos años con la Profª. Frances Arnold, del California Institute of Technology, la primera autoridad mundial en el tema (107). Esta especialización pudo ser aplicada en un proyecto solicitado después de la catástrofe del Prestige en las costas gallegas en 2002, para la eliminación de hidrocarburos poliaromáticos mediante aplicación de enzimas oxidorreductasa (p.e. lacasa (108, 109)). Este tipo de investigaciones abren la puerta a la "environmental biocatalysis", en la que la biodegradación de productos contaminantes no se hace con células enteras sino con enzimas (110, 111). El autor fue *Chairman* del Simposio "Environmental biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes", Córdoba 2006, organizado en colaboración con los Profs. J.M. Marinas y Diego Luna.

Dentro de esta tecnología para obtener los mejores biocatalizadores (enzimas) se ha llevado a cabo la ingeniería de lacasas mediante mutagénesis combinatorial de saturación siguiendo la técnica IVOE (In Vivo Overlap Extension) (112). Uno de los resultados más notables se alcanzó con la evolución de una lacasa fúngica para hacerla resistente a altas

concentraciones de disolventes orgánicos (etanol, acetonitrilo, DMSO y otros) (113), trabajo que constituyó la tesis doctoral de Miren Zumárraga (2007). En colaboración con investigadores de nuestro Instituto y con el Prof. S. Shleev de la Universidad de Malmö, Suecia, se ha avanzado en la caracterización de un mutante originado a partir de lacasa T2 de *Myceliophthora thermophila* (114, 115). Finalmente, hemos publicado un estudio actividad/estabilidad mediante evolución de librerías de oxidorreductasas ligninolíticas (116). Más recientemente estamos involucrados en varios proyectos de evolución dirigida de oxidoreductasas ligninolíticas de alto potencial redox, financiados con fondos nacionales y europeos, y en colaboración con los Drs. A.T. Martinez, S. Camarero y M. J. Martinez (CIB, CSIC Madrid). En particular, el resultado más notorio ha sido la evolución dirigida de lacasas de alto potencial redox (117). También hemos empleado la evolución dirigida en varios contratos con empresas farmacéuticas con la finalidad de estudiar inhibidores de la síntesis de colesterol. (En el capítulo del Dr. Alcalde, incluido en esta Monografía, puede encontrarse información detallada sobre la herramienta de evolución dirigida).

3. REFLEXIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La sucesión/lista de temas de investigación que se han comentado más arriba da en principio una idea de cómo el autor a lo largo de los años ha ido adaptando sus temas siguiendo las cambiantes fronteras de la biocatálisis aplicada (cf. Tabla I). A continuación menciono unas reflexiones personales sobre los años pasados, junto con algunas investigaciones/temas que, en mi opinión, tendrán un gran impacto y relevancia en el futuro.

Tabla I.- Temas de investigación del autor.

SISTEMA	LINEA / OBJETIVO	AREAS
2.1 Enzimas de biosíntesis de histidina (1969-1976)	Bioquímica y Biología molecular	**Microbiología aplicada**
2.2 Nucleasas inmovilizadas (1973-1998)	Eliminación de ácidos nucleicos	**Alimentación humana y animal**
2.3 Hidrogenasas (Desde 1976)	Biofotólisis del agua	**Energía**
2.4 Lipasas (Desde 1987)	Síntesis de mono y di-glicéridos	**Alimentación**
2.5 Inmovilización sol-gel (1993-2001)	Silicatos y Siloxanos	**Salud** **Otras áreas**
2.6 Enzimas de azúcares (Desde 1994)	Aditivos alimentarios. Ciclodextrinas y Dextranos. Alimentos prebióticos	**Alimentación y Salud humana y animal**
2.7 Modificación enzimática de antioxidantes(Desde 2006)	Acilación. Glicosilación	**Nutrición y Salud humanas**
2.8.1 Metagenómica para biocatálisis (2004 -2007)	Búsqueda de enzimas novedosos	**Varias**
2.8.2 Evolución molecular dirigida (Desde 2003)	**Obtención de oxidorreductasas con propiedades deseadas**	**Biorremediación.** **Otras**

i) La empresa Tanabe (Japón) puso en el mercado, durante los años 1969-1973, tres procesos en gran escala para la obtención de L-aminoácidos (a partir de mezclas racémicas) o de ácido L-aspártico o succínico; uno utilizaba un enzima, los otros dos usaban células enteras (whole cells), en todos los casos el biocatalizador estaba inmovilizado para ser fácilmente

recuperado y re-utilizado. El papel de "catalizador" jugado por la empresa Novo (Novozymes) ha sido fundamental en el progreso de la biocatálisis industrial a lo largo de los años. Desde 1941, en que obtuvo el primer enzima --tripsina (en cristales)--, usado en el procesado de pieles, hasta la lipasa Novozym 435 (todo un éxito hasta la actualidad en muy diversas reacciones de química orgánica) pasando por enzimas para detergentes, glucosa isomerasa para la obtención de jarabes de glucosa-fructosa, enzimas clarificadoras de cerveza o de zumos,…

Después de que al principio de los años 70 se introdujese la tecnología del "*gene splicing*", es decir, la posibilidad de hacer ingeniería genética con la información escrita en los cromosomas, ya en los 80 aparecieron los primeros enzimas comerciales procedentes de (micro)organismos genéticamente modificados, OGM. Y esta tendencia ha continuado y continuará con pujanza en el futuro, ahora que cada vez tienen menos fuerza las voces que se oponen al uso de OGM.

ii) En centros académicos los primeros trabajos que iban apareciendo hacia 1970 se limitaban a inmovilizar/insolubilizar un enzima; se decía por aquellos años que había autores que elegían un trío soporte/enzima/tipo de enlace entre ambos, para publicar otro nuevo paper, lo que en sí no tenía mucho sentido. Había que soportar enzimas para realizar algo: obtener tal o cual producto, y además con re-utilización del catalizador. Cuando ya se habían publicado muchos papers con datos sobre estos tríos, la idea de cambio se fue abriendo paso, y se empezó a pensar en la aplicación. El European Working Party, recogiendo esta forma de pensar, cambió su nombre de "Immobilized Biocatalysts" a "Applied Biocatalysis". Y apareció la revista *Biocatalysis and Biotransformation.*

iii) Como se dice más arriba, la investigación en biocatálisis al principio se centró en enzimas inmovilizadas, posteriormente fueron apareciendo los estudios académicos con células inmovilizadas. Son conocidas las ventajas y desventajas de unos frente a otras; a título de ejemplo, véase (118-122). En todo momento ha habido competencia entre células y enzimas inmovilizadas.

Para los investigadores en la empresa el mejor soporte es el que no existe; de aquí que se hayan desarrollado tanto enzimas como células entrecruzadas (CLECs, CLEAs).

iv) Entre los disolventes no convencionales en biocatálisis últimamente están teniendo un gran desarrollo los líquidos iónicos (123), con los que estamos dentro de la química verde y lejos de muchos disolventes indeseables usados tradicionalmente en química orgánica.

v) Inmovilización orientada. La insolubilización de un enzima o proteína sobre un soporte es casi siempre al azar: en biocatálisis lo que interesa es tener una gran densidad de centros activos anclados en un soporte poroso, dentro del cual se minimicen o eliminen las restricciones difusionales al movimiento de sustratos y productos. Sin embargo, hay otras veces en que es fundamental que el anclaje de la molécula de proteína no se produzca de modo aleatorio, sino a través de una cierta zona del esqueleto proteico, con lo que la macromolécula quedará inmovilizada siguiendo una cierta orientación. Un ejemplo a destacar aquí es el de las enzimas oxidorreductasas inmovilizadas covalentemente sobre un electrodo: hay que fabricar un recubrimiento de capas y grupos activos orientados de una cierta manera para que la proteína se una principalmente por un tipo de sus grupos reactivos, y así conseguir que no pierda su capacidad de transferencia de electrones tras el enlace (124, 125).

vi) Usando como inspiración la estructura y mecanismo catalítico de enzimas, se está avanzando mucho en el diseño de materiales biomiméticos (p.e. zeolitas), muy prometedores en los temas de energía y sostenibilidad (126).

vii) Enzimas termorresistentes útiles en biología molecular. Al igual que ocurrió en el caso de la metodología PCR, el cuello de botella de una técnica puede desaparecer cuando aparece industrialmente una enzima --ADN polimerasa viral-- con unas propiedades únicas (127).

viii) Como hoy en día se está investigando más y más en temas de salud humana (“biotecnología roja”), se está descubriendo que algunos procesos

cancerígenos están relacionados con el envejecimiento (véase por ejemplo el caso de la enzima telomerasa (128) y de múltiples proteasas (129).

ix) En la tendencia global actual a hacer un mundo sostenible y a disminuir drásticamente la cantidad de CO_2 emitido a la atmósfera por la actividad humana, están cobrando cada vez más protagonismo los biocarburantes de segunda generación (130).

4. AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros de mi grupo de investigación a lo largo de estos 40 años, por su importante y valioso esfuerzo en levantar y prestigiar el Departamento de Biocatálisis del CSIC (Madrid), y en especial a los Drs. Francisco Plou y Miguel Alcalde, con los que me honro en seguir colaborando desde que llegaron al grupo. A Juan Francisco García de la Banda, por su decisiva ayuda en los primeros años. A los numerosos colegas con los que he tenido el privilegio de colaborar. Y a los sucesivos Directores del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernandez, V. M. & Ballesteros, A (1977) El sistema de la biosíntesis de histidina y su regulación. En L. Cornudella, C. F. Heredia, J. Oró & A. Sols (Eds.), Avances de la Bioquímica (pp. 289-303). Madrid: Salvat Editores, S. A.

2. Fernandez, V. M., MartinDelRio, R., Tebar, A. R., Guisan, J. M. & Ballesteros, A. O. (1975) Derepression and repression of the histidine operon: Role of the feedback site of the first enzyme. Journal of Bacteriology, 124, 1366-1373.

3. Tebar, A. R., Fernandez, V.M., MartinDelRio, R. & Ballesteros, A. O. (1973) Studies on the quaternary structure of the first enzyme for histidine biosynthesis. Experientia, 29, 1477-1479.

4. Tebar, A. R. & Ballesteros, A. O. (1976) Kinetic properties of ATP phosphoribosyltransferase of Escherichia coli. Molecular and Cellular Biochemistry, 11, 131-136

5. Tebar, A. R., Ballesteros, A. O. & Soria, J. (1977) Spin label studies of ATP phosphoribosyltransferase from E. coli. Experientia, 33, 1014-1015.

6. Tebar, A. R., Ballesteros, A. O. & Soria, J. (1977) Mn(II) electron spin resonance studies on ATP phosphoribosyltransferase from E. coli. Experientia, 33, 1292-1293.

7. Tebar, A. R., Fernandez, V. M., MartinDelRio, R. & Ballesteros, A. O. (1975) Fluorescence studies of phosphoribosyladenosine triphosphate synthetase of Escherichia coli. FEBS Letters, 50, 239-242.

8. Tebar, A. R., Leyva, J. C., Laynez, J. & Ballesteros, A.O. (1978) The action of inhibitors (histidine and AMP) on the ATP phosphoribosyltransferase of E. coli. Revista Española de Fisiología, 34, 159-166.

9. Guisan, J. M. & Ballesteros, A. (1979) Preparation of immobilized sepharose-micrococcal nuclease derivatives: Activity and stability. Journal of Solid-Phase Biochemistry, 4, 245-252.

10. Guisan, J. M., Melo, F. V. & Ballesteros, A. (1981) Determination of intrinsic properties of immobilized enzymes.1. Kinetic studies on Sepharose-staphylococcal nuclease in the absence of diffusional limitations. Applied Biochemistry and Biotechnology, 6, 25-36.

11. Guisan, J. M., Melo, F. V. & Ballesteros, A. (1981) Determination of intrinsic properties of immobilized enzymes. 2. Kinetic studies on Sepharose-staphylococcal nuclease in the presence of diffusional limitations. Applied Biochemistry and Biotechnology, 6, 37-51.

12. Guisan, J. M. & Ballesteros, A. (1981) Hydrolysis of nucleic acids by Sepharose-micrococcal nuclease. Enzyme and Microbial Technology, 3, 313-320.

13. Guisan, J. M., Serrano, J. & Ballesteros, A. (1993) Stabilization of micrococcal endonuclease by immobilization on agarose gels highly activated with CNBr. Biocatalysis, 8, 81-89.

14. Ballesteros, A., Guisan, J. M. & Serrano, J. (1982) Influence of the activation degree of the support on the properties of agarose-nuclease. In I. Chibata, S. Fukui & L. B. Wingard, Jr. (Eds.), Enzyme engineering, vol.6 (pp.223-224). New York: Plenum Publishing Corporation.

15. Guisan, J. M., Serrano, J., Melo, F. V. & Ballesteros, A. (1987) Mixed enzymic reaction-Internal diffusion kinetics of nonuniformly distributed immobilized enzymes. The system agarose-staphyloccoccal nuclease.Applied Biochemistry and Biotechnology, 14, 49-72.

16. Ballesteros, A., Guisan, J. M. & Serrano, J. (1987) Proceedings 4th European Congress on Biotechnology, vol. 2, In O. M. Neijssel, R. R. van der Meer & K. Ch. A. M. Luyben (Eds.), pp. 120-120. Amsterdam: Elsevier.

17. Ballesteros, A., Sanchez Montero, J. M. & Sinisterra, J. V. (1986) p-toluensulfonyl chloride activation of agarose as exemplified by the coupling of lysine and micrococcal endonuclease. Journal of Molecular Catalysis, 38, 227-236.

18. Alcantara, A., Ballesteros, A. & Sinisterra, J. V. (1990) New methodology for tosylation of hydroxylic supports as exemplified by the immobilization of micrococcal endonuclease on agarose. Applied Biochemistry and Biotechnology, 26, 297-310.

19. Alcantara, A., Ballesteros, A., Heras, M. A., Marinas, J. M., Montero, J. M. S. & Sinisterra, J. V. (1987) Activity of staphylococcal nuclease in water-organic media. In C. Laane, J. Tramper & M. D. Lilly (Eds.), Biocatalysis in Organic Media (pp. 337-342), Amsterdam: Elsevier.

20. Alcantara, A. R., Garcia-Blanco, F., Heras, A. M., Sinisterra, J. V. & Ballesteros, A. (1989) Influence of aqueous-organic media in the DNase activity of micrococcal endonuclease. Journal of Molecular Catalysis, 52, 323-336.

21. Moreno, J. M., Sinisterra, J.V. & Ballesteros, A. (1990) Influence of organic-aqueous media in the RNase activity of spleen phosphodiesterase. Journal of Molecular Catalysis, 62, 341-351.

22. Martinez, M. C., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V. & Ballesteros, A. (1990) New insolubilized derivatives of ribonuclease and endonuclease for elimination of nucleic acids in single cells protein concentrates. Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 643-652.

23. Benemann, J.R., Berenson, J.A., Kaplan, N.O. & Kamen, M.D. (1973) Hydrogen evolution by a chloroplast-hydrogenase system. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 70, 2317-2320.

24. Fernandez, V.M. & Ballesteros, A. (1980) Method for anaerobic purification of biochemicals as exemplified by Clostridium pasterianum hydrogenase purification. Analytical Biochemistry 108, 121-125.

25. Fernandez, V.M., Munilla, R. & Ballesteros, A. (1982) Influence of the redox potencial on the activity of Clostridium pasterianum and Chromatium vinosum hydrogenases. Archives of Biochemistry and Biophysics 215, 129-135.

26. Fernandez, V. M., Gutierrez, C. & Ballesteros, A. (1982) Determination of hydrogenase activity using an anaerobic spectrophotometric device. Analytical Biochemistry 120, 85-90.

27. Torres, V., Ballesteros, A., Fernandez, V.M. & Nuñez, M. (1984) Expression of hydrogenase activity in cereals. Annals of the New York Academy of Sciences, 434, 296-298.

28. Torres, V., Ballesteros, A. & Fernandez, V. M. (1986) Expresión of hydrogenase activity in barley (Hordeum vulgare L.) after anaerobic stress. Archives of Biochemistry and Biophysics, 245, 174-178.

29. Aparicio, P. J., Azuara, M. P., Ballesteros, A. & Fernandez, V. M. (1985) Effects of light intensity and oxidized nitrogen sources on hydrogen production by Chlamydomonas reinhardii. Plant Physiology, 78, 803-806.

30. Barate, M., Reyes, P., Munilla, R. Fernandez, V. M., Ballesteros, A. & Ruiz-Arguëso, T. (1987) Effect of pH on tritium exchange and hydrogen production and uptake in free-living cells and in bacteroids of Bradyrhizobium japonicum. Archives of Biochemistry and Biophysics, 259, 639-644.

31. Fernandez, V. M., Ballesteros, A., Munilla, R., Reyes, P., Barate, M. & Ruiz-Argüeso (1989) On the mechanism of hydrogen evolution by the uptake hydrogenase of Bradyrhizobium japonicum. Journal of Molecular Catalysis, 53, L1-L4.

32. Guisan, J. M. & Blanco, R. M. (1987) Stabilization of trypsin by multiple-point attachment to aldehyde-agarose ges. Annals of the New York Academy of Sciences, 501, 67-72.

33. Otero, C., Ballesteros, A. & Guisan, J. M. (1988) Immobilization/stabilization of lipase from Candida rugosa. Applied Biochemistry and Biotechnology 19, 163-175.

34. Blanco, R. M., Calvete, J. J. & Guisan, J. M. (1989) Immobilization-stabilization of enzymes: variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. Enzyme and Microbial Technology 11, 353-359.

35. Ballesteros, A., Bernabe, M., Cruzado, C., Martin-Lomas, M. & Otero, C. (1989) Regioselective deacylation of 1,6-anhydro-beta-D-galactopyranose derivatives catalyzed by soluble and immobilized lipases. Tetrahedron, 45, 7077-7082.

36. Cruces, M. A., Otero, C., Bernabé, M. Martin-Lomas, M. & Ballesteros, A. (1992) Enzymatic preparation of acylated sucroses. Annals of the New York Academy of Sciences, 672, 436-443.

37. Oldfield, C., Otero, C., Rua, M. L. & Ballesteros, A. (1992) Kinetics of enzyme-catalysed reactions in water-in-oil microemulsions. In J. Tramper, M.H. Vermüe, H.H. Beeftink & U. Von Stockart (Eds.), Biocatalysis in non-conventional media (pp. 189-198), Amsterdam: Elsevier.

38. Otero, C., Cruzado, C. & Ballesteros, A. (1991) Use of cyclodextrin in enzymology to enhance the solubility of hydrophobic compounds in water. Applied Biochemistry and Biotechnology, 27, 185-194.

39. Rua, M. L., Diaz-Mauriño, T., Fernandez, V. M., Otero, C. & Ballesteros, A. (1993) Purification and characterization of two distinct lipases from Candida cylindracea. Biochimica et Biophysica Acta, 1156, 181-189.

40. Brown, W. V. (1990) Dietary recommendations to prevent coronary heart disease. In K. T. Lee, K. Onodera, & K. Tanaka (Eds.), Atherosclerosis II (pp. 376-388), The New York Academy of Sciences: New York.

41. Otero, C., Pastor, E., Fernandez, V. M. & Ballesteros, A. (1990) Influence of the support on the reaction course of tributyrin hydrolysis catalyzed by soluble and immobilized lipases. Applied Biochemistry and Biotechnology, 23, 237-247.

42. Otero, C., Pastor, E. & Ballesteros, A. (1990) Synthesis of monobutyrylglycerol by transesterification with soluble and immobilized lipases. Applied Biochemistry and Biotechnology, 26, 35-44.

43. Pastor, E., Otero, C. & Ballesteros, A. (1995) Synthesis of mono- and dioleylglycerols using an immobilized lipase. Applied Biochemistry and Biotechnology, 50, 251-263.

44. Plou, F. J., Barandiaran, M., Calvo, M. V., Ballesteros, A. & Pastor, E. (1996) High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. Enzyme and Microbial Technology, 18, 66-71.

45. Pastor, E., Otero, C. & Ballesteros, A. (1995) Enzymatic preparation of mono- and distearin by glycerolysis of ethyl stearate and direct esterification of glycerol in the presence of a lipase from Candida antarctica (Novozym 435). Biocatalysis and Biotransformation, 12, 147-157.

46. Plou, F.J., Ferrer, M., Nuero, O. M., Calvo, M.V., Alcalde, M., Reyes, F. & Ballesteros, A. (1998) Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. Biotechnology Techniques, 12, 183-186.

47. Ferrer, M., Plou, F.J., Nuero, O.M., Reyes, F. & Ballesteros, A. (1999) Purification and properties of a lipase from Penicillium chrysogenum isolated from industrial wastes. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 76: 569-576.

48. Tsavas, P., Polydorou, S., Faflia, I., Voutsas, E. C., Tassios, D., Flores, M. V., Naraghi, K., Halling, P. J., Chamouleau, F., Ghoul, M., Engasser, J. M., Ferrer, M. &. Plou, F. J. (2002) Solubility of glucose in mixtures containing t-pentanol, dimethylsulfoxide, acids, esters and water. Journal of Chemical and Engineering Data 47: 807-810.

49. Ferrer, M., Cruces, M.A., Bernabé, M., Ballesteros, A. and Plou, F.J. (1999) Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. Biotechnology and Bioengineering 65: 10-15

50. Cruces, M.A., Plou, F. J. Plou, Ferrer, M., Bernabe, M & Ballesteros, A. (2001) Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters. Journal of American Oil Chemists' Society, 78, 541-546.

51. Ferrer, M., Plou, F. J., Fuentes, G., Cruces, M. A., Andersen, L., Christensen, M. & Ballesteros, A. (2002) Effect of the immobilization method of lipase from Thermomyces lanuginosus on sucrose acylation. Biocatalysis and Biotransformation, 20, 63-71.

52. Ferrer, M., Cruces, M. A., Plou, F. J., Bernabé, M. & Ballesteros, A. (2000) A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and n-dodecyl maltosides. Tetrahedron, 56, 4053-4061.

53. Plou, F. J., Cruces, M. A., Ferrer, M., Fuentes, G., Pastor, E., Bernabe, M., Christensen, M., Comelles, F., Parra, J. L. & Ballesteros, A. (2002) Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. Journal of Biotechnology, 96, 55-66.

54. Ferrer, M., Comelles, F., Plou, F. J., Cruces, M. A., Fuentes, G., Parra, J. L. & Ballesteros, A. (2002) Comparative surface activities of di- and trisaccharides fatty acid esters. Langmuir, 18, 667-673.

55. Ferrer, M., Perez, G., Plou, F. J., Castell, J. V. & Ballesteros, A. (2005) Anti-tumour activity of maltotriose esters obtained by enzymatic synthesis. Biotechnology and Applied Biochemistry, 42, 35-39.

56. Devulapalle, K. S., Gomez de Segura, A., Ferrer, M., Alcalde, M., Mooser, G. & Plou, F. J. (2004) Effect of carbohydrate fatty acid esters on Streptococcus sobrinus and glucosyltransferase activity. Carbohydrate Research, 339, 1029-1034.

57. Plou, J. F., Cruces, M. A., Pastor, E., Ferrer, M., Bernabe, M. & Ballesteros, A. (1999) Acylation of sucrose with vinyl esters using immobilized hydrolases: demonstrating that chemical catalysis may interfere with enzymatic catalysis. Biotechnology Letters, 21, 635-639.

58. Reyes-Duarte, D., Lopez-Cortes, N., Ferrer, M., Plou, F. J. & Ballesteros, A. (2005) Parameters affecting productivity in the lipase-catalysed synthesis of sucrose palmitate. Biocatalysis and Biotransformation, 23, 19-27.

59. Ferrer, M., Soliveri, J., Plou, F.J., Lopez-Cortes, N., Reyes-Duarte, D., Christensen, M., Copa-Patiño, J. L. & Ballesteros, A. (2005) Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from Thermomyces lanuginosus and Candida antarctica B and their antimicrobial properties. Enzyme and Microbial Technology, 36, 391-398.

60. Fuentes, G., Cruces, M.A., Plou, F.J., Ballesteros, A. & Verma, C.S. (2002) Computacional studies of sugars using subtilisin: importance of entropic effects. ChemBioChem, 9, 907910.

61. Fuentes, G., Ballesteros, A. & Verma, C. S. (2004) Specificity in lipases: A computacional study of transesterification of sucrose. Protein Science, 13, 3092-3103.

62. Fuentes, G., Ballesteros, A. & Verma, C.S. (2006) Enthalpic and entropic contributions in the transesterification of sucrose: Computational studies of lipases and subtilisin. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 25 , 145-155.

63. Vasudevan, P. T., Lopez-Cortes, N., Caswell, H., Reyes-Duarte, D., Plou, F. J., Ballesteros, A., Como, K. & Thompson, T. (2004) A novel hydrophilic support, CoFoam, for enzyme immobilization. Biotechnology Letters, 26, 473-477.

64. Ballesteros, A., Levine, H., Delker, W., Nakagawa, Y. & Kaiser, E. T. (1976) Flavinyl-papain species: synthesis and properties of new “artificial” enzymes. Proceedings of the 172nd Meeting of the American Chemical Society, San Francisco, USA, p.172.

65. Plou, F. J. & Ballesteros, A. (1994) Acylation of subtilisin with long fatty acids residues affects its activity and thermostability in aqueous medium. FEBS Letters, 339, 200-204.

66. Calvo, M. V., Plou, F. J., Pastor, E. & Ballesteros, A. (1995) Effect of chemical modification of isoenzymes A and B from C. rugosa on their activity and stability. Biotechnology Letters, 17, 171-176.

67. Calvo, M. V., Plou, F.J. & Ballesteros, A. (1996) Effects of surfactants on activity of native and chemically modified lipases A and B from Candida rugosa. Biocatalysis and Biotransformation, 13, 271-285.

68. Redondo, O., Herrero, A., Bello, J. F., Roig, M. G., Calvo, M.V., Plou, F. J. & Burguillo, F. J. (1995) Comparative kinetic study of the lipases A and B from Candida rugosa in the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. Biochimica et Biophysica Acta, 1243, 15-24.

69. Nuero, O. M., Martin, M. T. & Ballesteros, A. (1998) Semisynthetic bovine pancreatic ribonuclease: Activity and stability. In M. Mota & E. C. Ferreira (Eds.), Proceedings of Biotec’98, p. 65. Universidade do Minho: Braga, Portugal.

70. Gill, I. & Ballesteros, A. (1998) Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. Journal of the American Chemical Society, 120, 8587-8598.

71. Gill, I. & Ballesteros, A. (1996) Novel sol-gel matrices for the immobilization of enzymes. Annals of the New York Academy of Sciences, 799, 697-700.

72. Gill, I., Pastor, E. & Ballesteros, A. (1999) Lipase-silicone biocomposites: Efficient and versatile immobilized biocatalysts. Journal of the American Chemical Society, 121, 9487-9496.

73. Gill, I. & Ballesteros, A. (2000) Degradation of organophosphorous nerve agents by enzyme-polymer nanocomposites: efficient biocatalytic materials for personal protection and large-scale detoxification. Biotechnology and Bioengineering, 70, 400-410.

74. Gill, I. & Ballesteros, A. (2003) Immunoglobulin-polydiacetylene sol-gel nanocomposites as solid-state chromatic biosensors. Angewandte Chemie International Edition, 42, 3264-3267.

75. Gill, I. & Ballesteros, A. (2000) Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. Trends in Biotechnology, 18, 282-296.

76. Gill, I. & Ballesteros, A. (2000) Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 2): non-sol-gel protein-polymer biocomposites. Trends in Biotechnology, 18, 469-479.

77. Alcalde, M., Plou, F. J., Pastor, E. & Ballesteros, A. (1998) Effect of chemical modification of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from Thermoanaerobacter sp. on its stability and product selectivity. Annals of the New York Academy of Sciences, 864, 183-187.

78. Alcalde, M., Plou, F. J., Andersen, C., Martin, M. T., Pedersen, S. & Ballesteros, A. (1999) Chemical modification of lysine side chains of cyclodextrin glycosyltransferase from Thermoanaerobacter causes a shift from cyclodextrin glycosyltransferase to alpha-amylase specificity. FEBS Letters, 445, 333-337.

79. Alcalde, M., Plou, F. J., Martin, M. T., Valdes, I., Mendez, E. & Ballesteros, A. (2001) Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from Thermoanaerobacter sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor. Journal of Biotechnology, 86, 71-80.

80. Alcalde, M., Plou, F. J., Perez-Boada, M., Garcia-Arellano, H., Valdes, I., Mendez, E. & Ballesteros, A. (2003) Chemical modification of carboxylic residues in a cyclodextrin glucanotransferase and its implication in the hydrolysis/transglycosylation ratio of the alpha-amylase family. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 26, 57-67.

81. Martin, M. T., Alcalde, M, Plou, F. J. & Ballesteros, A. (2002) Covalent immobilization of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) in activated silica and Sepharose. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 39, 229-234.

82. Martin, M. T., Plou, F. J., Alcalde, M. & Ballesteros, A. (2003) Immobilization of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21, 299-308.

83. Martin, M. T., Alcalde, M., Plou, F.J., Dijkhuizen, L. & Ballesteros, A. (2001) Synthesis of malto-oligosaccharides via the aceptor reaction catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferases. Biocatalysis and Biotransformation, 19, 21-35.

84. Alcalde, M., Plou, F. J., Martin, M. T., Remaud, M., Monsan, P.& Ballesteros, A. (1998) Stability in the presence of organic solvents of dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F immobilized in calcium-alginate beads. In A. Ballesteros, F. J. Plou, J. L. Iborra & P. Halling (Eds.), Stability and stabilization of biocatalysts (pp. 535-540). Amsterdam: Elsevier.

85. Alcalde, M., Plou, F. J., Gomez de Segura, A., Remaud-Simeon, M., Willemot, R. M., Monsan, P. & Ballesteros, A. (1999) Immobilization of native and dextran-free dextransucrases from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F for the synthesis of glucooligosaccharides. Biotechnology Techniques, 13, 749-755.

86. Gomez de Segura, A., Alcalde, Plou, F. J., Remaud-Simeon, Monsan, P. & Ballesteros, A. (2003) Encapsulation in LentiKats of dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299, and its effect on product selectivity. Biocatalysis and Biotransformation, 21, 325-331.

87. Gomez de Segura, A., Alcalde, M., Lopez-Cortes, N., Plou, F. J. Ballesteros, A. (2004) Modulating the synthesis of dextran with the aceptor reaction using native and encapsulated dextransucrases. Food Technology and Biotechnology, 42, 337-342.

88. Gomez de Segura, A., Alcalde, Yates, M., Rojas-Cervantes, M. L., Lopez-Cortes, N., Ballesteros, A. & Plou, F. J. (2004) Immobilization of dextran sucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F on Eupergit C supports. Biotechnology Progress, 20, 1414-1420.

89. Gomez de Segura, A., Alcalde, M., Bernabé, M., Ballesteros, A. & Plou, F. J. (2006) Synthesis of methyl alfa-D-glucooligosaccharides by entrapped dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides B-1299. Journal of Biotechnology, 124, 439-435.

90. Hermosa Abajo, M. (1999) Biotransformaciones con beta-amilasa y con glucoamilasa. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid.

91. Cepeda, E., Hermosa, M. & Ballesteros, A. (2001) Optimization of maltodextrin hydrolysis by glucoamylase in a batch reactor. Biotechnology and Bioengineering, 76, 70-76.

92. Martin, M. T., Cruces, M. A., Alcalde, M., Plou, F. J., Bernabé, M. & Ballesteros, A. (2004) Synthesis of maltooligosyl fructofuranosides catalyzed by immobilized cyclodextrin glucosyltransferase using starch as donor. Tetrahedron, 60, 529-534.

93. Ghazi, I., Gomez de Segura, A., Fernandez-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M. L., Plou, F. J. & Ballesteros, A. (2005) Immobilisation of fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. Journalof Molecular Catalysis B: Enzymatic, 35, 19-27.

94. Ghazi, I., Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Plou, F. J. & Ballesteros, A. (2007) Purification and kinetic characterization of a transfructosylase from Aspergillus aculeatus. Journal of Biotechnology, 128, 204-211.

95. Alvaro-Benito, M., de Abreu, M., Fernandez-Arrojo, L., Plou, F. J., Jiménez-Barbero, J., Ballesteros, A., Polaina, J. & Fernandez-Lobato, M. (2007) Characterization of a beta-fructofuranosidase from Schwanniomyces occidentalis with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. Journal of Biotechnology, 132, 75-81.

96. Torres, P., Kunamneni, A., Plou, F. J. & Ballesteros, A. (2008) Enzymatic modification for ascorbic acid and alpha-tocopherol to enhance their stability in food and nutricional applications. The Open Food Science Journal, 2, 1-9.

97. Reyes-Duarte, D., Lopez-Cortes, N., Torres, P., Comelles, F., Parra, J. L., Peña, S., Ugidos, A. V., Ballesteros, A. & Plou, F. J. (2011) Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by Lypozyme TL IM using triglycerides as acyl donors. Journal of the American Oil Chemists' Society, 88,57-64.

98. Torres, P., Reyes-Duarte, Lopez-Cortes, N., Ferrer, M., Ballesteros, A. & Plou, F. J.(2008) Acetylation of vitamin E by Candida antarctica lipase B immobilized on different carriers. Process Biochemistry, 42, 145-153.

99. Torres Salas, P., Plou Gasca, F.J. y Ballesteros Olmo, A. (2008) Procedimiento enzimático para la acilación en posición 3 del resveratrol. Patente española 200803184.

100. Torres, P., Poveda, A., Jiménez-Barbero, J., Ballesteros, A. & Plou, F. J. (2010) Regioselective lipase-catalyzed synthesis of 3-O-acyl-derivatives of resveratrol and study of their antioxidant properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 807-813.

101. Medina, I., Alcantara, D., Gonzalez, M.J., Torres, P., Lucas, R. Roque, J., Plou, F.J. & Morales, J.C. (2010) Antioxidant activity of resveratrol in several fish lipid matrices: Effect of acylation and glucosylation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58,9778-9986.

102. Ferrer, M., Golyshina, O. V., Chernikova, T. N., López, N., Reyes-Duarte, D., Plou, F. J., Ballesteros, A., Timmis, K. N. & P. Golyshin, P. (2005). Metagenomes from harsh environments: screening novel enzymes with unique structural signatures for new processes. Proceedings of the XVIII Enzyme Enginering Conference, Korea, October (p. 37). New York: Engineering Foundation.

103. Reyes-Duarte, D., Polaina, J., López-Cortés, N., Alcalde, M., Plou, Elborough, K., Ballesteros, A., F.J., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. & Ferrer, M. (2005). Conversion of a

carboxylesterase into a triacylglycerol lipase by a random mutation. Angewandte Chemie International Edition 44, 7553-7557.

104. Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Golyshina, O. V., Zumarraga, M., Yakimov, M. M., García-Arellano, H., Alcalde, M., Fernández, V. M., Elborough, K., Andreu, J. M., Ballesteros, A., Plou, F. J., Timmis, K. N., Ferrer, M. & Golyshin, P. N., (2006) Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: Biochemical properties, structural analysis and phylogenetic relationships. Journal of Biological Chemistry, 281, 22933-22942.

105. Lopez-Cortes, N., Reyes-Duarte, D., Beloqui, A., Polaina, J., Ghazi, I., Golyshina, O. V., Ballesteros, A., Golyshin, P. & Ferrer, M. (2007). Catalytic role of conserved HQGE motif in the CE6 carbohydrate esterase family. Biotechnology Journal, 2, 207-213.

106. M. Ferrer, M., Beloqui, A., Golyshina, O. V., Plou, F. J., Neef, A., Chernikova, T. N., Fernández-Arrojo, L., Ghazi, I., Ballesteros, A., K. Elborough, K., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2007) Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. FEBS Letters, 581, 4657-4662.

107. Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. & Arnold, F. H. (2003) Functional expression of a fungal laccase in Saccharomyces cerevisiae by directed evolution. Applied and Environmental Microbiology, 69, 987-995.

108. Zumarraga, M., Plou, F. J., Garcia, H., Ballesteros, A. & Alcalde, M. (2007) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a fungal laccase engineered by directed evolution. Biocatalysis and Biotransformation, 25, 219-228.

109. Cañas, A. I., Alcalde, M., Plou, F. J., Martinez, M. J., Martinez, A. T. & Camarero, S. (2007) Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. Environmental Science and Technology, 47, 2964-2971.

110. Garcia-Arellano, H., Alcalde, M. & Ballesteros, A. (2004) Use and improvement of microbial redox enzymes for environmental purposes. Microbial Cell Factories, 3, art.nº 10.

111. Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J. & Ballesteros, A. (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. Trends in Biotechnology, 24, 281-287.

112. Alcalde, M., Zumarraga, M., Polaina, J., Ballesteros, A. & Plou, F. J. (2006) Combinatorial saturation mutagenesis by in vivo overlap extension for the engineering of fungal laccases. Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening, 9, 281-287.

113. Zumarraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Plou, F. J., Ballesteros, A. & Alcalde, M. (2007) In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. Chemistry and Biology, 14, 1052-1064.

114. Zumarraga, M., Camarero, S., Martinez-Arias, A., Ballesteros, A, Plou, F. J & Alcalde, M. (2008) Altering the laccase functionality by in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, 71, 250-260.

115. Zumarraga, M., Vaz Dominguez, C., Camarero, S., Shleev, S., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Ferrer, M., de Lacey, A., Fernandez, V. M., Ballesteros, A., Plou, F. J. & Alcalde, M. (2008) Combinatorial saturation mutagenesis of the Myceliophthora thermophila laccase T2 mutant: the connection between the C-terminal plug and the conserved 509VSG511 tripeptide. Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening, 11, 807-816.

116. Garcia-Ruiz, E., Mate, D., Ballesteros, A., Martinez, A. T. & Alcalde, M. (2010) Evolving thermostability in mutants libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast. Microbial Cell Factories, 9, art.nº 17.

117. Maté, D., García-Burgos, C., García-Ruiz, E., Ballesteros, A.O., Camarero, S. & Alcalde, M. (2010) Laboratory evolution of high-redox potential laccases. Chemistry & Biology 17, 1030-1041.

118. Iborra, J. L., Manjon, A., Canovas, M., Lozano, P. & Martinez, C. (1994) Continuous limonin degradation by immobilized Rhodococcus fascinas cells in kappa-carragenan. Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 487-493.

119. Canovas, M. & Iborra, J. L. (2005) Whole cell biocatalysts stabilization for L-carnitine production. Biocatalysis and Biotransformation, 23, 149-158.

120. Iborra, J. L., Ferragut, J. A. & Lozano, J. A. (1981) Subunits interactions in tyrosinase from frog epidermis in immobilized enzyme-systems. Biochemical Journal, 197, 581-589.

121. Clapes, P. & Infante, M. R. (2002) Amino acid-based surfactants: Enzymatic synthesis, properties and potential applications. Biocatalysis and Biotransformation 20, 215-233.

122. Gotor-Fernandez, V., Brieva, R. & Gotor, V. (2006) Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. Journal of Molecular CatalysisB: Enzymatic 40, 111-120.

123. Lozano, P., de Diego, T., Gmouth, S., Vaultier, M. & Iborra, J. L. (2004) Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems. Biotechnology Progress, 20, 661-669.

124. Turkova, J. (1999) Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 722, 11-31.

125. Madoz-Gurpide, J., Abad, J.M., Fernandez-Recio, J., Velez, M., Vazquez, L., Gomez-Moreno, C. & Fernandez, V. M. (2000) Modulation of electroenzymatic NADPH oxidation through oriented immobilization of ferredoxin:NADP+ reductase onto modified gold electrodes. Journal of the American Chemical Society, 122, 9808-9817.

126. Boronat, M., Sanchez Martinez, C., Law, D. & Corma, A. (2008) Enzyme-like specificity in zeolites: a unique site position in mordenite for selective carbonylation of methanol and dimethyl ether with CO. Journal of the American Chemical Society, 130, 16316-16324.

127. Salas, M., Blanco, L., Lazaro, J. M. & de Vega, M. (2008) My favorite enzyme: The bacteriophage Phi29 DNA polymerase. IUBMB Life, 60, 82-85.

128. Blasco, M. A. (2007) Telomere length, stem cells and aging. Nature Chemical Biology, 10, 640-649.

129. Lopez-Otín, C. & Bond, J. S. (2008) Proteases: Multifunctional enzymes in life and medicine. Journal of Biological Chemistry, 283, 30433-30437.

130. Dellomonaco, C., Fava, F. & Gonzalez, R. (2010) The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. Microbial Cell Factories, 9, art.nº 3.

Capítulo II

LAS FERMENTACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO

Flavia Marinelli, Francesco Molinari

RESUMEN

Las fermentaciones industriales han sido muy utilizadas para la producción de moléculas orgánicas de interés farmacéutico. La mayoría de los productos farmacéuticos obtenidos por fermentaciones microbianas son metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios desempeñan diferentes papeles en la naturaleza, tales como antibióticos, toxinas, ionóforos, biorreguladores, así como, la señalización intra- e interespecífica. Se producen en la mayoría de los casos por hongos filamentosos y actinomicetos, pero también por otras bacterias (Bacillus, Pseudomonas, Mixobacterias y Cianobacterias). Desde un punto de vista biotecnológico, los metabolitos bioactivos han sido generalmente estudiados como potenciales sustancias antiinfecciosas (antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios). Todo comenzó con el descubrimiento de la penicilina. El desarrollo de procesos de producción a gran escala para la penicilina en primer lugar, y después para una gran cantidad de antibacterianos, ha estimulado al desarrollo de la industria de la fermentación y ha contribuido a la evolución de la biotecnología moderna, incluyendo la aplicación de técnicas del ADN recombinante para mejorar los rendimientos de las líneas productoras. Las fermentaciones a escala industrial, también han permitido la producción de otros productos farmacéuticos, tales como agentes anti cancerígenos e inmunosupresores para el trasplante de órganos, y poniendo en el punto de mira enfermedades cardiovasculares y metabólicas.

Esta revisión pretende describir las últimas novedades en las fermentaciones industriales para la producción de metabolitos secundarios de interés en el

ámbito farmacéutico, tales como nuevas y viejas estatinas, antibacterianos, anti fúngicos, antibióticos antitumorales y agentes inmunosupresores.

Palabras clave: Fermentación; Metabolitos secundarios; Antibióticos; Anticancerígenos; Inmunosupresores; Estatinas; Actinomicetes; Hongos filamentosos.

ABSTRACT

Fermentations for the production of secondary metabolites of pharmaceutical interest

Industrial fermentations have been extensively used for the production of organic molecules of pharmaceutical interest. Most of the pharmaceutical products obtained by microbial fermentations are secondary metabolites. Secondary metabolites play many different roles in nature as antibiotics, toxins, ionophores, bioregulators, and in intra- and interspecific signaling. They are mostly produced by filamentous fungi and actinomycetes, but also by other bacteria (Bacillus, Pseudomonas, Myxobacteria, and Cyanobacteria). From a biotechnological point of view, bioactive metabolites have been mainly studied as potential anti-infectives (antibacterials, antifungals, antivirals, and antiparasitics). It all begun with the discovery of penicillin. The development of large-scale production processes first for penicillin, and then for a large variety of antibacterials has stimulated the development of the fermentation industry and contributed to the evolution of modern biotechnology, including the application of recombinant DNA techniques for improving the performances of the producing strains. Fermentations on industrial scale also allow for the production of other successful pharmaceuticals, such as anticancer and immunosuppressive agents for organ transplantation, and targeting metabolic and cardiovascular diseases.

This review is aimed at describing the state of the art in industrial fermentations for the production of secondary metabolites of interest in the pharmaceutical field, such as old and novel statins, antibacterials, antifungals, antitumor antibiotics and immunosuppressive agents.

K**eywords:** Fermentation; Secondary metabolites; Antibiotics; Anticancers; Immunosupressors; Statins; Actinomycetes, filamentous fungi.

1. PRODUCTOS DE ORIGEN MICROBIANO Y SUS APLICACIONES

La fermentaciones, se pueden definir en sentido estricto como procesos metabólicos donde el oxígeno no se utiliza como aceptor final de la cadena de transporte electrónica (procesos anaerobios), por lo tanto, un sustrato orgánico se utiliza generalmente como aceptor final, llevando a la acumulación de moléculas reducidas, tales como lactato, etanol u otras moléculas simples. Más ampliamente, una definición general de fermentación es "un proceso productivo que supone la utilización de células (microbianas)". Por lo tanto, las fermentaciones industriales son frecuentemente aeróbicas.

Una clasificación más avanzada de las diferentes fermentaciones, se basa en el tipo de ruta metabólica involucrada, a menudo diferenciando entre metabolismo primario y secundario. El metabolismo primario, incluye todas las rutas necesarias para permitir la reproducción celular y su viabilidad, mientras que el metabolismo secundario produce componentes celulares no esenciales para la vida celular y no se encuentran en todas las células en crecimiento.

Un estudio de mercado de los productos de fermentación (en promedio de los últimos cinco años), indica que la producción de metabolitos primarios (especialmente de ácidos orgánicos, nucleótidos y vitaminas), supone un mercado de cuatro billones de dólares, mientras que el mercado de los metabolitos secundarios (anti infecciosos incluyendo antibióticos, anticancerosos, estatinas, etc.) se puede estimar en cerca de 50 billones de dólares. Una situación diferente, se presenta en relación con la producción de bioetanol, donde el apoyo público hace difícil calcular el mercado real de biocombustibles, que puede ser estimado aproximadamente en unos 25 billones de dólares.

Una revisión reciente de Demain (1), informa que el 78% de los antibacterianos y el 74% de los antitumorales tienen relación con productos naturales. La mayoría de ellos, son metabolitos secundarios de los microbios productores. Desde 1981 hasta 2002, los productos naturales fueron la base del 74% de todas las nuevas sustancias químicas para el tratamiento del cáncer, y 48 de 74 agentes antihipertensivos. Casi el 50% de las sustancias terapéuticas nuevas introducidas en el mercado entre 1985 y 2006 fueron productos naturales o sus derivados (2, 3).

Los metabolitos microbianos secundarios, han contribuido al descubrimiento de candidatos clínicos desde el fin del siglo XIX; la investigación pre-farmacológica del ergotismo o coloquialmente fiebre de San Antonio, llevó al descubrimiento de alcaloides como la ergonovina y el ácido lisérgico a partir del esclerocio del hongo (*Claviceps purpurea*). El ácido micofenólico, fue aislado en forma cristalina en 1896 por Gosio y fue el primer compuesto puro que mostró una actividad antibiótica (4). Este producto, del *Penicillium glaucum,* mostró capacidad para inhibir el crecimiento del *Bacillus anthracis* y fue olvidado hasta su redescubrimiento y bautizo en 1913 (5). La penicilina producida por *Penicillium chrysogenum* y la riboflavina producida por *Ashbya gossypii,* fueron los primeros metabolitos fúngicos comercializados por Merck. Berdy informó que 150 compuestos de origen microbiano (menos del 1% de los metabolitos bioactivos conocidos) son utilizados en medicina humana y veterinaria, así como en agricultura en nuestros días (6). De ellos, cien se utilizan en terapia humana. Solo en los últimos 60 años se ha empleado una explotación sistemática de la diversidad microbiana, para producir moléculas orgánicas bioactivas, especialmente después del descubrimiento sobradamente conocido y evolución de la producción de penicilina.

Los metabolitos secundarios microbianos tienen características comunes:

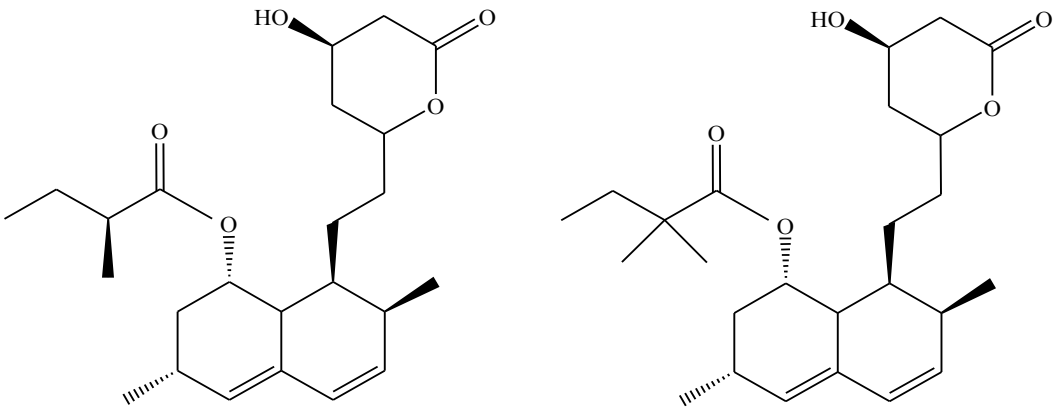
- Muestran amplias actividades biológicas, especialmente de relevancia farmacéutica (antimicrobianos, antitumorales, antivirales, farmacológicos, y actividades similares).

- Son productos metabólicos que se encuentran como sustancias diferenciadas en grupos taxonómicamente específicos.
- Generalmente se producen por un grupo de bacterias relativamente restringido (actinomicetos) y hongos filamentosos, pero sus variaciones intergenéricas, interespecíficas, e intraespecíficas son muy altas.
- Son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (< 3.000) con una amplia panoplia de complejidades estructurales; la estereoquímica determina a menudo un papel crucial para sus actividades biológicas.
- Frecuentemente se acumulan después de que el crecimiento vegetativo o exponencial ha cesado, como familias (complejas) de compuestos relacionados estructuralmente (congéneres).

Las actividades biológicas de los metabolitos secundarios microbianos, los hace muy atractivos para la industria farmacéutica; estos compuestos a menudo presentan gran potencia y selectividad cuando se prueban frente a diversos objetivos biológicos. Su complejidad química, generalmente no permite que la síntesis química reemplace a la fermentación para su producción. Algunas propiedades de estos compuestos, tales como solubilidad, biodisponibilidad, exposición, estabilidad, y metabolismo, pueden requerir mejoras. Por lo tanto, la transformación química o enzimática de los metabolitos microbianos se realiza a menudo para obtener mejores farmacocinéticas y farmacodinámicas. Por ejemplo, la amoxicilina producida por semisíntesis a partir de la penicilina G, tiene un espectro de acción más amplio que el metabolito microbiano original y la meticilina tiene mayor resistencia a las penicilasas. La mayoría de los antibióticos del mercado, hoy en día, son modificaciones semisintéticas de los productos microbianos de fermentación.

Determinadas moléculas bioactivas que inicialmente se identificaron como antibióticos tóxicos, fueron posteriormente empleadas como anticancerígenos dado el efecto inhibitorio sobre la proliferación rápida de células eucariotas; algunas sustancias farmacéuticas antitumorales relevantes descubiertas de esta forma son la Doxorubicina, Mitomicina y Bleomicina producidas por actinomicetos y Epotilones de mixobacteria. Un planteamiento

similar se ha seguido en la búsqueda de agentes inmunomoduladores (p.e. ácido Micofenólico, Ciclosporina A, Sirolimus y Tacrolimus). Estos descubrimientos, demuestran que las fermentaciones microbianas son una fuente de moléculas cuyas aplicaciones van más allá del área antibiótica. La diversidad de actividades de importancia farmacéutica se ha expandido más allá, con la introducción de las pruebas específicas de barrido farmacológico. Los metabolitos secundarios con actividad anticolesterolémica, anti-inflamatoria, antihiperglucémica, anti parasitaria y también insecticidas, se han seleccionado mediante la aplicación del barrido objetivado a la diversidad microbiana (7). Un hito en la expansión del mercado de los metabolitos secundarios es la autorización en 1987 por la Food and Drug Administration (FDA) de la Lovastatina (el primer inhibidor de la 3-Hidroxi-3-metilglutaril S CoA reductasa) que se encuentra en el caldo de fermentación de *Monascus purpureus* por la Universidad Noko de Tokio y del *Aspergillus terreus* por Merck; las estatinas se encuentran ahora, entre las sustancias terapéuticas más vendidas mundialmente. También en este caso, la Sinvastatina semisintética demostró ser más potente que el producto natural de origen fúngico, la Lovastatina.



Lovastatina Simvastatina

Figura 1.- Lovastatina obtenida por fermentación por *Monascus purpereus* o *Aspergillus terreus* y su derivado semisintético Sinvastatina.

2. PROCESOS PRODUCTIVOS

Los metabolitos secundarios se producen únicamente en cantidades ínfimas por los microorganismos silvestres, que generalmente pertenecen a los hongos actinomicetos y filamentosos. Maximizar los rendimientos cualitativos (pureza química) y cuantitativos de la línea productora, es por lo tanto un objetivo primordial de la industria biotecnológica en el campo de las fermentaciones de metabolitos secundarios. La producción de metabolitos secundarios para propósitos industriales está dificultada por la regulación metabólica microbiana que tiende a evitar la acumulación de moléculas innecesarias.

El principal efecto regulador del metabolismo secundario, es la llamada represión por catabolito, definida como la represión (inactivación) de operones específicos a favor de la utilización de glucosa, cuando la glucosa es una de las fuentes carbonadas presentes en el entorno de la célula. Los operones/genes/enzimas involucrados en pasos cruciales de la biosíntesis de metabolitos secundarios, están sometidos a represión de catabolito, donde el catabolito es generalmente glucosa, pero puede reemplazarse por otros fácilmente utilizables, como sustratos para el crecimiento. La represión por catabolito está por tanto, estrictamente ligada con la tasa y la fase de crecimiento, ya que sólo después de que se han utilizado los sustratos más fácilmente utilizables, puede comenzar una eficiente producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto, la regulación de la biosíntesis de metabolitos, asegura que los precursores y la energía metabólica se inviertan en la fabricación de metabolitos secundarios sólo bajo circunstancias ambientales y estados del desarrollo en los que estas moléculas contribuyen al ajuste del organismo al medio.

Más aún, muchas enzimas involucradas en el metabolismo secundario no se expresan adecuadamente para obtener cantidades adecuadas de la molécula deseada; por lo tanto, la sobreexpresión de estas enzimas puede ser una alternativa para incrementar la productividad global, canalizando el flujo metabólico desde el metabolismo primario al secundario. La sobreexpresión se

consigue generalmente incrementando la dotación genética y/o eliminando circuitos reguladores de la síntesis-actividad de las enzimas cuello de botella. Un control regulador común, que puede ser eliminado durante el programa de mejora de la línea celular, es el llamado inhibición por retroalimentación; esto es, la síntesis de penicilina (un metabolito secundario) se inhibe por la acumulación de uno de sus precursores (L-lisina, metabolito primario) (8). De nuevo, la inversión energética en la biosíntesis de metabolitos secundarios se controla por las rutas primarias, detectando el estado metabólico de las células.

Un precursor, se define en la producción de antibióticos, como una molécula orgánica que puede ser incorporada a la molécula final con actividad antibiótica. El precursor biosintético, puede también añadirse como una molécula sintética exógena, de tal forma que la producción de un antibiótico específico, se incrementará significativamente utilizando microorganismos silvestres. El ejemplo clásico es la adición de ácido fenilacético al medio de *Penicillium notatum* para incrementar la producción de penicilina G.

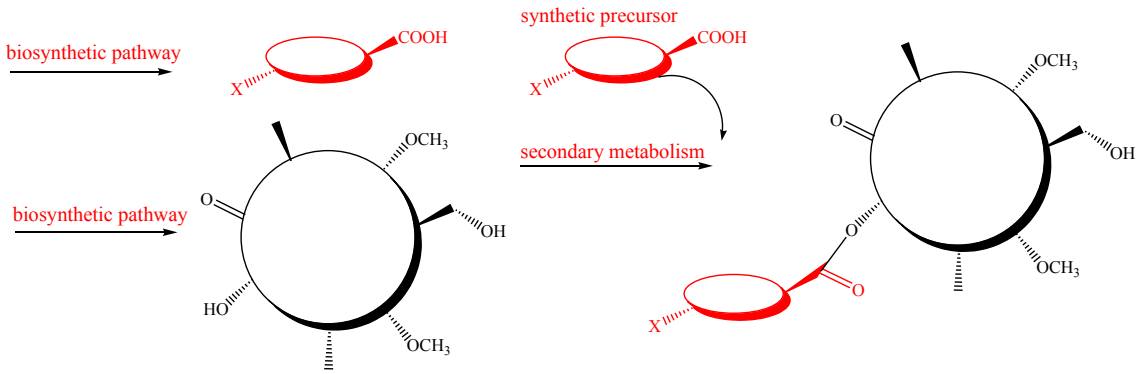


Figura 2.- Incremento de la producción de metabolito secundario por adición de un precursor biosintético.

La observación de que un precursor específico puede incorporarse al metabolito secundario final, se explotó en la producción de nuevos fármacos con estructuras completamente sintéticas que se incorporaron en la molécula final, utilizando una aproximación generalmente conocida como síntesis dirigida por precursor (Figura 3). En los primeros años de la producción de penicilina se intentaron producir varias penicilinas por adición de precursores de cadena diferentes al ácido fenilacético al cultivo de fermentación de *Penicillium notatum*. Consecuentemente, varias penicilinas con estabilidad al medio ácido

se lanzaron en la década de 1950, tales como las primeras penicilinas de administración oral y que pudieron ser producidas mediante fermentaciones, utilizando la estrategia de la biosíntesis dirigida por precursor (9).

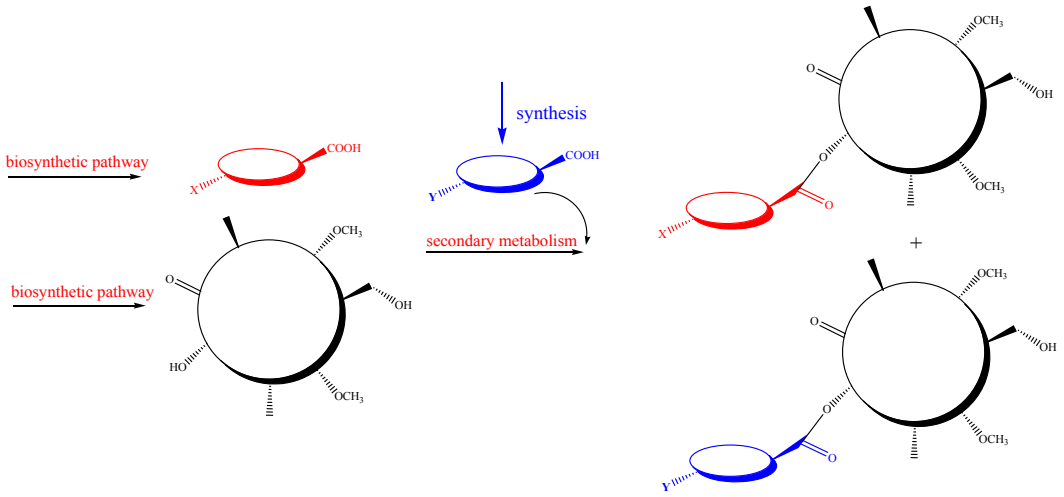


Figura 3.- Producción de metabolito secundario novel por adición de precursor sintético.

La mutasíntesis, es una biosíntesis dirigida por precursor que utiliza microrganismos mutantes deficientes en pasos clave de la ruta biosintética, especialmente en la biosíntesis de un precursor que es crucial (10). Por lo tanto, las líneas mutantes utilizadas en esta estrategia son sólo capaces de sintetizar el antibiótico natural cuando se suministra un precursor concreto y se sustituye el recurso natural con un análogo del precursor que puede llevar a la producción de un nuevo producto natural, como se muestra en la Figura 4.

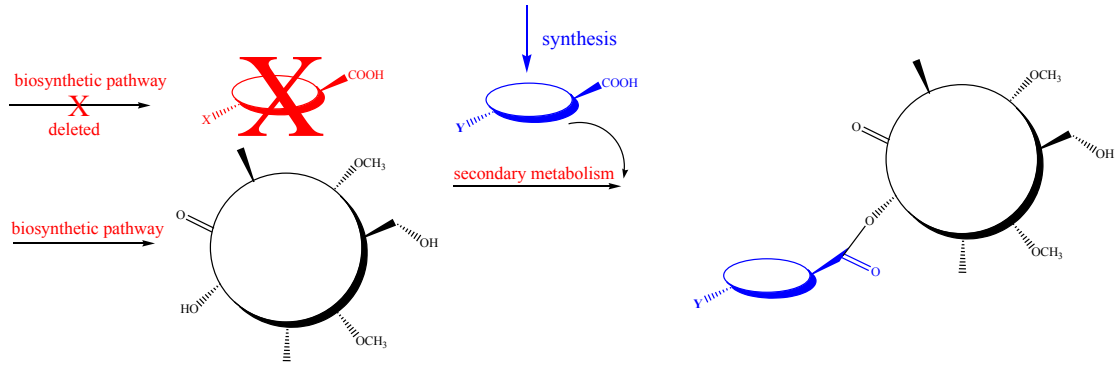


Figura 4.- Principio de la mutasíntesis.

La rapamicina (Sirolimus) es un metabolito poliquétido secundario producido por *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina se utiliza

actualmente como agente inmunosupresor y constituye una estructura básica sobre la que pueden desarrollarse nuevos agentes anticancerígenos, antiinflamatorios e inmunosupresores. Se ha desarrollado una librería de análogos de rapamicina (rapalogos) por mutasíntesis aprovechándose de la observación de que el ácido 4,5-dihidroxiciclo hex-1-en carboxílico (DHCHC) es un precursor en la biosíntesis de rapamicina. El DHCHC deriva del ácido shikímico y es la unidad iniciadora de la elongación de la cadena de poliquétido, obteniéndose pre-rapamicina, la cuál es entonces convertida en rapamicina madura por una serie de transformaciones enzimáticas que involucran principalmente metilación, reducciones estereoselectivas y oxidaciones. Se aisló una línea mutante del *Streptomyces hygroscopicus* incapaz de producir el precursor de DHCHC y se utilizó para mutasíntesis, suministrando el análogo de DHCHC durante la fermentación (11). La figura 5 informa de la estructura de la rapamicina donde se destaca el DHCHC (en rojo) incorporado y los precursores sintéticos (en azul) utilizados para producir "rapalogos".

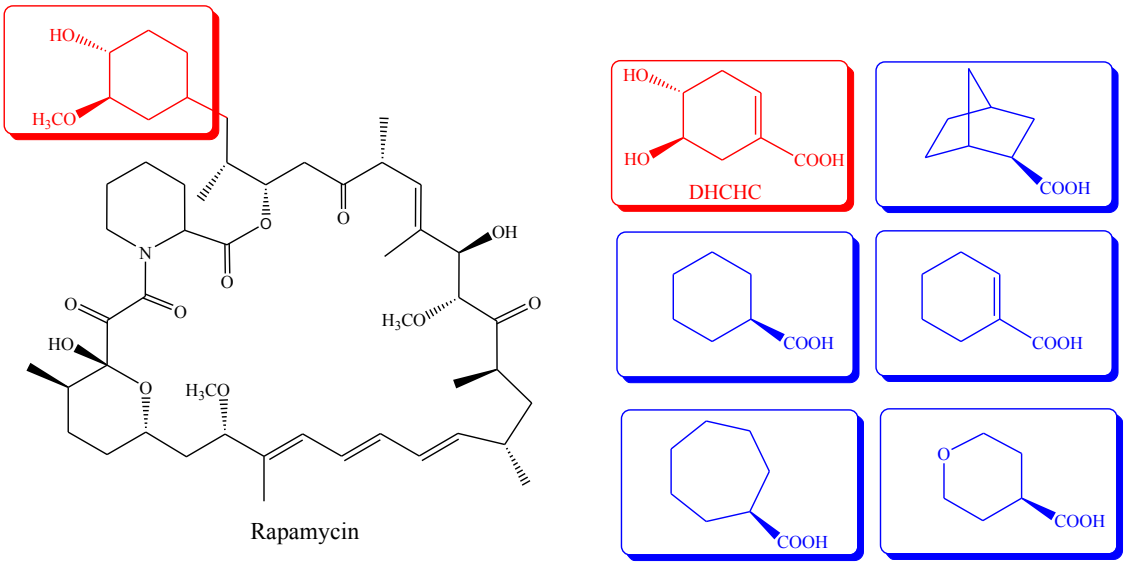


Figura 5.- Mutasíntesis aplicada a la producción de análogos de Rapamicina (Rapalogos).

3. MEJORA DE LAS LÍNEAS DE PRODUCCIÓN

Los genes que codifican a las enzimas involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios, frecuentemente se encuentran en los grupos que

contienen genes reguladores y resistentes, especialmente en actinomicetos. En el *Streptomyces coelicolor* (probablemente la especie más estudiada de actinomicetos hasta el momento y la primera cuyo genoma se secuenció en 2002), la expresión de varios grupos de genes biosintéticos depende de -al menos- 11 genes actuando también sobre otras funciones del metabolismo microbiano, incluyendo la morfología (12). Los genes reguladores de los hongos no parecen localizarse en el agrupamiento biosintético. La regulación de rutas biosintéticas que llevan a metabolitos secundarios es extremadamente complicada y está muy delicadamente ajustada; la ingeniería metabólica racional no se puede aplicar de forma sencilla. Las técnicas de mutagénesis para la mejora de líneas, la optimización del proceso biológico y la manipulación de genes o enzimas sencillos son los abordajes más eficaces todavía hoy en día para la sobreproducción de metabolitos secundarios.

Los programas clásicos que mejoran las líneas, han sido hasta este momento generalmente empíricos. Los agentes mutágenos más habituales son físicos (radiación UV, rayos X, rayos gamma) o químicos (N-metil-N'-nitroso guanidina, mostazas nitrogenadas). Este proceso requiere generalmente, que un gran número de colonias individuales se aíslen y examinen para la producción de metabolitos secundarios, y este proceso de barrido representa un cuello de botella en términos de tiempo y dinero, en estos programas de mejora de líneas. Recientemente, se ha utilizado una mutación sistemática del genoma de microorganismos utilizando inserciones trasposón u otros métodos de mutagénesis, dirigida a la localización para crear mutantes guiándose por el conocimiento de las rutas involucradas en la biosíntesis.

La tecnología genética se utiliza para obtener un perfil de producción ideal, por ejemplo para sobreexpresar los genes que llevan al producto deseado o inactivar genes que llevan a productos no deseados y mejorar la autoresistencia de la línea de producción, incrementando tanto estabilidad como la concentración de la molécula deseada.

El núcleo del proceso de fermentación consiste en una línea productiva estable capacitada con un alto rendimiento en la producción y un perfil ideal de

producción, lo cual facilita que el proceso de purificación sea sencillo. De hecho, se produce un retorno a un bajo nivel de producción cuando se asocia un cambio en la morfología debido a la corregulación de los genes involucrados en la diferenciación morfológica y del metabolismo secundario. En las líneas industriales, esto se conoce como degeneración de la línea, que consiste en cambios genéticos deletéreos de propiedades importantes tales como el rendimiento de metabolitos secundarios. La degeneración de la línea en *Streptomyces* es una faceta de la inestabilidad genética y plasticidad de su genoma (12,13). Por ejemplo en *S. rimosus* (productor de oxitetraciclina), aparecen las variantes sensibles a oxitetraciclina como resultado de grandes delecciones, que pueden eliminar todos los genes biosintéticos de oxitetraciclina (13). Debido a la diferenciación (especialmente morfológica) de las líneas productoras, es obligatorio estabilizar adecuadamente a los mejores productores y mantenerlos como bancos celulares.

Una manera de acortar el tiempo de desarrollo es integrando la mejora de líneas con el desarrollo de los procesos. Los procesos de desarrollo incluyen la optimización del medio, que es un paso clave, ya que las fuentes de carbono y nitrógeno afectan en gran medida el crecimiento y la producción de metabolitos (represión por metabolito); además, los recursos adecuados pueden mejorar la biosíntesis de un metabolito requerido y otros parámetros de la fermentación (pH, temperatura, oxígeno disuelto, etc.) también pueden afectar al crecimiento y a la estabilidad productiva y deben ser cuidadosamente controlados durante el escalado a los procesos productivos.

4. PERSPECTIVAS

La frecuencia con que se han descubierto nuevos metabolitos secundarios desde el descubrimiento de la penicilina, aumentó drásticamente al expandirse considerablemente el número de nuevos actinomicetos y de hongos filamentosos susceptibles de ser investigados, explorando la biodiversidad de fuentes microbianas disponibles tales como la mixobacteria y la cianobacteria y por una cuidadosa atención en las formulaciones del medio y los procesos fermentativos (7). Sin embargo, después de 60 años de continuas

mejoras, el descubrimiento de fármacos microbianos ha conocido un rendimiento decreciente en términos de inversiones y las grandes empresas farmacéuticas parecen estar reduciendo sus esfuerzos en el intento de descubrir nuevos metabolitos microbianos. La impresión que se tiene en el descubrimiento de nuevos fármacos microbianos es que se ha vuelto un suceso raro. Ello se debe a una combinación de factores: por ejemplo el énfasis en el modo de barrido - más adecuado para librerías químicas que para productos microbianos - no produjo la cantidad esperada de antibióticos en los últimos 20 años. Además, la secuenciación genómica de patógenos parece abrir la caja de Pandora al ofrecer una plétora de nuevos objetivos. Ello atrajo una enorme cantidad de inversiones de las compañías farmacéuticas, pero por una razón u otra, no produjo los resultados esperados en términos de nuevos quimiotipos que actúen sobre enfermedades emergentes. Revisiones recientes (7, 14) sugieren que un nuevo enfoque y una revitalización de nuevos fármacos de origen microbiano puede dar lugar a unos pocos pero profundos desarrollos, esto es:

- Mejorar las técnicas analíticas, como la UPLC-MS y LC-FT-MS, capaces de caracterizar pequeñas cantidades de compuestos a partir de muestras naturales complejas mínimas.
- Puesta a punto de métodos estadísticos y empíricos predictores del mejor medio productor de metabolitos secundarios.
- Mejora de las herramientas bioinformáticas que revelan como sólo una pequeña fracción de metaboloma potencial de los microorganismos finalmente se expresa.
- Elevada producción miniaturizada de fermentación y cribado
- Acceso a métodos moleculares rápidos y baratos de taxonomía microbiana.
- Elucidación de la genética subyacente a los agrupamientos de genes involucrados en las vías de síntesis de metabolitos secundarios, incluyendo la relación de genes “silentes” o “huérfanos” y las condiciones ambientales necesarias para su expresión real.

Una reciente estrategia prometedora es el descubrimiento o guiado por genoma de nuevos metabolitos basándose en el reconocimiento de genes típicamente silentes o crípticos para el metabolismo secundario, seguido por el uso de condiciones de cultivo poco habituales para inducir su expresión.

La secuenciación genómica de muchos productores industriales ha mostrado un mayor número de grupos de genes biosintéticos con el potencial productor de productos nuevos diferentes a los caracterizados en los extractos de las fermentaciones. En el *Streptomyces coelicolor*, aproximadamente unos 23 agrupamientos de genes -representando aproximadamente el 4,5% del genoma-, se han asignado a la producción de metabolitos secundarios, y sólo media docena de ellos han sido previamente identificados (12). Un potencial similar ha sido confirmado en otros actinomicetos “secuenciados”.

Como conclusión de esta primera parte general sobre la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico, merece la pena citar que desde 1980 la ingeniería genética ha expandido las aplicaciones industriales de los microorganismos para la producción de otra categoría de apreciados productos farmacéuticos, tales como proteínas humanas y terapéuticas, que no se contemplan en esta revisión. Utilizando tecnología recombinante del ADN, secuencias del ADN humano que codifican para diversas proteínas, se han incorporado a genomas de bacterias o de hongos. Gracias al crecimiento de estos microorganismos recombinantes en fermentadores, pueden producirse comercialmente a gran escala proteínas humanas y terapéuticas. La insulina humana, por ejemplo, se produce por una línea recombinante de *E. coli* y se comercializa como humulina. Otras líneas se utilizan para producir hormona de crecimiento humana recombinante, factor de necrosis tumoral, (TNF) interferón (interferón humano recombinante beta), e interleuquina2 (interleuquina recombinante humana-2).

5. ESTATINAS

Las estatinas se encuentran entre los fármacos más vendidos de origen natural (15, 16); en 2006, dos estatinas lideraron la clasificación de la revista

Forbes de los 20 fármacos más vendidos de América, con 8,4 y 4,4 billones de dólares de ventas anuales. Actualmente todo el mercado de las estatinas es de unos 15 billones de dólares (17). Las estatinas controlan los niveles de colesterol inhibiendo su biosíntesis a través de la interacción selectiva con la enzima 3-hydroxi-3-methylglutaryl CoA reductasa (HMG-CoA red) involucrada en un paso inicial de la síntesis de colesterol. Las estatinas reducen también el riesgo de morbilidad por enfermedad arterial coronaria y la muerte, en un elevado nivel de pacientes de riesgo. Las estatinas pueden producirse por fermentación, semisíntesis o síntesis química total. La primera estatina descubierta fue la Compactina (Mevastatina) producida por una línea del hongo *Penicillium citrinum* (18); como previamente se ha mencionado, unos pocos años más tarde se descubrió la Lovastatina en el caldo de cultivo de los hongos *Monascus purpureus* y *Aspergillus terreus*. Todas las estatinas fúngicas son lactonas sustituidas por hexahidronaftaleno (en rojo en la Figura 6) con una ruta biosintética poliquétido común.

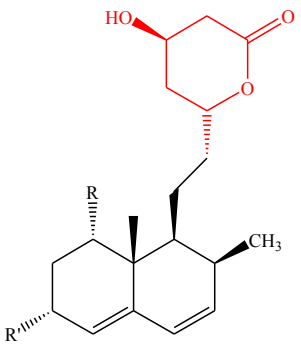
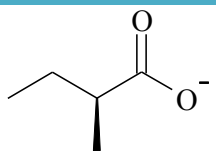
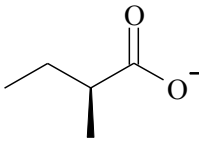
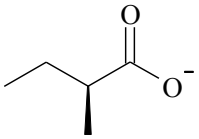
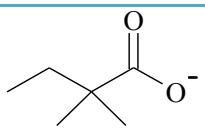
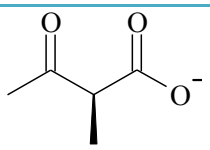
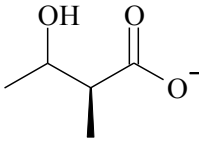


Figura 6.- Estructura general de las estatinas microbianas.

La lactona hexahidronaftaleno está en equilibrio con el hidroxiácido abierto, que es realmente el inhibidor isostérico de la HMGCoA reductasa (Figura 7); por lo tanto, las estatinas sintéticas se han obtenido directamente como hidroxiácidos. Debe señalarse, que las estatinas derivadas de la fermentación se obtienen preferentemente como lactonas debido a la mayor facilidad de extracción de los medios de cultivo acuosos utilizando disolventes hidrofóbicos orgánicos.

Tabla I.- Estructuras de estatinas naturales y sus derivados.

Estatina	R	R'
Lovastatina		CH_3
Mevastatina		H
Pravastatina		OH
Sinvastatina		CH_3
Monacolina J	OH	CH_3
Monacolina L	H	CH_3
Monacolina X		CH_3
Monacolina M		CH_3

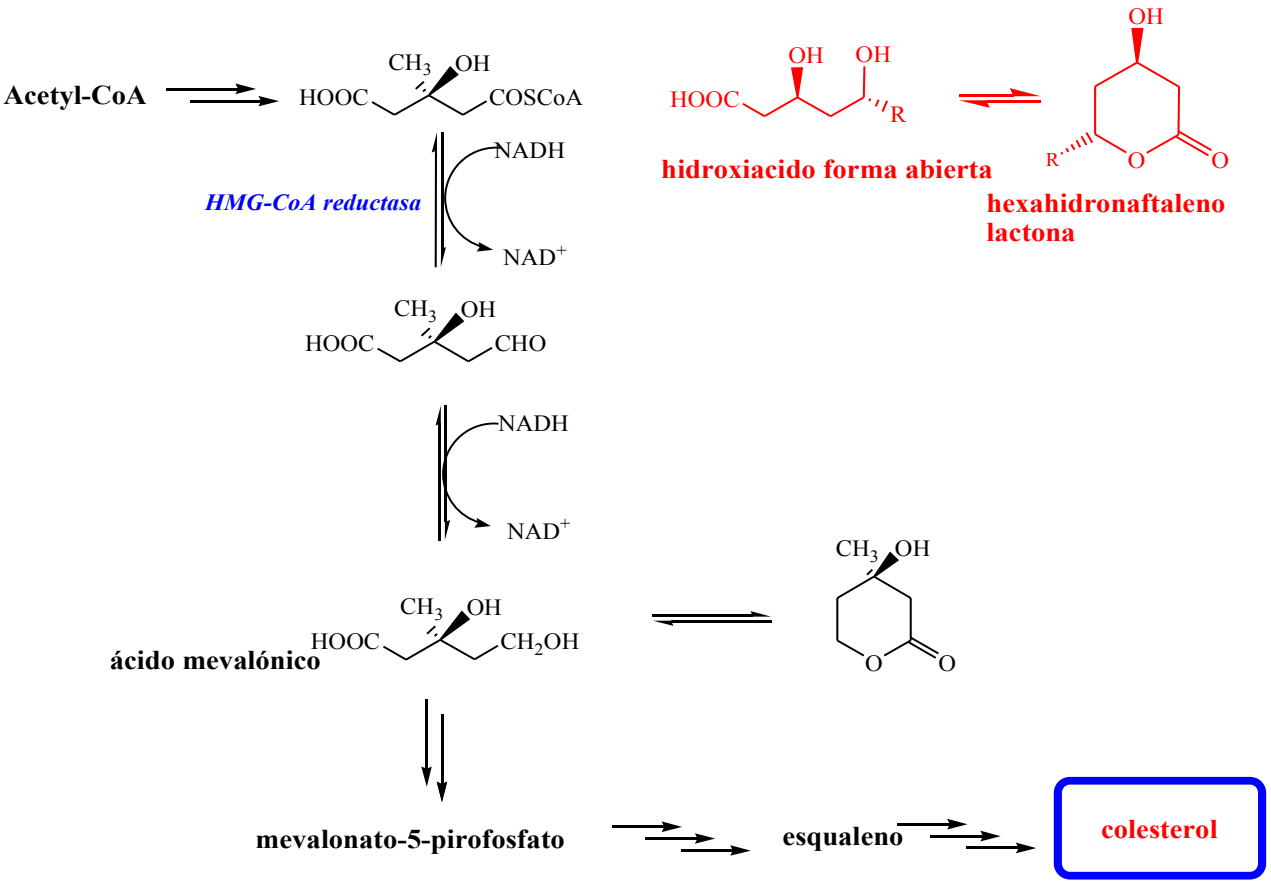


Figura 7.- Papel de las estatinas como inhibidoras de HMG-CoA reductasa en la biosíntesis de colesterol.

Estudios sobre la biosíntesis de poliquétido involucrado en la biosíntesis de la Lovastatina, mostraron que después de una elongación típica catalizada por una poliquétido sintasa tipo I (lovastatina nonaketido sintasa, LNKS), sucede una reacción infrecuente de Diels-Alder con formación de dos ciclohexanos fusionados, seguida por una elongación posterior y cierre del anillo de lactona produciendo la Dihidromonacolina L (Figura 8).

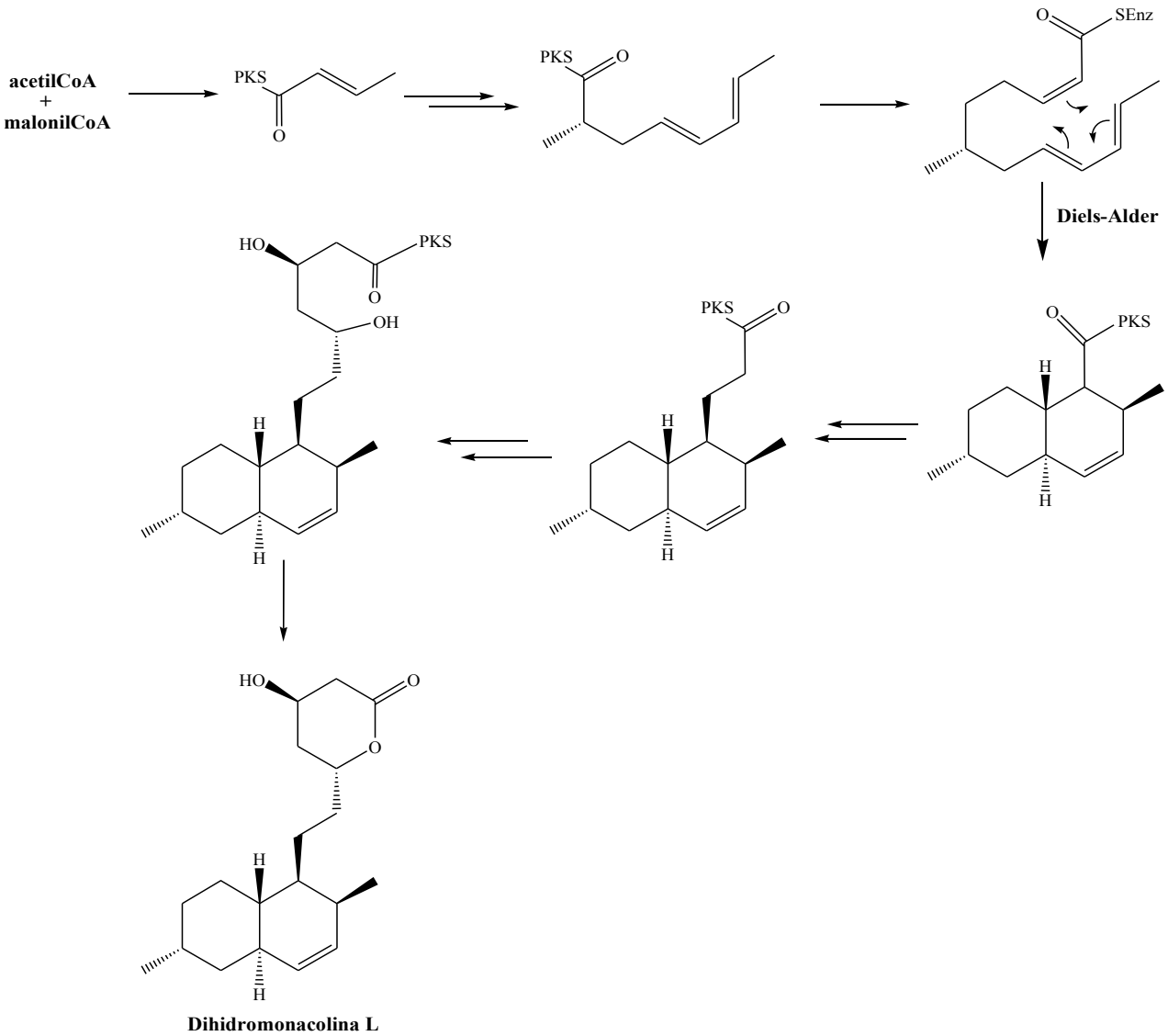


Figura 8.- Pasos iniciales en la biosíntesis de estatinas microbianas productoras de Dihidromonacolina L.

La Dihidromonacolina L, se modifica posteriormente con cuatro diseños, llegando a la Lovastatina final (Figura 9). El agrupamiento de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios se ha localizado en 18 supuestos marcos de lectura abiertos y la funcionalidad sencilla se ha asignado sobre la base de homología de secuencia; la mayoría de los dominios examinados pueden expresarse como proteínas individuales, excepto el dominio KS. El conocimiento de esto es importante para la mejora de las líneas genéticas, y también para las mutasíntesis propuestas para la producción de diferentes estatinas.

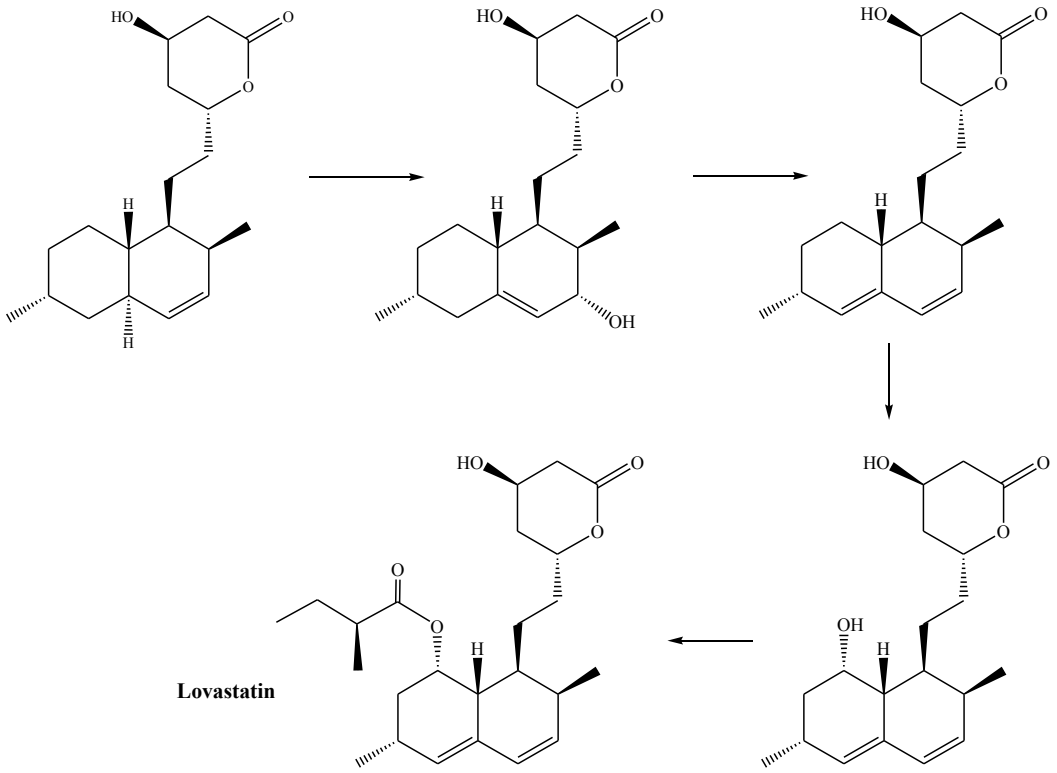
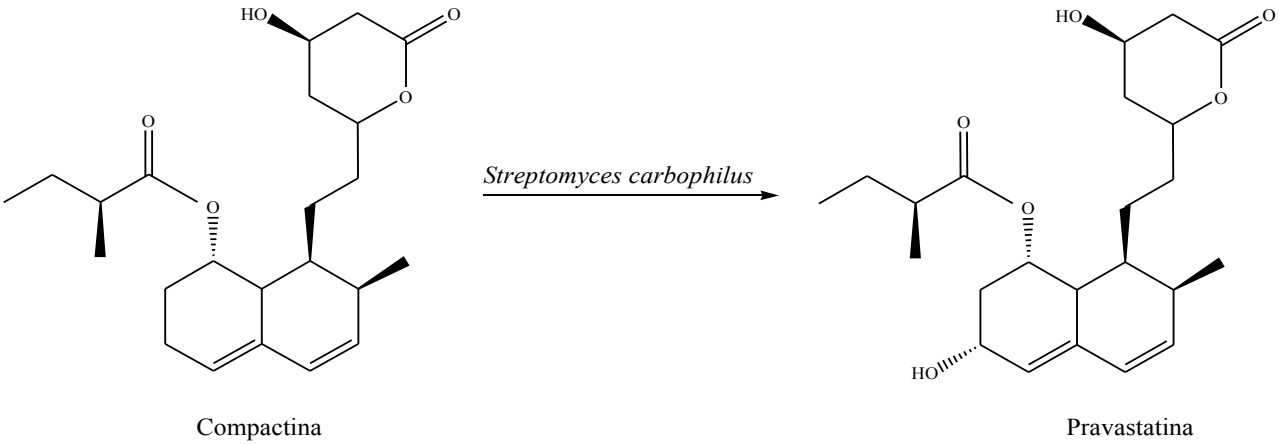


Figura 9.- Pasos de "Diseño" en la biosíntesis de Lovastatina en *Monascus purpureus*.

La producción comercial de la Lobastatina se basa en una *A. terreus* mutagenizada. La fermentación se lleva a cabo generalmente con adición en tandas de lactosa o glicerol, disminuyendo así el efecto de la represión por catabolito sobre la biosíntesis de poliquétido. Es obligatorio el control del pH y de los niveles de oxígeno. El efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre los parámetros de la fermentación en la producción de la Lovastatina han sido recientemente revisados (19). La Lovastatina ha sido también producida utilizando fermentaciones sobre sustratos sólido (SSF); La Biocon India Ltd. produce Lovastatina utilizando SSF sobre sustratos naturales sólidos cultivando *A. terreus* sobre SSF de salvado de trigo (20).

La Compactina se produce por fermentación utilizando *Penicillium citrinum*, pero no se utiliza como un producto farmacéutico final, siendo un intermedio importante para la producción de la Provastatina que es un derivado

más activo (Figura 10).



Compactina Pravastatina

Figura 10.- Biotransformación (hidroxilación) de Compactina a Pravastatina por *S. carbophilus*.

La Pravastatina, se produce normalmente por biotransformación de la Compactina; la hidroxilación de Compactina se cataliza por una P450-monooxigenasa ligada a micelio utilizando *Streptomyces carbophilus* (21), pero también ha sido desarrollada una producción en un solo paso de Pravastatina por transformación de la línea de *P. citrinum* con el gen de monooxigenasa de *S. carbophilus* (22). La Simvastatina se prepara tradicionalmente químicamente, por alquilación de la Lovastatina, comercializada bajo varios nombres registrados (Zocor, Simlup, Simcard, Simvacor). La Lovastatina ha sido el fármaco más vendido desde 1998 hasta 2001, antes de la llegada de la Atorvastatina, que representa una nueva generación de estatinas sintéticas (23).

6. ANTIBIÓTICOS ANTIBACTERIANOS

El término antibiótico se introdujo por Waksman como "una sustancia química de origen microbiano que posee actividad antimicrobiana". Los antibióticos, por lo tanto, incluyen un extenso grupo de compuestos antimicrobianos, utilizados para tratar infecciones causadas por otros

organismos, incluyendo los hongos y los protozoos. Berdy recientemente ha discutido esta definición y llegó a la conclusión de que " el término antibiótico es más o menos un concepto arcaico, pero todavía está por inventarse un término que sea similar, simple y expresivo. Lo utilizamos porque no hemos encontrado otro mejor" (6). Un antibiótico ahora, no sólo es una molécula orgánica de bajo peso molecular activa como antimicrobiano a bajas concentraciones y producida por microorganismos, sino también un antimicrobiano obtenido después de modificaciones de productos naturales e incluso por síntesis total. El término “antibiótico” se utiliza a menudo como “antibacteriano”, restringiendo así la actividad hacia las actividades bacteriostáticas o bactericidas.

Los antibacterianos se han clasificado siguiendo diferentes criterios, tales como:

- Estructura química
- Modo de acción
- Productores microbianos
- Espectro antimicrobiano
- Modo de producción

Tabla II.- Informe de las estructuras químicas, el modo de acción y los microorganismos productores de las principales clases de antibióticos microbianos comercializados.

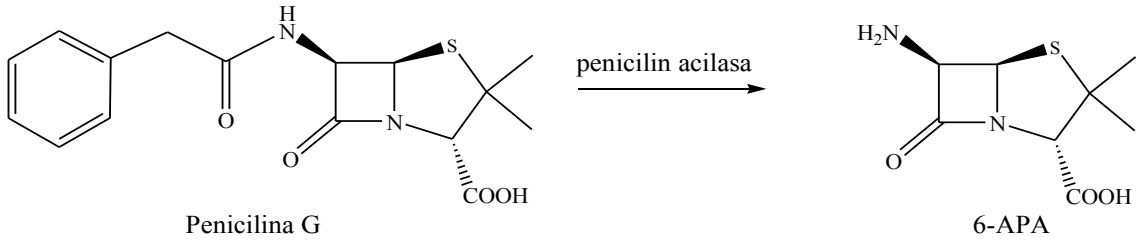
Estructura Química	Modo de acción	Ejemplos	Productores
Aminoglicósidos	Inhibición de la síntesis proteica	Gentamicina Kanamicina	*Micromonospora* spp. *Streptomyces kanamyceticus*
Carbapenems	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano	Tienamicina	*Streptomyces cattleya*
Cefalosporinas	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano	Cefalexina Cefaclor Cefdinir Cefepima	*Cephalosporium acremonium*
Glicopéptidos	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano	Vancomicina Teicoplanina	*Amycolatopsis orientalis* *Actinoplanes teichomyceticus*
Macrólidos	Inhibición de la síntesis proteica	Eritromicina	*Saccharopolyspora erythraea*
Penicilinas	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano	Amoxicilina Ampicilina	*Penicillium notatum/chrysogenum*
Polipéptidos	Interferencia con los componentes de membrana	Bacitracina	*Bacillus subtilis*
Tetraciclinas	Inhibición de la síntesis proteica	Aureomicina Oxitetraciclina	*Streptomyces aureofaciens* *Streptomyces rimosus*
Ansamicinas	Inhibición de la transcripción de RNA	Rifamicina	*Amycolatopsis mediterranei*

La investigación antibacteriana desde el descubrimiento de Fleming de la penicilina ha sido fructífera y una aventura del desarrollo variable permanente. Después del aislamiento de la penicilina G, la mayoría de los químicos pensaban que las penicilinas podían producirse fácilmente por síntesis química total, pero este abordaje nunca ha sido comercialmente viable y las tecnologías de fermentación para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos derivó como un asunto principal en la industria farmacéutica. El interés hacia este campo, produjo algunas acciones cíclicas y evolucionó alrededor de las mudables necesidades clínicas y nuevas tecnologías permisivas. Hoy en día, los antimicrobianos individuales con un mercado por encima del billón de dólares incluyen la Augmentina -una combinación de penicilina semisintética y del inhibidor de la beta-lactamasa Ácido Clavulánico-, la quinolona sintética Ciprofloxacina (1,8 billones de dólares) y la Levofloxacina/Ofloxacina (1,1 billones de dólares); las eritromicinas semisintéticas Azitromicina (1,5 billones de dólares) y Claritromicina (1,2 billones de dólares) y la cefalosporina semisintética Ceftriazona (1,1 billones de dólares) (1). En los últimos años, el mercado global de las sustancias farmacéuticas antibacterianas ha sufrido un desplazamiento considerable en ventas desde productos de marca hacia los genéricos, causando la caída de beneficios, pero un informe (24) prevé una recuperación mantenida y un crecimiento de más de 25 billones de dólares en el 2011.

La historia de las penicilinas, demuestra la importancia de disponer de una estructura química básica producida por fermentación, con una actividad antibiótica básica, que pueda ser mejorada más allá por la química médica clásica. El reconocimiento del valor quimioterapéutico de las penicilinas durante los primeros días de la segunda guerra mundial disparó la búsqueda mundial de la creación de nuevas penicilinas por derivatización.

Los hongos productores, incorporan ácidos carboxílicos exógenos a la penicilina durante la fermentación, así como en la producción de penicilina G la adición de ácido fenilacético al medio de fermentación permite la acumulación del metabolito deseado como producto mayoritario. Se han hecho muchos esfuerzos para generalizar esta aproximación, pero con escaso éxito, por

ejemplo la producción de *p*-nitrobencilpenicilina por adición del precursor N[-*p*-nitrofenilacetil]-DL-valina en *Penicillium notatum* en condiciones óptimas sólo permite una recuperación del 38% de *p*-nitrobencilpenicilina. Una ruta mucho más versátil para obtener penicilinas semisintéticas estuvo disponible en 1957, después del descubrimiento del 6- ácido aminopenicilánico (6-APA, Figura 11) en fermentaciones de *Pencillium chrysogenum* sin adición de ácido fenilacético; la 6-APA es químicamente o enzimáticamente fácilmente re-acilada con ácidos carboxílicos activados. Posteriormente, se ha desarrollado un método industrial para la des-acilación de penicilina G utilizando penicilina acilasa inmovilizada de *Escherichia coli*. Estos hallazgos abren la vía para la preparación efectiva de numerosos y novedosos derivados de penicilina (25).



Penicilina G 6-APA

Figura 11.- Desacilación enzimática de Penicilina G en la producción de 6-APA.

Las cefalosporinas han seguido desarrollos similares, aunque la desacilación de cefalosporina C obtenida por fermentación, se lleva a cabo industrialmente utilizando dos enzimas y sólo recientemente, una enzima artificial se ha desarrollado para llevar a cabo la desacilación de cefalosporina G dando el ácido 7-Aminocefalosporánico (7-ACA) en un paso (26). La derivatización química del 6-APA y 7-ACA ha dado como resultado el desarrollo de cinco generaciones de penicilinas y cuatro generaciones de cefalosporinas.

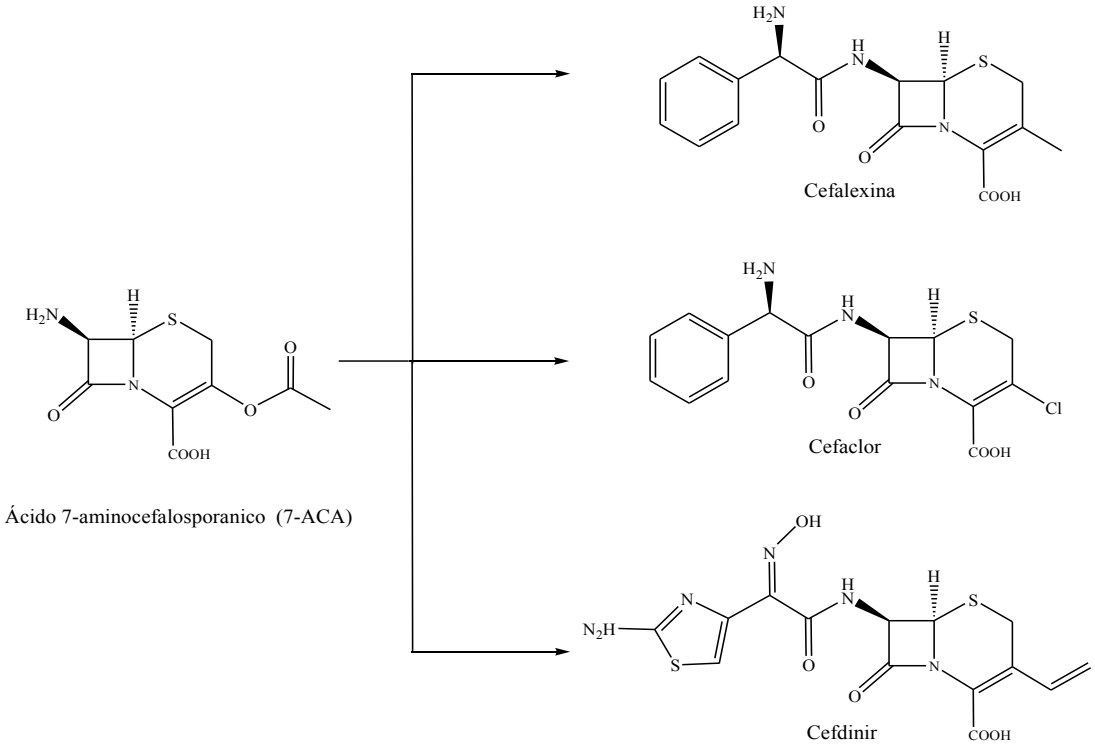


Figura 12.- Cefalosporinas semisintéticas obtenidas por modificación de 7-ACA.

En 1943 fue aislado el primer antibiótico antituberculoso (estreptomicina) proveniente del filtrado del cultivo de *Streptomyces griseus* (Figura 13).

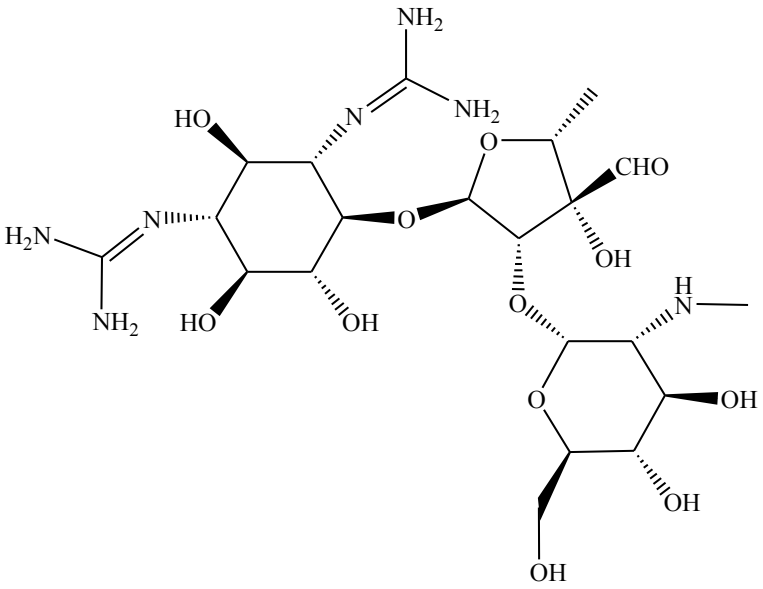


Figura 13.- Estreptomicina producida por *Streptomyces griseus*.

Después del descubrimiento de la penicilina en cefalosporinas a partir de hongos filamentosos y siguiendo el aislamiento de la estreptomicina, casi todos

los antibióticos sucesivamente descubiertos fueron principalmente aislados de especies de *Streptomyces,* así como actinomicetos relacionados, representando entre el 70 y 80% de todos los compuestos aislados. La mayoría de los agentes antibacterianos que se utilizan actualmente en clínica (tetraciclinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, macrólidos) fueron descubiertos durante la " era dorada" de los antibióticos en los años cuarenta y sesenta a través de procesos de aislamiento en masa y búsqueda de los actinomicetos del suelo y de los hongos. Parecía que los principales problemas de la quimioterapia con antibióticos se habían resuelto. Desde los 60 a los 80 los mayores esfuerzos farmacéuticos se dirigieron hacia la mejora incremental de los quimiotipos existentes mediante la química médica, incrementando la potencia, estabilidad, y farmacocinética o reduciendo las reacciones adversas. Lo que al principio era difícil de predecir hoy en día está ampliamente aceptado y es que los patógenos bacterianos están siempre evolucionando para volverse resistentes al amplio arsenal de antibióticos de utilidad clínica. Como resultado de la transferencia de genes en horizontal y múltiples determinantes de resistencia bajo la presión selectiva ejercida por la utilización masiva y abuso de antibióticos en clínica y el entorno, muchos patógenos han adquirido genes de resistencia volviéndose insensibles a la mayoría de las diferentes clases de antibióticos conocidos. Ello implica, que la terapéutica médica necesita constantemente nuevos antibióticos debido a la expansión de la población en pacientes de riesgo y a la creciente prevalencia de patógenos resistentes en las infecciones hospitalarias o adquiridas en la sociedad (27).

Un trabajo pionero acerca de la susceptibilidad bacteriana y la resistencia a antibióticos considera la actividad de las tetraciclinas. La Aureomicina (Clorotetraciclina, Figura 14) producida por *Streptomyces aureofaciens* fue la primera tetraciclina descubierta a finales de los 40. Otras tetraciclinas fueron identificadas más tarde, ya sea como moléculas naturales, p.e., oxitetraciclina a partir del *S. rimosus* o Tetraciclina del *S. aureofaciens* (Figura 14). Los antimicrobianos de la clase de las tetraciclinas presentan un amplio espectro de actividad frente a numerosos patógenos, incluyendo grampositivos y gramnegativos, así como organismos atípicos.

Estos compuestos son bacterioestáticos, y actúan por unión a la subunidad 30S ribosomal e inhibición de la síntesis proteica. Las tetraciclinas han sido inicialmente utilizadas satisfactoriamente para el tratamiento de una variedad de enfermedades infecciosas que incluyen infecciones adquiridas en sociedad (por contagio) del tracto respiratorio y enfermedades de transmisión sexual, así como en el tratamiento del acné. El uso de tetraciclinas para el tratamiento o infecciones bacterianas ha estado limitado desde entonces, debido a la emergencia de organismos resistentes con mecanismos de resistencia por eflujo y protección ribosomal.

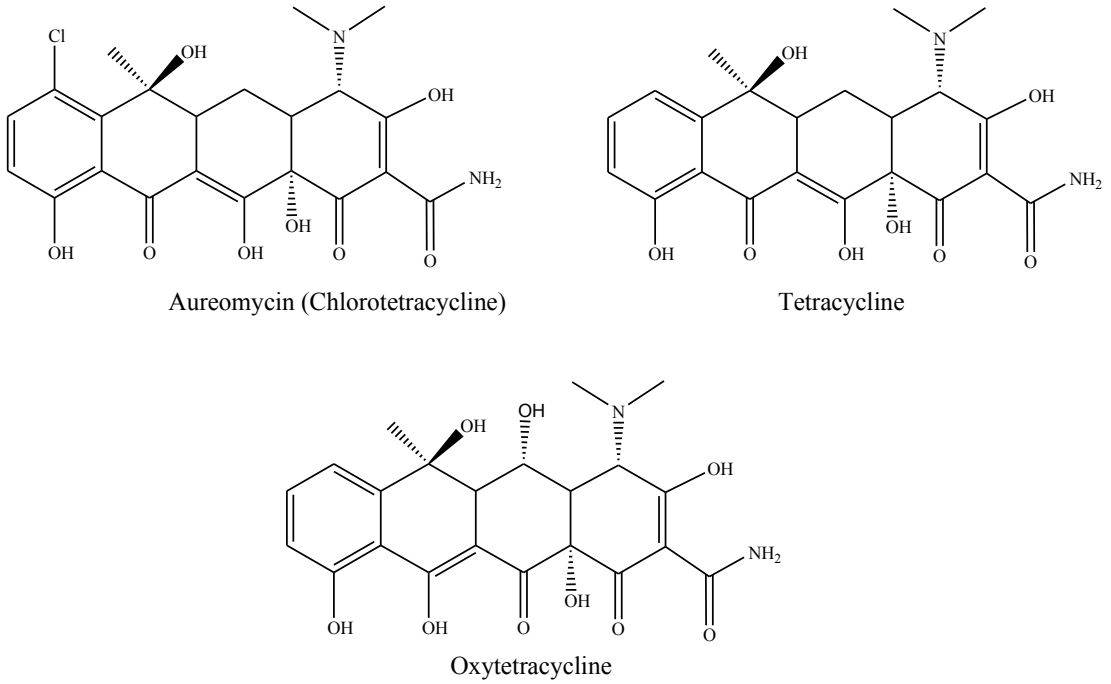


Figura 14.- Tetraciclinas producidas por fermentación.

Franklin en los setenta, demostró que las bacterias pueden acumular tetraciclina en contra del gradiente de concentración y que esta captación activa es importante para la selectividad de la actividad del antimicrobiano (28); siguiendo estas evidencias, se ha demostrado que una línea resistente a la tetraciclina portadora del factor R de *Escherichia coli* producía una reducción importante en la captación de tetraciclina inducida por el mismo antibiótico; después de unos años, se caracterizó un factor R mutante que proporcionaba resistencia a la tetraciclina. Este fue el primer ejemplo de estudios detallados concernientes a los mecanismos y bases genéticas de la resistencia inducible

en bacterias.

La investigación para encontrar tetraciclinas análogas que eviten estos mecanismos de resistencia ha llevado al desarrollo de tetraciclinas semisintéticas. La Minociclina es una tetraciclina semisintética de segunda generación. La Minociclina es mucho más activa frente a estafilococos que las tetraciclinas originales. Mejoras posteriores se alcanzaron con el desarrollo de glicilciclinas (29). La más avanzada glicilciclina es el derivado 9-*tert*-butyl-*g*lycylamido de Minociclina, conocida también como Tigeciclina, introducida en la práctica clínica en 2005 (Figura 15). Las glicilciclinas muestran actividades antibacterianas típicas de las primeras tetraciclinas, pero con una actividad de mayor potencia frente a organismos resistentes a tetraciclina. Las glicilciclinas son activas frente a otros patógenos resistentes incluyendo a estafilococos resistentes a meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina y enterococos resistentes a vancomicina.

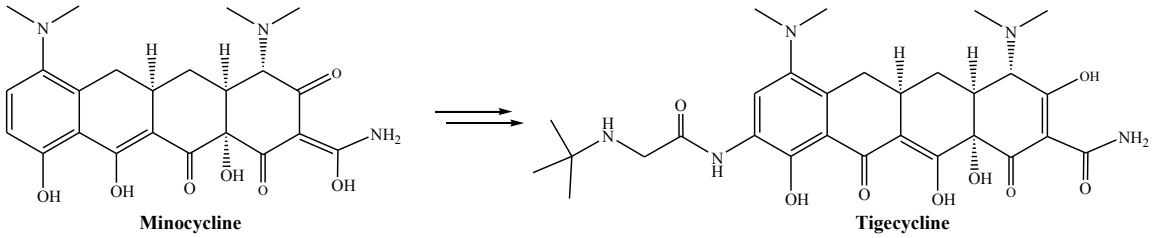
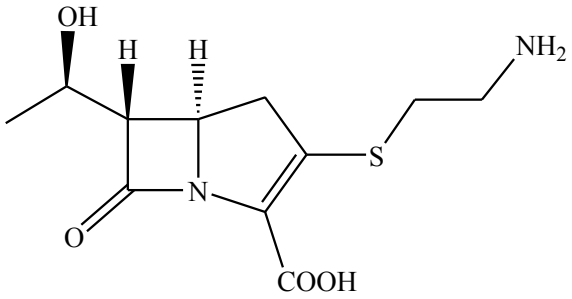


Figura 15.- Tetraciclinas semisintéticas: Tigeciclina derivada de Minociclina

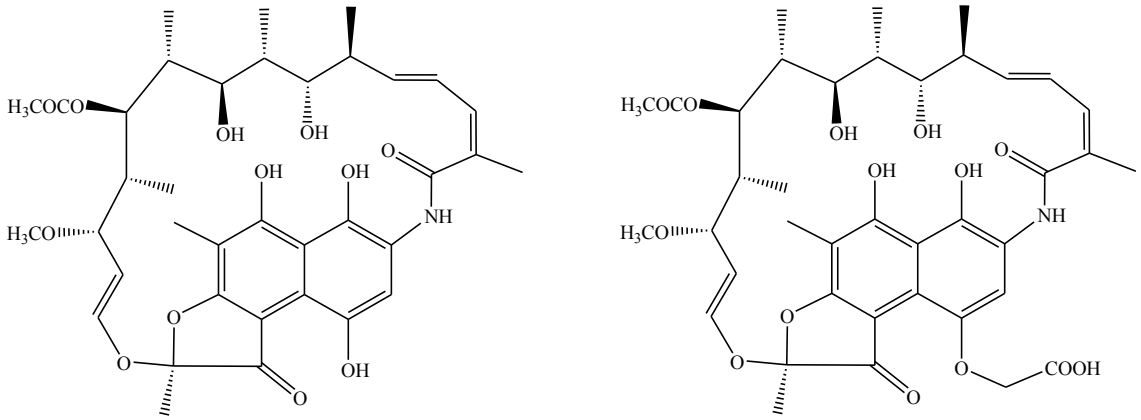
Otro hito en el desarrollo de antibióticos se alcanzó con el descubrimiento en 1976 de Tienamicina en caldos de cultivo del *Streptomyces cattleya* (30). La Tienamicina (Figura 16) mostraba una actividad de amplio espectro, la cual estimulaba el interés hacia los llamados carbapenems, pero sus aplicaciones fueron desechadas por su pobre estabilidad tanto química como *in vivo*. La elucidación de la estructura de la Tienamicina llevó a dedicar esfuerzos en la síntesis para la producción de dos generaciones de carbapenems con actividad antibacteriana mejorada y alta estabilidad *in vivo.*



Thienamycin

Figura 16.- Tienamicina producida por *Streptomyces cattleya*.

Las Ansamicinas también han tenido un importante impacto en la historia de los antibióticos, al ser una clase de antibacterianos selectivos capaces de inhibir la RNA-polimerasa. La Rifamicina se descubrió en el cultivo del *Amycolatopsis mediterranei* (anteriormente *Nocardia mediterranei*) en los laboratorios Lepetit de Italia. La Rifamicina se produjo originariamente como un complejo de cinco moléculas relacionadas estructuralmente (Rifamicinas A-E). Aunque las Rifamicinas C y D resultaron más bioactivas, la Rifamicina B fue la que se desarrolló, debido a su mayor estabilidad, fácil recuperación y solubilidad a pH fisiológico. Los estudios de bioactividad, mostraron que realmente la molécula bioactiva fue principalmente la Rifamicina SV, siendo esta un precursor de la Rifamicina B en la ruta biosintética microbiana. Los mutantes del producto original hicieron posible la producción de la Rifamicina SV por fermentación (31).



Rifamycin SV Rifamycin B

Figura 17.- Rifamicinas producidas por Amycolatopsis mediterranei.

La aparición y posterior difusión de resistencia a los antibióticos entre las bacterias grampositivas, especialmente enterococos y estafilococos, ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos, en concreto glicopéptidos. Una crucial difusión comenzó en los primeros años de los 80 en hospitales americanos con el incremento de la difusión de clones virulentos de *Staphylococcus aureus* (MRSA) mundialmente resistentes a meticilina y aún continúa en nuestros días.

La Meticilina es una penicilina semisintética resistente a penicilinasas MRSA, pero se han desarrollado resistencias a ella por modificación del antibiótico diana ya que las bacterias MRSA expresan una transpeptidasa con baja afinidad para β -lactámicos. Alternativamente a los β-lactámicos, otros antibacterianos que inhiben dianas moleculares diferentes a la síntesis de la pared celular, se han utilizado frente a las infecciones MRSA.

Ejemplos de expuesto lo constituyen las tetraciclinas, eritromicina, aminoglucósidos, que tienen como objetivo la síntesis proteica, y más recientemente los inhibidores del ADN pertenecientes a las fluoroquinolonas. Sin embargo, muchos MRSA han adquirido genes de resistencia volviéndose insensibles a casi todos los antibióticos conocidos. La Vancomicina (Figura 18) se ha utilizado durante más de 3 décadas para tratar infecciones serias de MRSA (32).

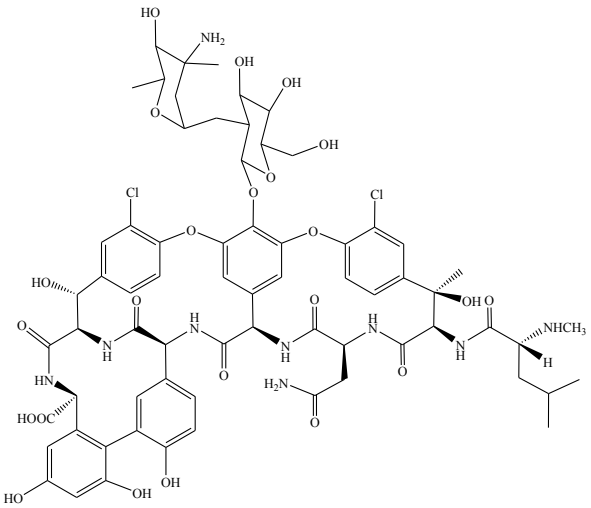


Figura 18.- Vancomicina producida por Amycolatopsis orientalis.

Su glicopeptido hermano el antibiótico Teicoplanina aislado del caldo de fermentación de *Actinoplanes teichomyceticus,* se ha introducido en clínica en Europa desde 1988 y muestra más actividad que la vancomicina frente a grampositivos resistentes, probablemente debido a la naturaleza lipofílica de su cadena acilada, la cual sitúa mejor la molécula en el sitio acción (Fig. 19) (33, 34).

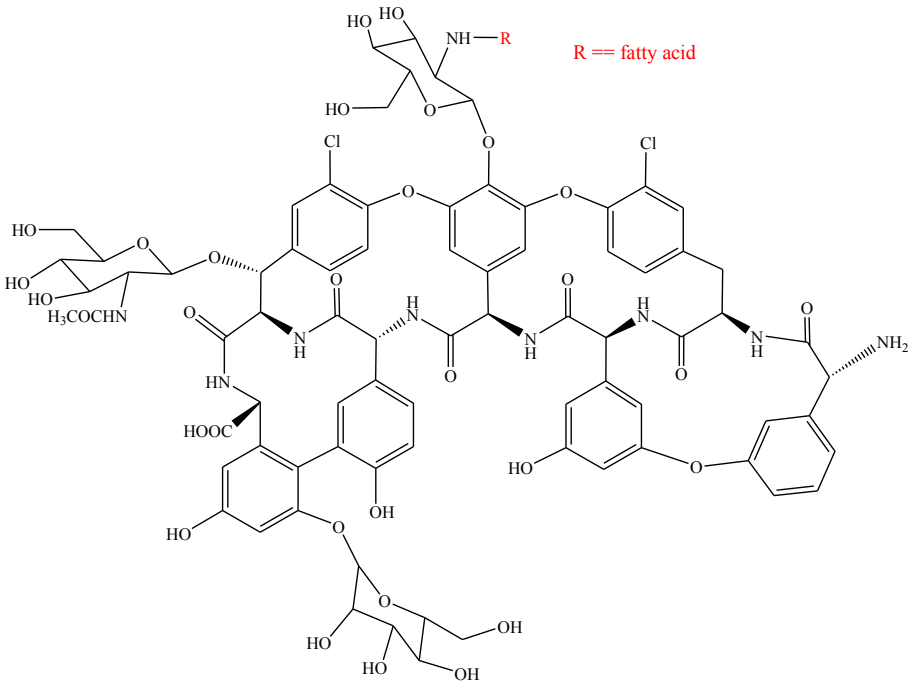


Figura 19.- Teicoplanina producida por *Actinoplanes teichomyceticus*.

Desafortunadamente, han surgido resistencias a la vancomicina y teicoplanina en enterococos y más recientemente en MRSA aislados clínicamente en pacientes de hospitales de los Estados Unidos. Esta alarma se ha tomado seriamente por las autoridades sanitarias porque los glicopéptidos fueron considerados las únicas armas disponibles frente a estas líneas. Tres nuevos lipoglicopéptidos están en diferentes fases de desarrollo clínico: Dalbavancina, Oritavancina, y Telavancina (35) y se están llevando a cabo extensos trabajos realizando modificaciones estructurales de antibióticos glicopéptidos para obtener moléculas con actividades mejoradas.

Las transformaciones por medios químicos o enzimáticos se han puesto a punto para modificar la composición del azúcar, modificar un único grupo funcional, alterando el bolsillo de unión y reemplazando los ácidos grasos

originales con otros nuevos (36, 37).

La Daptomicina (Figura 20) es uno de los pocos antibióticos que han sido lanzados recientemente que pertenecen a una nueva clase química y muestra un mecanismo de acción nuevo capaz de sobreponerse a los mecanismos de resistencias frente a las clases conocidas de antibióticos. La Daptomicina es un antibiótico lipopéptido producido por *Streptomyces roseosporus* y utilizado en el tratamiento de infecciones causadas por los microorganismos grampositivos (38). Fue descubierto por Eli Lilly en los primeros años de los 80, pero se pensó que era demasiado tóxico para uso humano. Se licenció a Cubist Pharmaceuticals Inc. en 1997 y fue aprobado por la FDA en 2003.

Tiene un mecanismo de acción único, ya que se une irreversiblemente a la membrana celular de la bacteria, desorganizando sus funciones celulares y causando la muerte. La Daptomicina induce una pérdida del potencial de membrana que lleva a la inhibición de la síntesis proteica y del ADN y ARN. El conocimiento del grupo de genes biosintéticos y su expresión heteróloga en hospedadores más fáciles de manipular genéticamente ha permitido un desarrollo prolífico de los descubrimientos sobre las relaciones estructura actividad y la producción de derivados de interés.

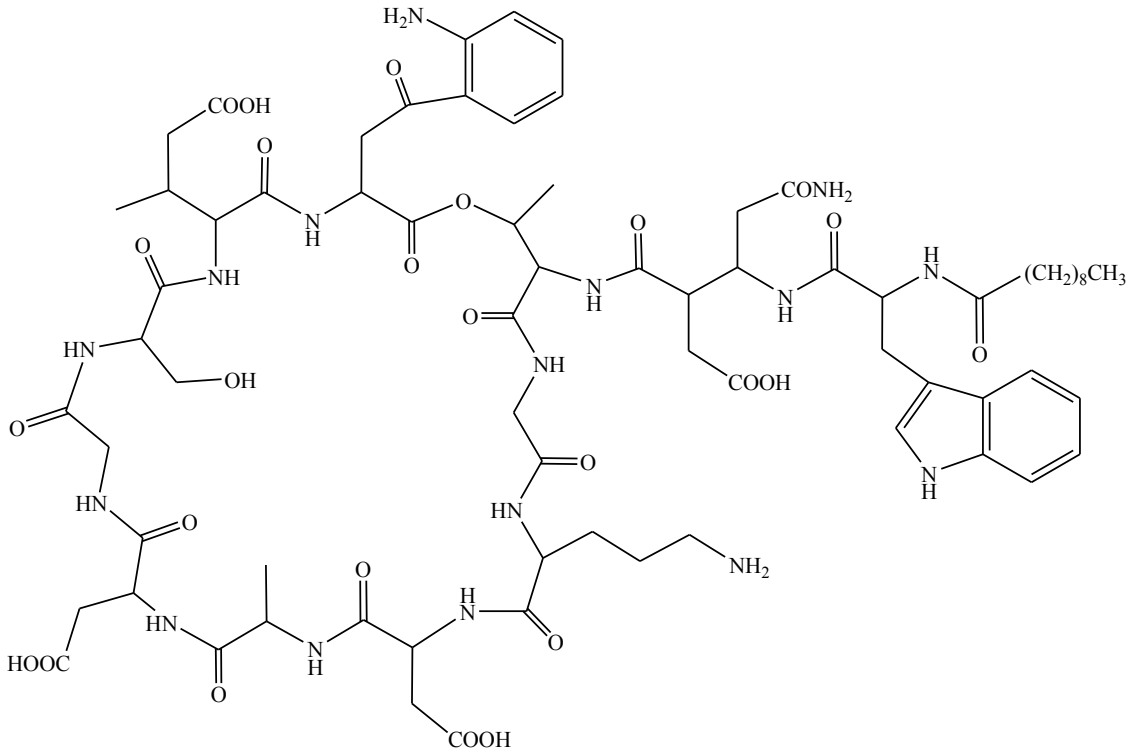


Figura 20.- Daptomicina producida por Streptomyces roseosporus.

7. ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS

Las infecciones fúngicas son un problema creciente hoy en día: la candidiasis representa el 80% de las infecciones fúngicas hospitalarias y las tasas de mortalidad asociadas con candidiasis invasivas pueden alcanzar hasta el 50% incluso con tratamiento. También hay un incremento de la incidencia de aspergilosis, especialmente en los pacientes inmunocomprometidos (SIDA, quimioterapia del cáncer, trasplantes). La *Pneumocystis carinii* causa neumonía que es la causa principal de muerte en pacientes con SIDA. El mercado de prescripción actual de las infecciones fúngicas invasivas se estima en una valoración de casi seis billones de dólares para el 2014, motivada principalmente por la epidemia del SIDA y por las quimioterapias del cáncer o por terapias inmunosupresoras, en las que los patógenos fúngicos oportunistas causan un gran porcentaje de infecciones y muertes (39). Los tratamientos establecidos incluyen los azoles sintéticos o los polienos naturales (anfotericina B producida por *Streptomyces nodosus*) pero su uso está limitado, principalmente por el desarrollo de resistencias a los primeros y la toxicidad de

los segundos. La introducción de la clase de equinocandinas ha sido un acontecimiento clave en la última década. Sólo dos clases nuevas de antibióticos, que fueron descubiertos entre los 70 y los 80 se han lanzado desde el 2000: el antibacteriano lipopéptido daptomicina que se ha citado antes, y la familia fúngica, de equinocandinas/pneumocandinas de lipopéptido cíclicos, que bloquean selectivamente la biosíntesis fúngica de la pared celular. La Caspofungina, anidulafungina y micafungina son derivados semisintéticos de metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus nidulans,* y hongos similares (3, 40).

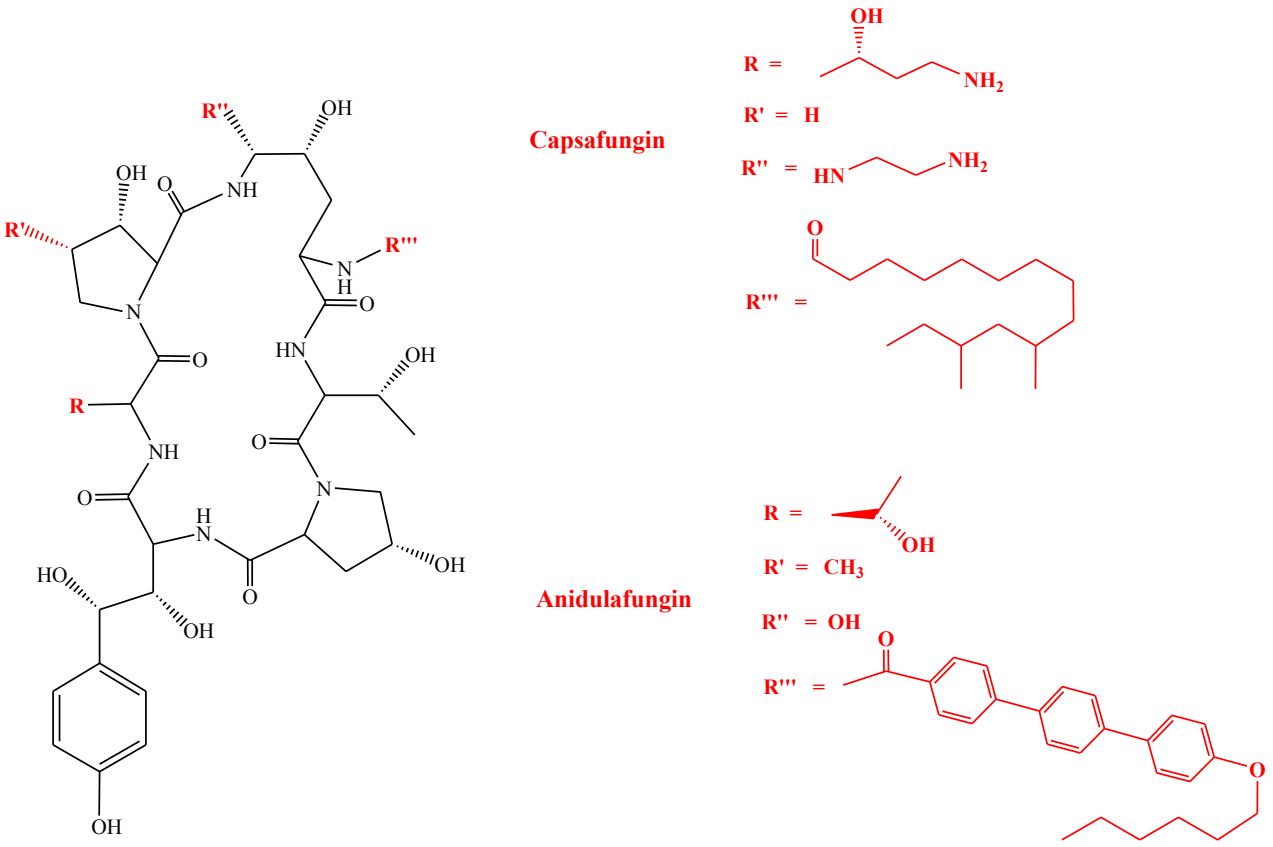


Figura 21.- Caspofungina y anidulafungina lanzadas como Cancidas (2001) y Ecalta (2006) de Merck y Pfizer, respectivamente.

8. ANTIBIÓTICOS ANTITUMORALES

Más del 60% de los fármacos aprobados consistentes en una molécula pequeña utilizados como antibióticos antitumorales son productos naturales o bien derivados de productos naturales. Actualmente, más de 30 compuestos de

origen microbiano están en diversos estados de desarrollo clínico como agentes anti cancerígenos (7, 41).

Los antibióticos antitumorales cuyo objetivo es el ADN poseen una marcada actividad antimicrobiana y tienen la función común de ser agentes tóxicos que dañan el ADN. Estas moléculas (Mitomicinas, Bleomicinas, Actinomicinas, Anthraciclinas, Pentostatina, Enediinas) son producidas por actinomicetos, principalmente líneas de *Streptomyces*. Los nuevos derivados necesitan sobreponerse a los mecanismos de resistencia de las células tumorales tales como la activación del fármaco, el eflujo incrementado del fármaco, y sistemas mejorados de reparación del ADN.

El primer fármaco anticancerígeno aprobado por la FDA fue Mitomicina C (aislada en 1956 de *Streptomyces caespitosus*, Figura 22*)* que demostró ser un potente antibacteriano perteneciente a la familia de las quinonas antitumorales (42).

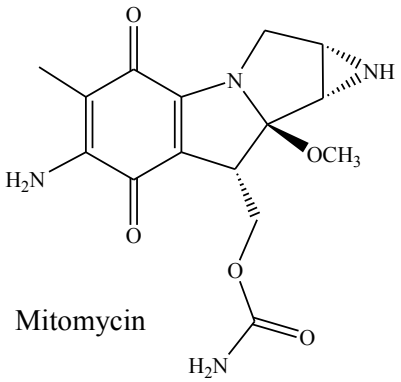


Figura 22.- Mitomicina C producida por *Streptomyces caespitosus*.

Estudios realizados sobre el precursor mostraron que el derivado del ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico (AHBA) fue sintetizado a través de una variante de la ruta del shikimato (43). La manipulación objetiva de supuestas rutas reguladoras del grupo de genes biosintéticos de la mitomicina llevó a un sustancial incremento en la producción del fármaco.

Las Bleomicinas (Figura 23) son una familia de antibióticos derivados de glicopéptidos aislados de diversas especies de *Streptomyces* sp. (44); son

metabolitos secundarios del péptido poliquétido y fueron introducidos en clínica en 1966 como una mezcla de Bleomicina A2 y B2.

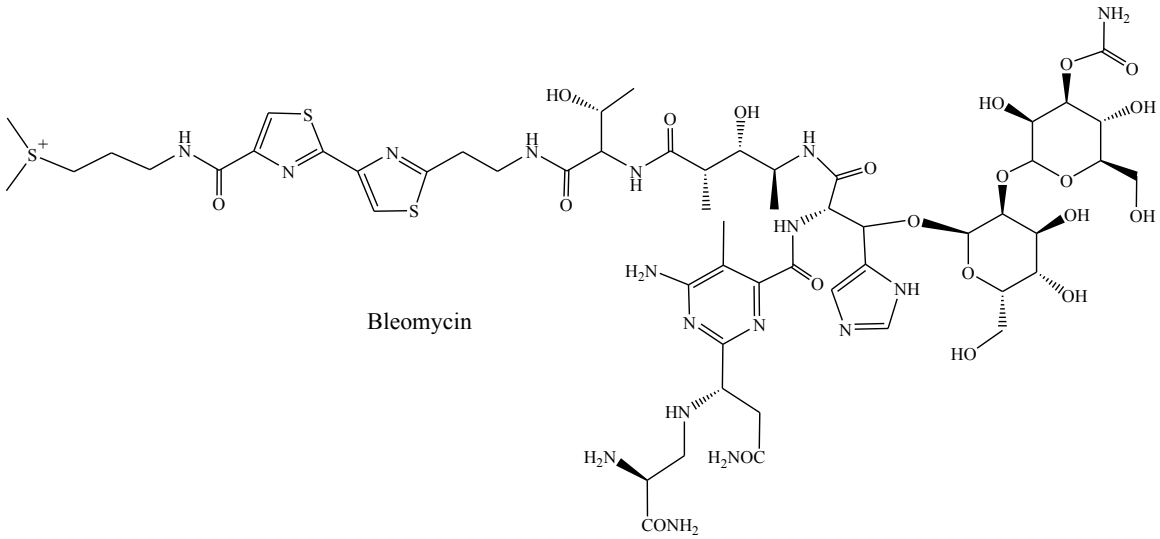


Figura 23.- Bleomicina producida por Strepto*myces verticillus*.

A diferencia de la mayoría de los fármacos anticancerígenos, no causan mielosupresión, promoviendo su aplicación ampliamente, en combinación con la quimioterapia. Uno de las mejores líneas productoras es *Streptomyces verticillus* ATTCC 15003 que ha sido recientemente manipulada por mutagénesis con PCR-objetivada mediada por RED y conjugación intergenérica *E.coli-Streptomyces*, abriendo la posibilidad para la biosíntesis combinatoria de derivados mejorados. Aunque la Bleomicina nunca se ha utilizado como antibacteriana, muchas líneas resistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Klebsiella pneumoniae* aisladas en clínica son resistentes a este fármaco a altas dosis.

La Actinomicina D o la Dactinomicina pertenecen a la clase de agentes antitumorales peptídicos. Las Actinomicinas producidas por *Streptomyces parvulus* y otros estreptomicetos tienen importancia histórica ya que fueron los primeros antibióticos aislados de una línea de *Streptomyces*. La estructura de la actinomicina contiene un cromóforo de fenoxacinona y dos péptidos cíclicos. Ha sido utilizado por vía parenteral en solitario o en combinación con otras fármacos antineoplásicos desde 1964 (45).

La Pentostatina proveniente de *Streptomyces antibioticus* es probablemente el único antibiótico nucleósido al que se ha le encontrado una aplicación clínica. Es un análogo de nucleótido purínico que se une e inhibe la adenina desaminasa (ADA), una enzima esencial en el metabolismo de las purinas. Se utiliza para tratar algunos tipos de leucemias (45).

Diversas antraciclinas, aisladas inicialmente como antibacterianos, han sido empleadas como agentes antitumorales pioneros, tales como la Daunorubicina y Doxorubicina (también conocida como Adriamicina). El *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 es uno de los productores originales de la Doxorubicina y su productividad se incrementó drásticamente manipulando los genes en la región del grupo de genes de la doxorubicina (46). Por una aproximación similar de introducir genes heterólogos en mutantes bloqueados, se han producido nuevos derivados por fermentación (47).

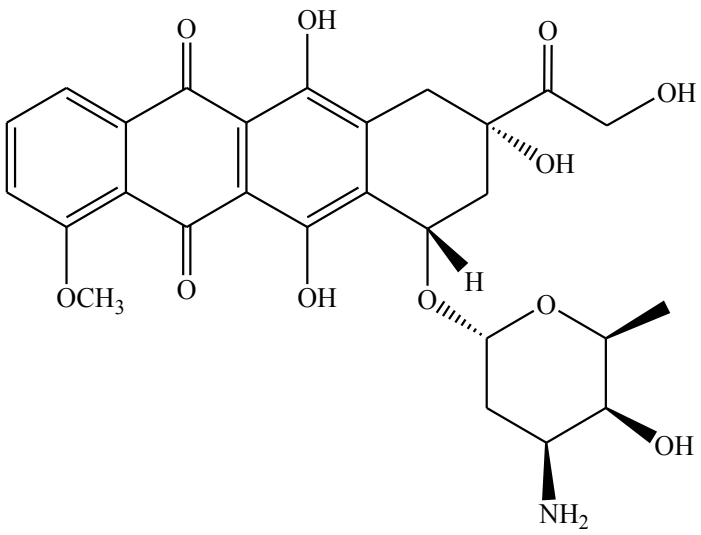


Figura 24.- Doxorubicina (Adriamicina) producida por *Streptomyces peucetius*.

Nuevas generaciones modificadas de la doxorubicina llevaron al desarrollo del clorhidrato de Amrubicina, una 9-amino-antraciclina sintética, que muestra mayores niveles de actividad antitumoral que las antraciclinas convencionales. La molécula se introdujo en el mercado en 2002 (2, 3).

Las Enediínas producidas por especies de *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Actinomadura,* son potentes agentes anticancerosos. Actúan lesionando las cadenas sencillas o dobles de ADN. Todos los miembros

tienen actividad anticancerígena muy potente (5-8.000 veces más potente que la Adriamicina) y actividad antibiótica, pero su aplicación clínica está limitada actualmente por una toxicidad retrasada. Para evitar los efectos secundarios sistémicos, las enediínas se han conjugado con anticuerpos monoclonales dirigidos al tumor para proporcionar una exposición localizada al agente citotóxico (42,45).

La Tubolina es un objetivo alternativo antitumoral que continúa atrayendo la atención en el descubrimiento de fármacos y desarrollo. La Epotilona B es un grupo de macrólidos de 16 miembros aislados del mixobacterio *Sorangium cellulosum* que actúa bloqueando la despolimerización de microtúbulos y promocionando la polimerización de tubulina, causando la parada del ciclo celular y apoptosis. Tiene la ventaja de que es citotóxico para las células que sobreexpresan la glicoproteína-P de la bomba de eflujo de fármacos, que son resistentes a taxanos, los agentes de origen vegetal actualmente más utilizados para el cáncer de mama y ovarios (45). Más aún, la Epotilona B es más soluble en agua que el taxano.

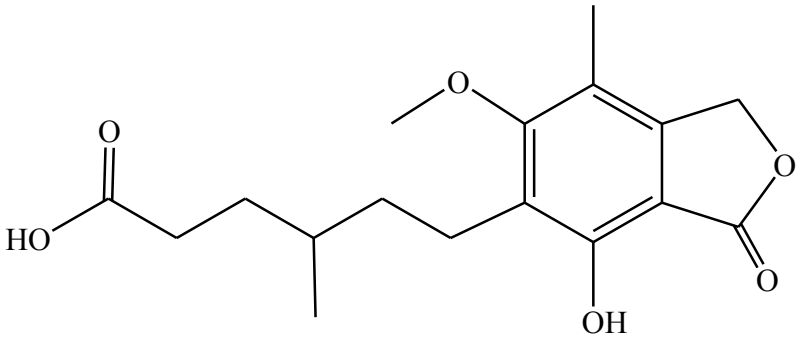
La línea original o las recombinantes fueron mejoradas en su productividad utilizando mutagénesis clásica y optimizando el medio (48). Las líneas recombinantes se utilizaron para biosíntesis combinatoria y preparación de nuevos derivados (49).

9. AGENTES INMUNOSUPRESORES

El agente inmunosupresor aprobado más recientemente el Mycophenolate mofetil es el éster del ácido Micofenólico (MPA, Figura 25), el primerísimo de los metabolitos secundarios descubiertos (50). MPA se producen por muchas líneas de *Penicillium* a menudo asociadas con el queso y otros alimentos conservados, p.e. el *Penicillium brevicompactum* es un agente de maduración de los quesos azules. Se ha demostrado que un mutante del género *Penicillium* resistente a los antibióticos polienos produce más MPA que otras líneas emparentadas permitiendo procesos más eficaces a escala industrial. El MPA inhibe la síntesis de GDP, GTP, y dGTP, por lo tanto, MPA

inhibe la síntesis de ADN en los linfocitos (50). Se aprobó en combinación con ciclosporina A y corticosteroides para el trasplante de riñón en 1995 y para trasplante de corazón en 1998 (17).

La ciclosporina A por el contrario se produce por fermentación utilizando el hongo *Tolypocladium nivenum* (or *inflatum*) (Figura 26); tiene una estructura de undecapéptido cíclico y ha tenido un impacto radical en la medicina clínica, siendo utilizado para prevenir y tratar el rechazo de implantes y la enfermedad del implante contra hospedador que sigue a los trasplantes de órganos y de médula ósea.



mycophenolic acid

Figura 25.- Ácido micofenólico producido por diferentes especies de Penicillium.

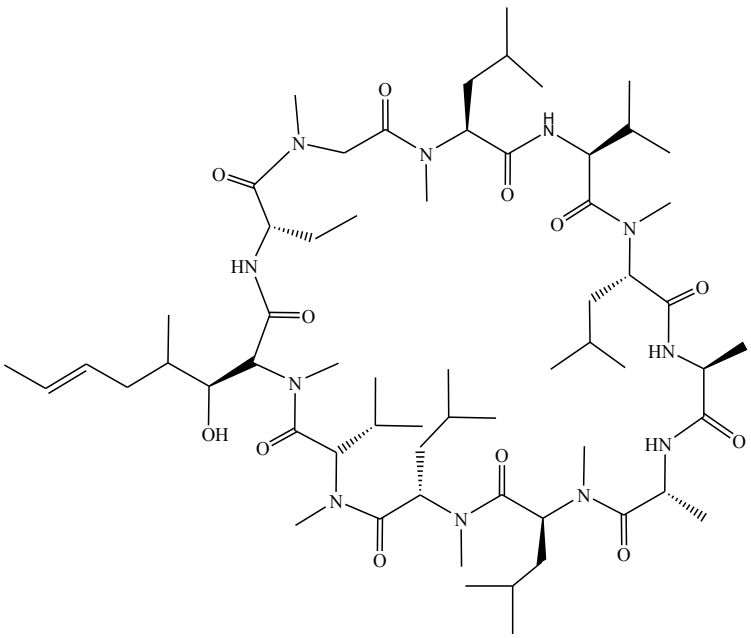


Figura 26.- Ciclosporina A producida por *Tolypocladium nivenum*.

Otros dos productos provenientes de actinomicetos han sido desarrollados más recientemente, ya que son cien veces más activos y menos tóxicos, este es el Sirolimus (conocido como Rapamicina) y el Tacrolimus (conocido inicialmente como FK506). Ambos son macrolactonas poliquétidos producidos por *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces tsukubaensis*, respectivamente (51, 52). Los Sirolimus y Tacrolimus son activos frente a hongos (p.e. *Candida albicans*), pero también interaccionan con las proteínas intracelulares y bloquean la transducción de señales, involucrando a IL-2 y otras citoquinas, inhibiendo así la activación y proliferación de células T (50). El Sirolimus se descubrió en el caldo de cultivo del *Streptomyces hygroscopicus* (aislado en la isla de Rapa Nui por lo que se llamó también Rapamicina) y mostró ser un potente agente antitumoral e inmunosupresor; fue aprobado como fármaco inmunosupresor en 1999. La esterificación química del Sirolimus llevó a la semisíntesis del Temsirolimus**,** recientemente autorizado para el tratamiento de carcinoma de células renales y en fase de pruebas clínicas para el tratamiento de otros muchos tipos de tumores (45).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Demain a.l. (2009) antibiotics: natural products essential to human health. Med. Res. Rev. 29, 821-842.

2. Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prods.* 66, 1022–1037.

3. Newman D.J., Cragg G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prods*.70, 461–477.

4. Demain A.L. (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 455-463.

5. Bentley R. (1997) Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; prospects for discovery of new drugs. *Perspect. Biol. Med*. 40, 364-394.

6. Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58, 1-26.

7. Marinelli F. (2009) From microbial products to novel drugs that target a multitude of disease indications. *Meth. Enzymol.* 458, 29-58.

8. Demain A.L., Masukerar P.S. (1974) Lysine inhibition of *in vivo* homocitrate synthesis in *Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol.* 82*,* 143-151.

9. Holt R.J., Stewart G.T. (1964). Production of amidase and β-lactamase by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 36, 203-213.

10. Kennedy J. (2007) Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. *Nat. Prod. Res*. 25, 25–34.

11. Weissman K. J. (2007) Mutasynthesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 25, 139-142

12. Bentley S.D., *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature 417, 141-147

13. Gravius B., Bezmalinovic T., Hranueli D., Cullum J. (1993) Genetic instability and strain degeneration in *Streptomyces rimosus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 59, 2220-2228.

14. Bills G.F., Martin J., Collado J., Platas G., Overy D., Tormo J.R., Vicente F., Verkley G. Crous P.W. (2009) Measuring the distribution and diversity of antibiosis and secondary metabolites in filamentous fungi. *SIM News*. 59, 133-146.

15. Barrios-González J., Miranda R.U. (2010) Biotechnological production and applications of statins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 869-883.

16. Manzoni M., Rollini M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 58, 555-564.

17. Demain A.L., Adrio J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* 38**,** 41-55.

18. Endo A., Kuroda M., Tanzawa K. (1976). Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72, 323-326.

19. Bizukojc M., Ledakowics S. (2009) Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.* 4, 647–664.

20. Suryanarayan S. (2003) Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochem. Eng. J*. 13, 189–195

21. Serizawa N., Nakagawa K., Hamano K., Tsujita Y., Terahara A., Kuwano H. (1983) Microbial hydroxylation of ML-236B (compactin) and monacolin K (MB-530 B). *J. Antibiot.* 36, 604–607.

22. Ykema A., Streekstra H., Luiten R.G.M. (1999) Statin production by fermentation. International Patent WO/1999/010499.

23. Kidd J. (2006) Life after statin patent expiries. *Nature Revs/Drug Discovery* 5, 813–814.

24. http://www.reportbuyer.com/press/antibiotics-market-to-recover-reaching-25-billion-by-2010

25. Dalhoff A.A.H. (2008) Discovery and development of anti-infectives at Bayer: A personal view. Part II: b-lactam antibiotics. *SIM News.* 58, 6-18.

26. Sonawane V.C. (2006) Enzymatic modifications of cephalosporins by cephalosporin acylase and other enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 95-120.

27. Marinelli F.(2009) Antibiotics and *Streptomyces*: the future of antibiotic discovery. *Microb. Today,* 36:20-23

28. Franklin T.J., Higginson B. (1970) Active accumulation of tetracycline by *Escherichia coli.* *Biochem. J.* 116, 287–297.

29. Zhanel G.G., Homenuik K., Nichol K., Noreddin A., Vercaigne L., Embil J., Gin A., Karlowsky J.A., Hoban D.J. (2004) The glycylcyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs* 64, 63-88.

30. Kahan J.S., Kahan F.M., Goegelman R., Currie S.A., Jackson, M., Stapley E.O., Miller T.W., Miller A.K., Hendlin D., Mochales S., Hernandez S., Woodruff H.B., Birnbaum J. (1979) Thienamycin, a new b-lactam antibiotic. I Discovery, taxonomy, isolation, and physical properties. *J. Antibiot.* 32, 1-12.

31. Lancini, G., Cavalleri, B. (1997). *In Biotechnology of Antibiotics*. Marcel Dekker, New York, USA. p. 521.

32. http://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin - cite_ref-Levine2006_1-4Levine (2006). Vancomycin: a history. *Clin. Infect. Dis.* 42, S5–S12.

33. Parenti F., Schito G.C., Courvalin P. (2000) Teicoplanin chemistry and microbiology. *J. Chemother*. 12, 5–14.

34. Jung H., Jeya M., Kim, S., Moon H., Singh R.K., Zhang Y., Lee J. (2009) Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 417–428.

35. Guskey M.T., Tsuji B.T., (2010) A comparative review of the lipoglycopeptides: Oritavancin, Dalbavancin, and Telavancin. *Pharmacotherapy* 30, 80-94.

36. Malabarba A., Nicas T.I, Thompson R.C. (1997) Structural modification of glycopeptide antibiotics. Med. Res. Rev. 17, 69-137.

37. Gandolfi R., Jovetic S., Marinelli F., Molinari F. (2007) Biotransformations of lipoglycopeptides to obtain novel antibiotics. *J Antibiot*. 60, 265-271.

38. Baltz R.H., Miao V., Wrigley S.K. (2005) Natural products to drugs: Daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 22, 717–741.

39. http://www.bioportfolio.com/news/datamonitor_72.htm

40. Denning D.W. (2003) Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362, 1142-1151.

41. Lam K.S. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 15, 279-289.

42. Galm U., Hager M. H., Van Lanen S. G., Ju J., Thorson J. S., Shen B. (2005). Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chem. Rev.* 105, 739-758.

43. Mao Y., Varoglu M., Sherman D. H. (1999). Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem. Biol.* 6, 251-263.

44. Galm U., Wang L., Wendt-Pienkowski E., Yang R., Liu W., Tao M., Coughlin J. M., Shen, B. (2008). *In vivo* manipulation of the bleomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces verticillus* ATCC15003 revealing new insights into its biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem*. 283, 28236-28245.

45. NCI, http://www.cancer.gov/

46. Lomovskaya N., Otten S. L., Doi-Katayama Y., Fonstein L., Liu X. C., Takatsu T., Inventi-Solari A., Filippini S., Torti F., Colombo A. L., Hutchinson, C. R. (1999). Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J. Bacteriol*. 181, 305-318.

47. Madduri K., Kennedy J., Rivola G., Inventi-Solari A., Filippini S., Zanuso G., Colombo A. L., Gewain K. M., Occi J. L., MacNeil D. J., Hutchinson C. R. (1998). Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. *Nat. Biotechnol.* 16, 69-74.

48. Gong G. L., Sun,X., Liu X. L., Hu W., Cao W. R., Liu H., Liu W. F., Li Y. Z. (2007). Mutation and a high-throughput screening method for improving the production of epothilones of *Sorangium*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 615-623.

49. Tang L., Chung L., Carney J. R., Starks C. M., Licari P., Katz L. (2005). Generation of new epothilones by genetic engineering of a polyketide synthase in *Myxococcus xanthus*. *J. Antibiot.* 58, 178-184.

50. Mann J. (2001). Natural products as immunosuppressive agents. *Nat. Prod. Rep.* 18, 417-430.

51. Kino T., Hatanaka H., Hashimoto M., Nishiyama M., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., and Imanaka H. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* 40, 1249-1255.

52. Vezina C., Kudelski A., and Sehgal S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28, 721-6.

Capítulo III

PURIFICACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS INDUSTRIALES

José Manuel Guisán Seijás

RESUMEN

La purificación e inmovilización sencilla y correcta de una enzima nos permitirá diseñar biocatalizadores heterogéneos con una gran cantidad de enzima por gramo de catalizador y un elevado porcentaje de actividad catalítica por molécula de enzima.

También existen protocolos de inmovilización que nos permiten mejorar notablemente las propiedades funcionales de las enzimas: actividad, estabilidad, selectividad, posibilidades de reactivación, etc.

De este modo, la implantación masiva de las enzimas como catalizadores industriales será cada día más sencilla.

Palabras clave: Enzimas recombinantes; Cromatografía de afinidad; Inmovilización por unión covalente multipuntual.

ABSTRACT

Purification and inmobilization of industrial enzymes

The development of simple and inexpensive protocols for purification and immobilization of enzymes is a key point in Enzyme Technology. In this way, improved heterogeneous biocatalyst can be prepared. A high amount of pure enzyme will immobilized per gram of support and each immobilized enzyme molecule will retain a high percentage of catalytic activity.

There are also more complex protocols that allow the improvement of

functional enzyme properties via immobilization strategies: activity, stability, selectivity, possibilities for reactivation, etc.

In this way, a massive implementation of enzymes as industrial catalyst is becoming much easier.

Keywords: Recombinant enzymes; Affinity chromatography; Enzyme immobilization by multipoint covalent attachment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las enzimas como catalizadores industriales

Las enzimas poseen unas excelentes propiedades catalíticas (actividad, selectividad y especificidad) y por ello son capaces de catalizar los procesos químicos más complejos en las condiciones experimentales y medioambientales más suaves (1). Las enzimas son potencialmente excelentes catalizadores en muchas áreas de la industria: síntesis de biocombustibles, síntesis de fármacos, química de alimentos, biosensores, etc.

Sin embargo, las enzimas se han ido modificando, a través de la evolución biológica, para optimizar la fisiología de los seres vivos, sometidos a estrés y necesitando una excelente modulación de su metabolismo. Por este motivo, las enzimas, a pesar de sus excelentes propiedades catalíticas, tienen también algunas características poco útiles para su implantación industrial: son catalizadores solubles, generalmente inestables, se inhiben por altas concentraciones de sustratos y productos, actúan principalmente sobre sus substratos naturales y en condiciones fisiológicas, se encuentran mezcladas con cientos de proteínas de las que son difíciles de separar, etc. Por ello, en la inmensa mayoría de los casos, las enzimas tiene que ser notablemente mejoradas antes de su implantación industrial.

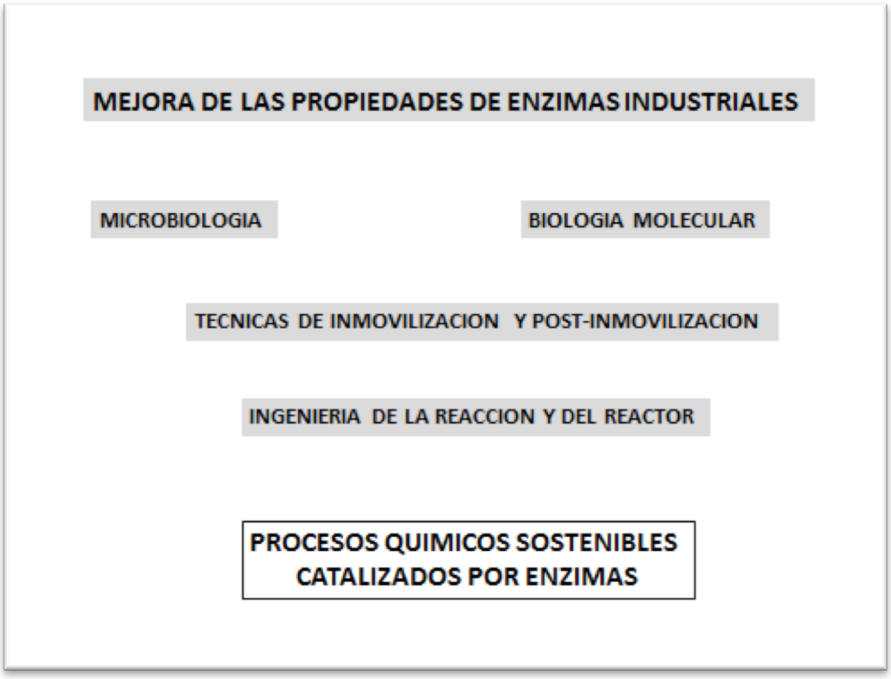


Figura 1.

1.2. Derivados inmovilizados de enzimas puras y mejoradas

Por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos catalizados por enzimas se mejoran notablemente si podemos reusar la enzima en numerosos ciclos de reacción. Desde este punto de vista, la inmovilización de enzimas podría ser definida como cualquier técnica que permita que una enzima se pueda reusar o utilizar en continuo (2,3). Por un lado, el desarrollo de métodos de inmovilización sencillos y de bajo coste es muy importante. Por otro lado, la posible mejora de las propiedades funcionales de las enzimas (actividad, selectividad, estabilidad) sería también muy interesante (3,4). Finalmente, la utilización de enzimas puras mejoraría también los catalizadores industriales, pues permitiría obtener derivados inmovilizados mucho más activos. Desde este punto de vista, en este capítulo vamos a comentar brevemente métodos sencillos de purificación de enzimas, métodos sencillos de inmovilización y métodos de inmovilización que nos permitan mejorar las propiedades funcionales de las enzimas (5).

2. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

El diseño de biotransformaciones enzimáticas requiere el uso de enzimas puras. De este modo: ***a.-*** las excelentes propiedades de selectividad y especificidad de las enzimas no se verán afectadas por otras enzimas presentes en los extractos crudos y que puedan modificar el mismo substrato u otros substratos que deseamos mantener intactos (p.e. en análisis o en tecnología de alimentos); ***b.-*** la preparación de derivados inmovilizados muy activos se mejora noblemente si disponemos de muestras de enzima pura. Por ejemplo, la inmovilización de enzimas sobre sólidos pre-existentes nos permitirá recubrir completamente los soportes con un 100% de moléculas de la enzima de interés que inicialmente solo representaba el 0,5-5 % de las proteínas expresadas por el microorganismo productor. Así pues, la purificación de enzimas, en principio un problema de bioquímica y biomedicina, se convierte ahora también en un problema clave de Ingeniería Química.

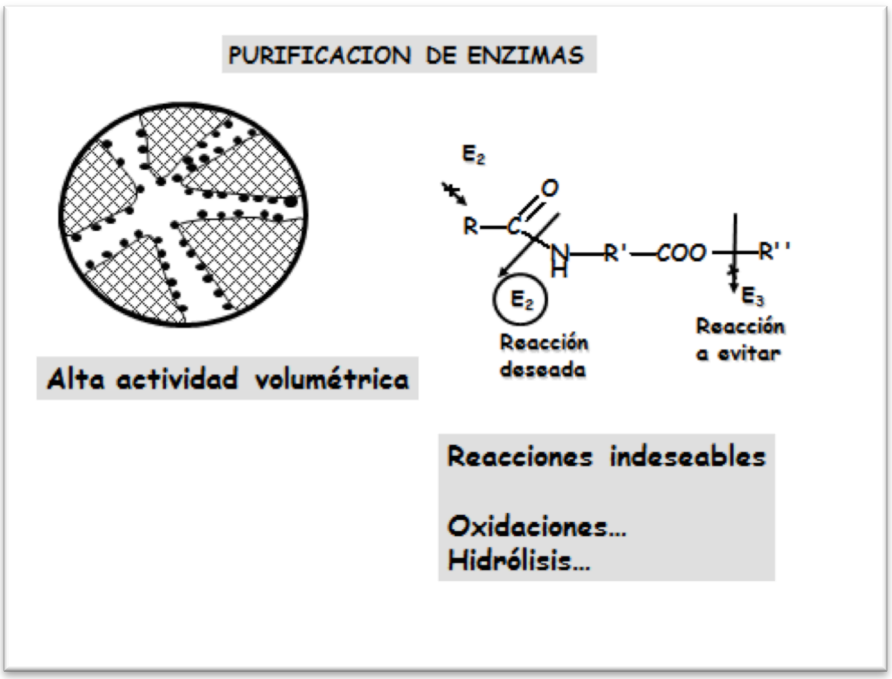


Figura 2.

2.1. Purificación de Enzimas Industriales

En general, la purificación de enzimas se puede considerar un problema complejo y costoso aunque en general bien resuelto. A veces, se necesitan varios pasos de purificación y los rendimientos son moderadamente bajos. Sin embargo, las Enzimas Industriales deben ser muy baratas sobre todo si las queremos utilizar para obtener productos de bajo valor añadido. Los métodos cromatográficos convencionales de purificación de enzimas son muy útiles para purificar pequeñas cantidades de enzimas de interés bioquímico a escala laboratorio, pero generalmente pueden ser poco útiles para purificar grandes cantidades de enzima industrial de bajo coste.

2.2. Métodos Cromatográficos basados en características muy específicas de las enzimas

En estos casos, sería relativamente sencillo diseñar protocolos de adsorción específica de las enzimas de interés (contaminadas únicamente con pequeñas trazas de impurezas) y de este modo la proteína podría ser purificada a homogeneidad en un solo paso cromatográfico y utilizando además una cantidad muy pequeña de soporte: p.e. 10 g de soporte cromatográfico podrían servirnos para purificar casi 1 g de la enzima de interés.



Figura 3.

La cromatografía de afinidad, se basa en la adsorción específica de una enzima sobre un inhibidor competitivo o un análogo de su sustrato que se ha unido a la superficie de un soporte. Se basa en una propiedad única o casi única de una enzima (su interacción con un sustrato). El principio es bastante lógico, pero el diseño de soportes cromatográficos adecuados es un poco más complejo.

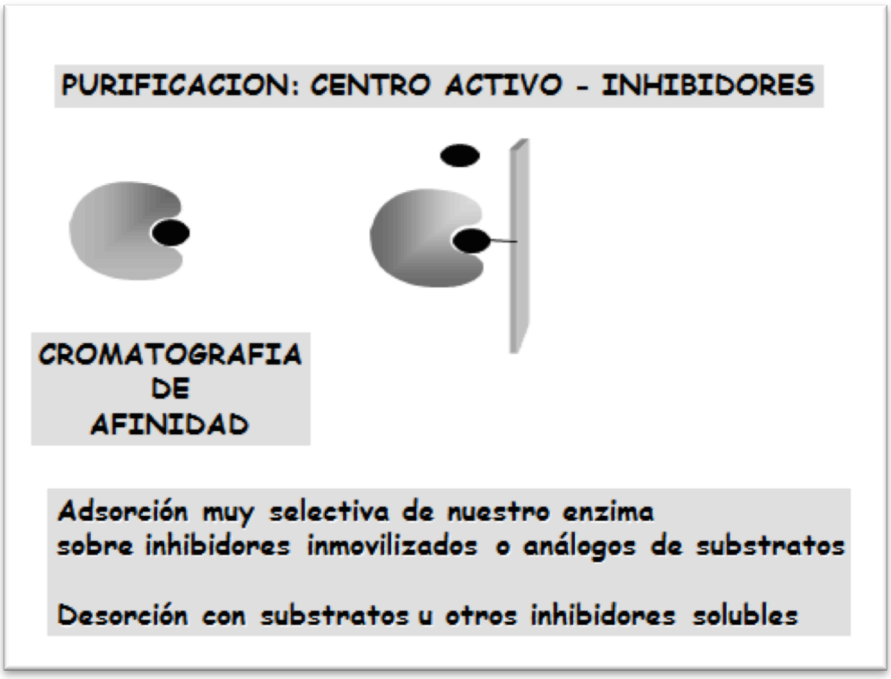


Figura 4.

Por otro lado, las lipasas presentan un interesante mecanismo de adsorción interfacial sobre las gotas de sus sustratos naturales: los aceites y grasas. De un modo similar, las lipasas se adsorben selectivamente sobre soportes hidrofóbicos a muy baja fuerza iónica; condiciones en la que la inmensa mayoría de proteínas no se adsorbe sobre estos soportes.

2.3. Enzimas Industriales Recombinantes

Cada día es más frecuentes que las enzimas industriales no se produzcan en los microorganismos donde se sintetizan inicialmente sino que se expresen en hospedadores adecuados (p.e. *Escherichia coli, Sacharomyces*

cerevisae, Pichia pastoris, etc). Estos hospedadores crecen mucho más y mucho más rápidamente que la mayoría de los microorganismos. Además, las enzimas se pueden sobre-expresar (hasta constituir un 5-10% de todas las proteínas del hospedador). La purificación de enzimas recombinantes es mucho más sencilla:

a.- Por un lado quisiéramos resaltar la sobreexpresión de enzimas de termófilos en microorganismos mesófilos. Actualmente, la única enzima muy resistente al calor será la enzima recombinante, que se podrá purificar muy fácilmente de las enzimas naturales del hospedador (6).

b.- Por otro lado, las enzimas recombinantes, se pueden modificar con diferentes dominios que estarán únicamente presentes en la enzima recombinante y que no existirán en todas las proteínas del microorganismo hospedador. Posteriormente, diseñando un soporte cromatográfico capaz de adsorber los dominios añadidos, se podría purificar la proteína recombinante en un único paso.

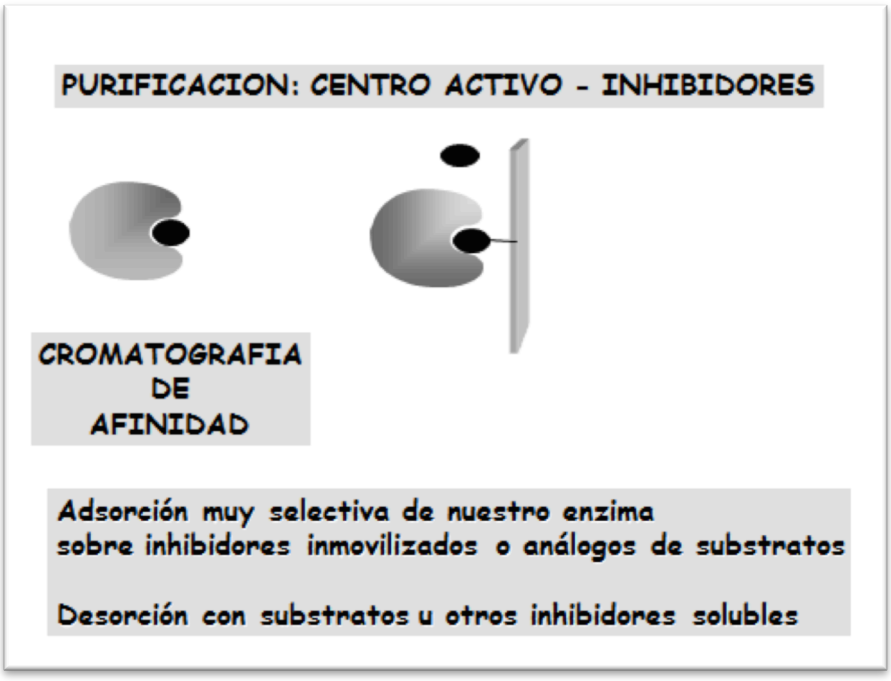


Figura 5.

2.4. Enzimas recombinantes conteniendo dominios de poli-His

El dominio más utilizado para purificar enzimas recombinantes es una cola de poli-His (un péptido de 6 histidinas añadido en el residuo amino terminal o en el residuo carboxilo terminal). Es un dominio muy pequeño, que en la inmensa mayoría de los casos no debe alterar las propiedades funcionales de la enzima. Este dominio, se adsorbe muy intensamente sobre soportes que contienen quelatos metálicos: ***a.-*** soportes con grupos imino-diacético modificados con cationes divalentes (cobre, níquel, zinc y cobalto) y ***b.-*** soportes con grupos nitrilotriacético modificado con cationes trivalentes (p.e. níquel). Después de su adsorción, las enzimas se pueden desorber con concentraciones moderadas de imidazol (la cadena lateral de la histidina). Un problema de este método de purificación, consiste en que las proteínas naturales también se pueden adsorber sobre estos soportes de quelatos metálicos y ello complica la adsorción selectiva y la consiguiente purificación sencilla de estas enzimas industriales.

Adsorción de enzimas recombinantes vs enzimas nativas

Para lograr la adsorción selectiva de las proteínas recombinantes, debemos conocer bien el mecanismo de adsorción de las enzimas nativas y de las enzimas recombinantes. Las enzimas recombinantes, se adsorben mediante una unión muy fuerte entre cada dominio de histidinas (a través de dos His de cada dominio) con un único grupo quelato metálico. Por el contrario, las enzimas naturales se unen a través de uniones multipuntuales mucho más débiles que ocurren entre varias His o Cys y muchos quelatos metálicos de un soporte que está muy activado.

Una posible solución para evitar la adsorción de proteínas naturales, es la utilización de soportes muy poco activados (p.e. con 5 μEq. de quelato por gramo de soporte). De este modo, la adsorción multipuntual de las enzimas naturales del hospedador se verá minimizada y más aun si añadimos una concentración moderada de imidazol al extracto de proteínas (p.e. 20 mM). En este caso, las uniones entre un único quelato y el dominio poli-histidinas siguen siendo muy fuertes y las proteínas recombinantes se adsorben sobre estos soportes cromatográficos diseñados a medida. Así pues, la combinación de la

fusión de colas de His a proteínas recombinantes mas el diseño de soportes y protocolos de adsorción a medida, nos permite la purificación en un solo paso de las proteínas recombinantes. Además, el ADN y ARN celulares no se adsorben sobre estos soportes, con lo cual nuestra enzima de interés se puede purificar completamente a partir de un extracto crudo de la enzima recombinante sobre-expresada en un buen hospedador.

3. INMOVILIZACION DE ENZIMAS

3.1. Protocolos muy sencillos

La producción de enzimas muy selectivas y estables es cada día más frecuente. En este caso, la mejora adicional de las propiedades de las enzimas no es muy necesaria y el principal problema de la inmovilización es su sencillez y su bajo coste. Algunas características de este tipo de protocolos de inmovilización son las siguientes:

a.- El uso de soportes pre-existentes que se puedan reutilizar una vez que la enzima se haya inactivado. La enzima inactivada se puede desorber del soporte y éste se puede volver a recargar con enzima nueva.

b.- Derivados con muy buenas propiedades mecánicas. Por ejemplo: inmovilizados sobre soportes pre-existentes adecuados para cada tipo de reactor, como geles de agarosa para reactores tipo tanque agitado, soportes inorgánicos para columnas de lecho fijo, etc.

c.- Los soportes pre-existentes deben ser químicamente muy estables: p.e., soportes iónicos utilizados para adsorber físicamente las enzimas. Estos soportes, se pueden transportar y almacenar en largos periodos de tiempo y por ello, pueden ser utilizados en empresas diferentes de las que las han sintetizado y activado.

d.- Los procesos de inmovilización deben ser rápidos y realizarse en condiciones experimentales muy suaves (p.e. pH neutro y bajas temperaturas) donde las enzimas son muy fáciles de manejar.

Algunos métodos muy sencillos de inmovilización se describen brevemente a continuación.

3.2. Adsorción de enzimas sobre resinas de intercambio iónico

Quizás éste es el protocolo más sencillo de inmovilización de enzimas sobre soportes pre-existentes. La inmensa mayoría de las proteínas se adsorben a pH neutro en intercambiadores aniónicos o catiónicos. La mayoría de ellas, con un pH muy inferior a 7, se adsorben sobre intercambiadores aniónicos. Existen muchos intercambiadores iónicos comerciales -orgánicos, inorgánicos y sintéticos: geles de agarosa activados, resinas sintéticas (Duolite, Levattit, Amberilite, Purolite, etc.), vidrio poroso activado, etc.-. Quizás los soportes que contienen altas concentraciones de sales de amonio cuaternarias o grupos sulfopropil son los más adecuados para una adsorción muy intensa de las enzimas. Algunos soportes macroporosos son capaces de adsorber hasta 100 mg de enzima por gramo de catalizador. La alta estabilidad química de los grupos iónicos (p.e. los señalados anteriormente) nos permiten recubrir completamente la superficie del soporte con moléculas de enzimas y obtener así biocatalizadores muy activos.

La adsorción iónica no debe poder mejorar la rigidez de las enzimas, pero al dispersar completamente la enzima sobre la superficie de un sólido poroso, algunas causas de inactivación pueden ser evitadas, como todo tipo de agregaciones o procesos intermoleculares, interacción de la enzima con interfases hidrofóbicas en reactores agitados vigorosamente (gotas de disolventes, burbujas de gases, etc.)

El principal problema de este tipo de inmovilización es la posible desorción de la enzima en condiciones de alta fuerza iónica, como p.e., en presencia de concentraciones muy altas de substratos ionizados (7-9).

3.3. Inmovilización covalente

La inmovilización covalente de enzimas sobre soportes pre-existente conteniendo grupos reactivos (p.e., reactivos con grupos amino de la superficie de las enzimas) es quizá el protocolo más popular de inmovilización de enzimas (11). Igual que comentamos para los intercambiadores iónicos, existe

también una gran variedad de soportes macroporosos comerciales activados (bromocianógeno, epóxidos, etc.) o fácilmente activables (conteniendo grupos carboxilos activables con N-hidroxisuccinimida, o con grupos amino activables con glutaraldéhido, etc. También ahora, la dispersión de enzimas sobre la superficie de soportes porosos impide varias causas de inactivación como ya hemos comentado anteriormente.

La formación de un enlace covalente muy estable entre la enzima y el soporte, permite el uso de los derivados (sin posibilidad de desorción de la enzima) en cualquier tipo de medio de reacción, como alta fuerza iónica, altas concentraciones de codisolventes orgánicos, líquidos iónicos, fluidos supercríticos, etc.

A diferencia de los soportes de intercambio, las enzimas inactivadas no se podrían desorber de los soportes y por tanto estos no se pueden reutilizar cuando la enzima se ha inactivado a no ser que seamos capaces de desarrollar estrategias de reactivación de enzimas parcialmente inactivadas. Por otro lado, algunos soportes activados capaces de unir covalentemente a las enzimas se inactivan también muy rápidamente en medios acuosos (sobre todo en condiciones alcalinas) y ello puede impedir recubrirlos completamente con moléculas de enzima inmovilizadas.

3.3.1. Inmovilización de enzimas a través de grupos amino de su superficie

Las enzimas se pueden inmovilizar a través de diferentes residuos de su superficie; las tirosinas reaccionan con sales de diazonio, las cisteínas se pueden inmovilizar por intercambio tiol-disulfuro, los aspárticos y glutámicos se pueden inmovilizar (activados con carbodiimida) sobre soportes conteniendo grupos amino de bajo pK, etc. Estos y otros interesantes métodos de inmovilización han sido descritos con precisión en excelentes revisiones. Sin embargo, en nuestra opinión, los grupos amino de la superficie de una enzima (amino terminal y/o residuos lisina) son los grupos más adecuados para la inmovilización de enzimas. Los grupos amino, cuando no están ionizados, son excelentes nucleófilos y reaccionan muy bien (sin tener que ser modificados) con numerosos soportes reactivos. Además, los grupos amino son hidrofílicos y bastante abundantes en la superficie de la mayoría de las proteínas, etc.

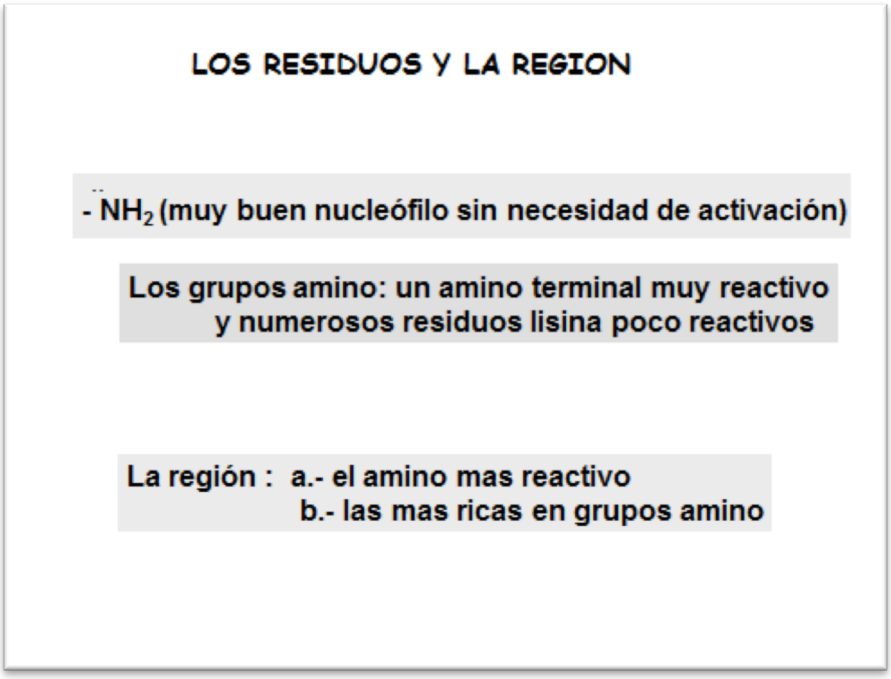


Figura 6.

Desde el punto de vista de su reactividad podemos distinguir dos tipos de grupos amino en la superficie de una enzima:

a.- aminos de bajo pKa (p.e. entre 7 y 8), que están fundamentalmente en el residuo amino terminal de las enzimas (generalmente muy expuestos al medio). Estos grupos, reaccionan fácilmente a pH neutro con grupos del soporte altamente reactivos.

b.- aminos de alto pKa (p.e. alrededor de 10), que están en todas las lisinas superficiales. Estos grupos son muy poco reactivos a pH neutro, pero como son bastante abundantes podrían ser interesantes para diseñar estrategias de inmovilización covalente multipuntual, tal como discutiremos más adelante como mejora de las propiedades de las enzimas.

3.3.2. Soportes activados que reaccionan con grupos amino de la superficie de una enzima

Existen diferentes grupos reactivos que se pueden incorporar en los soportes y que son capaces de reaccionar con grupos amino de la superficie de las enzimas.

Los grupos más reactivos son útiles para inmovilizar moderadas concentraciones de enzimas (p.e. 1-5 mg/mL) en condiciones experimentales muy suaves. Sin embargo, estos grupos muy reactivos suelen ser muy inestables en medios acuosos y la carga completa del soporte con moléculas de enzima es realmente difícil. Además, esta poca estabilidad (sobre todo en condiciones alcalinas) dificulta también la promoción de inmovilizaciones multipuntuales intensas que tienen que realzarse en condiciones alcalinas para que los grupos amino de los residuos lisina se hagan mucho más reactivos.

Por otro lado, algunos grupos muestran una reactividad intermolecular muy baja a pH neutro (glioxil, epóxido, etc.) y en principio no parecen muy útiles para la inmovilización de enzimas. Sin embargo, estos grupos son los más adecuados para lograr inmovilizaciones covalentes multipuntuales muy intensas, tal como veremos más adelante y además nos permiten lograr fácilmente un recubrimiento total de la superficie del soporte con moléculas de la enzima.

3.3.3. Inmovilización de enzimas sobre agarosa activada con bromocianógeno

Las partículas de agarosa activadas con bromocianógeno son asequibles comercialmente (CNBr-Sepharose from GE Healthcare) (12). Los grupos reactivos, cianatos; -C-N, son muy reactivos y muy inestables y en cierto modo no son muy adecuados para su aplicación industrial. Sin embargo, estos soportes son muy útiles para hacer una primera evaluación de las posibilidades tecnológicas de una enzima industrial. Incluso podemos inmovilizar muy suavemente un extracto sin purificar conteniendo la enzima de interés (p.e. a pH 7, 4ºC durante 15 minutos con bloqueo adicional del soporte activado con etanolamina). En este caso, las moléculas de enzima inmovilizadas están completamente dispersas y cualquier fenómeno intermolecular o interfacial es imposible (proteolisis, interacción con otras proteínas, interacción con interfases hidrofóbicas, etc.). De este modo, las propiedades intrínsecas de la enzima de interés (actividad hacia diferentes substratos, especificidad, selectividad) pueden ser evaluadas correctamente. De hecho, estos derivados serían el “control ideal” para evaluar cualquier otro método de inmovilización de la misma enzima. Por el contrario, la comparación

de derivados con disoluciones concentradas e impuras de la enzima puede estar influenciado por numerosos artefactos (agregaciones, interacciones proteína-proteína, etc.).

3.3.4. Inmovilización de enzimas sobre soportes aminados activados con glutaraldehído

Los soportes pre-activados (soportes aminados) son muy estables y podrían ser almacenados (p.e. a 4ºC, durante prolongados periodos de tiempo). La activación de estos soportes con glutaraldehído es muy sencilla e incluso el glutaraldehído puede ser utilizado en procesos alimentarios. El glutaraldehído queda unido al soporte a través de aminos secundarios que están ionizados a pH neutro. Por este motivo, el proceso de inmovilización de enzimas sobre estos soportes suele ocurrir por un proceso en dos etapas:

a.- una primera adsorción iónica muy rápida a través de las regiones de la enzima con la mayor densidad de carga negativa sobre los grupos amino ionizados del soporte y,

b.- una reacción covalente intramolecular adicional entre grupos amino de la enzima y los grupos glutaraldehído del soporte. Estos grupos aldehído, son bastante inestables a pH alcalino y por ello esta inmovilización no suele promover una intensa estabilización de las enzimas por inmovilización covalente multipuntual. Sin embargo, el primer proceso de adsorción iónica muy rápido, si que nos permite preparar derivados de enzimas altamente cargadas (13).

3.3.5. Inmovilización de enzimas sobre soportes comerciales conteniendo una alta concentración de grupos epóxido

Existen numerosos soportes comerciales (p.e. resinas acrílicas) que contienen una alta concentración de grupos epóxido muy estables (p.e. soportes Sepabeads de la firma Resindion-Mitsubishi Chem. Corp). Los grupos epóxido son muy poco reactivos a nivel intermolecular (apenas inmovilizan enzimas solubles); son generalmente soportes de naturaleza hidrofóbica. Por este motivo, el proceso de inmovilización ocurre también en dos etapas:

a.- una primera adsorción hidrofóbica a muy alta fuerza iónica (p.e. tampón fosfato 1 M) donde los bolsillos hidrofóbicos de la superficie de la enzima se adsorben en la superficie hidrofóbica de los soportes y,

b.- una segunda unión covalente intramolecular entre grupos amino de la superficie de la enzima y los grupos epóxido del soporte. Ahora, la elevada estabilidad de los grupos epóxido a pH alcalino nos permite diseñar una tercera etapa de incubación del derivado a pH alcalino, para fomentar la unión covalente multipuntual entre los grupos amino de todos los residuos Lys situados en la proximidad de los bolsillos hidrofóbicos que participaron en la primera adsorción. Finalmente, tenemos que diseñar una cuarta etapa de bloqueo de los grupos epóxidos remanentes, utilizando para ello, concentraciones muy altas de compuestos tiolados o aminados (p.e. mercaptoetanol, glicina, cisteína, etc.). Obviamente, la alta estabilidad de los soportes nos permite recubrir completamente su superficie con moléculas de enzima inmovilizada (14).

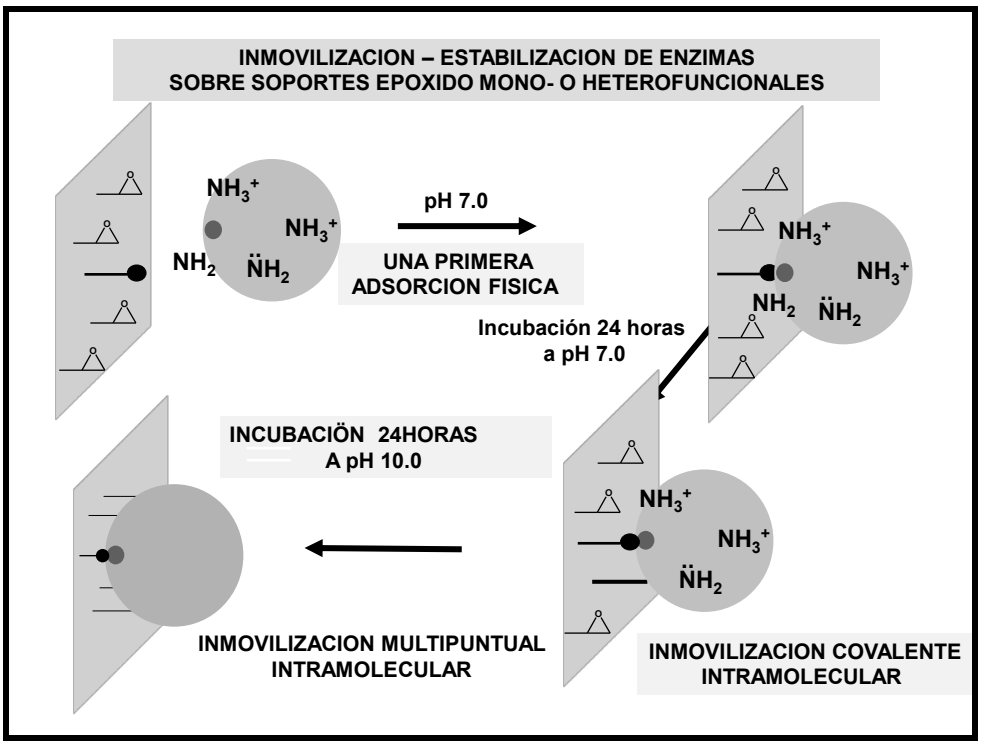


Figura 7.

3.4. Otros métodos de inmovilización de enzimas

Aunque la inmovilización de enzimas sobre soportes pre-existentes es la metodología más popular de inmovilización, cualquier protocolo que permita la reutilización de enzimas constituye un método de inmovilización. A continuación, vamos a describir muy brevemente, diferentes métodos muy sencillos de inmovilización:

i.- Reactores de ultrafiltración.

Todas las paredes de estos reactores están formadas por membranas de ultrafiltración que permiten el paso de substratos y productos, pero que retienen en su interior las moléculas de enzima soluble. Sería el método de inmovilización más sencillo, pero no mejoraría de ningún modo las propiedades de la enzima soluble. Lógicamente si estas propiedades de la enzima ya son muy buenas y/o los productos obtenidos son de muy alto valor añadido esta alternativa podría ser muy interesante.

ii.- Atrapamiento en geles de poliacrilamida, alginato, etc.

Otra manera sencilla de inmovilizar enzimas, es atraparlas en el interior de geles microporosos que se forman en presencia de la enzima (entrecruzamiento químico de acrilamida, entrecruzamiento iónico de polímeros de alginato en presencia de iones calcio, etc.). Los nuevos sólidos, tienen una porosidad pequeña que no permite la salida de las enzimas desde la estructura microporosa, donde si pueden entrar y salir substratos y productos. Esta metodología de inmovilización, no mejora notablemente las propiedades de las enzimas aunque si podría servir para estabilizar enzimas multiméricas y para evitar procesos de interacción intermoleculares indeseables.

iii.- CLECs y CLEAS

Dos métodos interesantes de inmovilizar enzimas sin soportes, son el entrecruzamiento con reactivos bifuncionales (p.e. glutaraldehido) de cristales de enzimas puras (“crosslinked enzyme crystals”, CLECs) (15) o de agregados de enzimas formados en condiciones experimentales suaves (crosslinked

enzyme aggregates) (16). Los agregados, se pueden formar con varias enzimas e incluso con enzimas y polímeros para crear microambientes a medida. En medios anhidros, tanto los CLECs como los CLEAs tienen una estructura muy compacta y contienen prácticamente 1 g de enzima por gramos de catalizador. Es decir, son 10-20 veces más activos que los mejores derivados preparados sobre soportes pre-existentes.

iv.- Inmovilización por inmuno-afinidad.

Una manera muy elegante de inmovilizar enzimas, es su adsorción intensa y selectiva sobre anticuerpos monoclonales inmovilizados. De este modo, el proceso de inmovilización se convierte también en un proceso de purificación. Además, se ha descrito que la interacción enzima-anticuerpo puede tener efectos estabilizantes sobre la estructura 3D de la enzima. Lógicamente, este método es hoy en día bastante costoso pero la tecnología de anticuerpos avanza muy considerablemente y además hay procesos enzimáticos que dan lugar a productos de muy alto valor añadido donde el coste del biocatalizador es menos relevante.

4. MEJORA DE LAS PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS MEDIANTE TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN

Como comentamos en la Introducción, la mayoría de las enzimas no tienen todas las características necesarias para su implantación industrial (estabilidad, selectividad, actividad hacia substratos no naturales, etc.). Por estas razones, la mejora de las propiedades de las enzimas mediante técnicas de inmovilización, se convierte en un excelente instrumento tecnológico (17). En cierto modo, las inmovilizaciones que no mejoran significativamente las propiedades de las enzimas (p.e. enzimas poco activas y poco estables) no tienen gran relevancia industrial. A continuación, vamos a comentar una estrategia muy útil para mejorar la estabilidad de las enzimas.

A. Estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual sobre soportes conteniendo una alta concentración de grupos glioxil

La formación de numerosos enlaces entre cada molécula de una enzima inmovilizada y el soporte podría tener importantes efectos estabilizantes. Si la distancia entre los grupos amino de la enzima y el soporte es muy pequeña y el soporte es rígido, podemos asumir que todos los residuos de cada molécula de enzima involucrados en la inmovilización multipuntual deben mantener intactas sus posiciones relativas durante cualquier cambio conformacional inducido por cualquier agente distorsionante (calor, codisolventes, etc.). De este modo, los cambios conformacionales globales de cada molécula de enzima serían mucho menos intensos y la estabilidad se mejoraría notablemente. Esta interesante hipótesis, fue ya planteada en los comienzos del desarrollo de la tecnología enzimática (18), sin embargo, todavía hoy (45 años más tarde) apenas existen buenas estrategias para conseguir de un modo racional este tipo de inmovilizaciones multipuntuales.

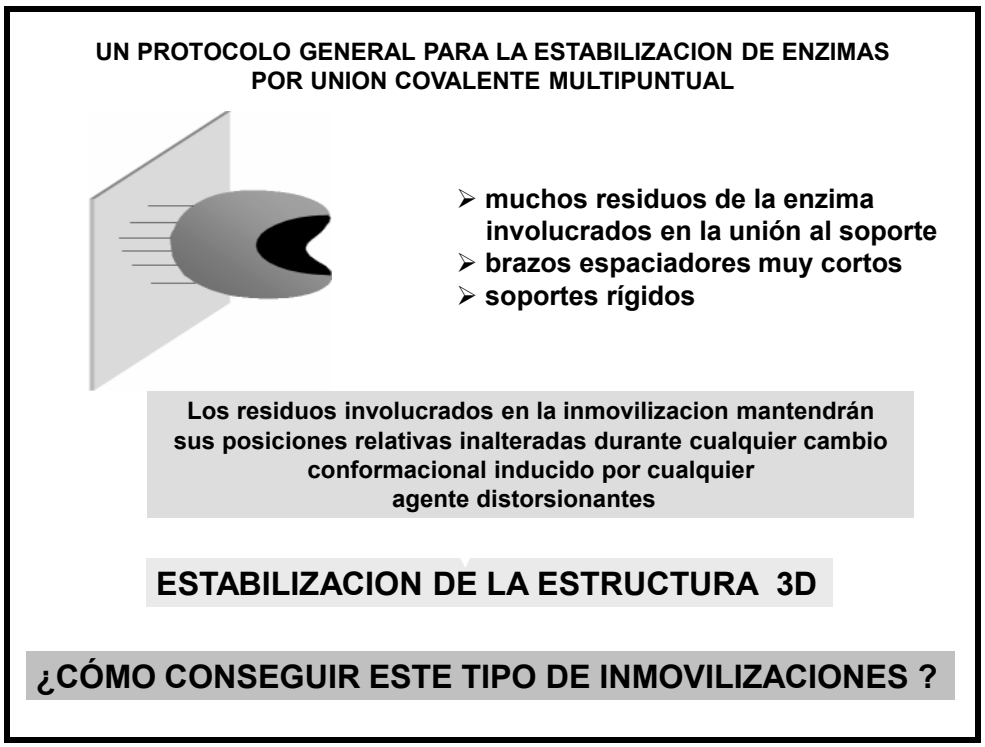


Figura 8.

En principio, deberíamos hacer varias consideraciones para establecer una buena estrategia de inmovilización covalente multipuntual:

a.- La superficie interna de los soportes (poros cilíndricos, fibras muy gruesas, etc.) debería tener una buena congruencia geométrica con la superficie de la proteína.

b.- Los grupos reactivos del soporte deben estar muy próximos a su superficie.

c.- La enzima se debe inmovilizar a través de su región más rica en lisinas y no a través de su grupo amino más reactivo (p.e. el amino terminal). Este punto es el más complejo y requiere un planteamiento bastante original. Los grupos glioxil (pequeños aldehídos alifáticos: $-O-CH_2-CHO$) están muy próximos a la superficie del soporte y no inmovilizan enzimas a través de un único enlace intermolecular enzima-soporte, porque la base de Schiff formada es muy inestable. Este inconveniente se convierte en una ventaja clave para diseñar uniones covalentes multipuntuales muy intensas (19). De hecho, cuando utilizamos soportes muy activados (conteniendo hasta 100 µEq. de glioxil por gramo de soporte) y pH neutro, las enzimas con un único amino reactivo en estas condiciones, no se inmovilizan, porque la única base de Schiff formada es muy inestable. Sin embargo, en condiciones bastante alcalinas (p.e. pH 10) las enzimas con muchas lisinas reactivas se inmovilizan muy rápida e irreversiblemente sobre soportes altamente activados. En estas condiciones, la primera inmovilización ya ocurre entre varias lisinas de la enzima y varios grupos glioxil del soporte, formando simultáneamente varias bases de Schiff entre la enzima y el soporte. La enzima, se inmovilizará preferentemente por su región más rica en residuos Lys y esta región es precisamente la más adecuada para lograr una intensa unión covalente multipuntual. Paradójicamente, un método de inmovilización realmente muy poco útil a pH 7, se convierte en el método más adecuado para dirigir la inmovilización de la enzima a través de su región más rica en Lys (20) y no por el grupo amino más reactivo, aunque este sea miles de veces más reactivo que los amino de las lisinas.

d.- Los grupos reactivos del soporte deben ser muy estables a pH 10 para permitir prolongados procesos de interacción enzima-soporte a pH alcalino y aumentar así la intensidad de la unión covalente multipuntual.

e.- La modificación química de la enzima debe ser suave. La reducción de las bases de Schiff con concentraciones muy suaves de borohidruro sódico, las convierte en enlaces amino secundarios. De este modo, a pesar de formar varios enlaces enzima-soporte, la única modificación química de la enzima es la transformación de varios grupos aminos primarios en varios aminos secundarios con propiedades físicas muy similares (p.e. grado de ionización a diferentes valores de pH).

f.- La superficie final del soporte debe ser completamente inerte. De este modo, evitamos interacciones indeseables enzima-soporte durante los procesos de distorsión (p.e. por calor, por disolventes orgánicos, etc.). La reducción suave con borohidruro, que finaliza con la unión multipuntual enzima-soporte, además de estabilizar los enlaces enzima-soporte, nos sirve para la reducción de los grupos aldehído a grupos hidroxilo totalmente inertes e hidrofílicos.

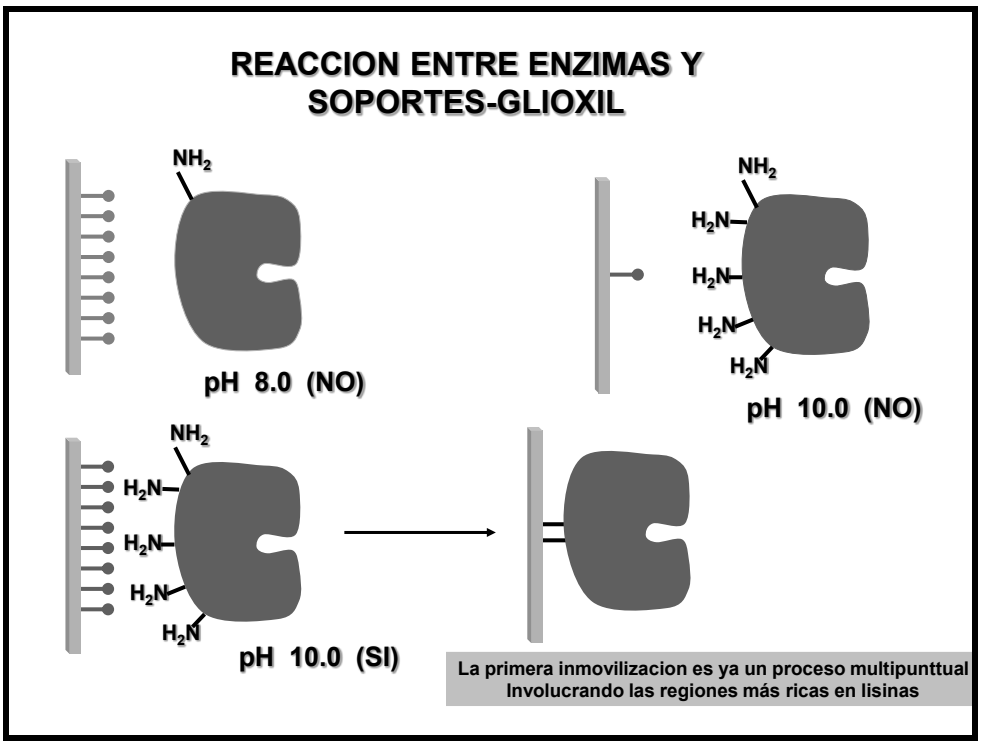


Figura 9.

Utilizando esta nueva metodología de inmovilización, más de 50 enzimas industriales fueron inmovilizadas y estabilizadas. En algunos casos, se

obtuvieron estabilizaciones superiores a 10.000 veces y asociadas a pérdidas muy pequeñas de actividad catalítica (p.e. pérdidas del orden del 25%).

Las estabilizaciones, se calcularon comparando las inactivaciones de las enzimas estabilizadas con las enzimas correspondientes inmovilizadas por unión covalente unipuntual (utilizando un soporte con un grado de activación muy bajo).

De este modo, los efectos beneficiosos de la inmovilización (previniendo algunas causas de inactivación), eran similares para los dos derivados comparados y las estabilizaciones observadas correspondían realmente a estabilizaciones de la estructura tridimensional de las enzimas inmovilizadas por unión covalente multipuntual.

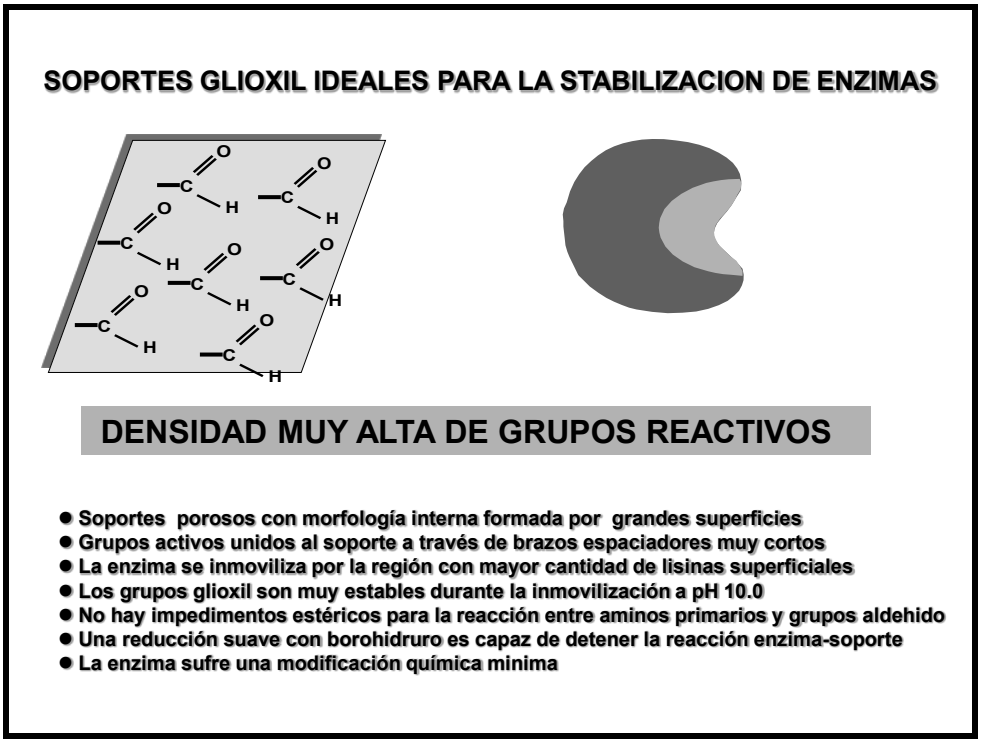


Figura 10.

Por otro lado, la estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual debe ser efectiva frente a cualquier agente distorsionante: calor, codisolventes, concentraciones saturadas de disolventes inmiscibles, elevadas concentraciones de agentes caotrópicos (urea, guanidina), etc.

Los geles de agarosa, cuya estructura interna está formada por fibras muy gruesas, son excelentes soportes para este tipo de estabilizaciones, ya que tienen una muy alta densidad de grupos hidroxilos superficiales, que se pueden modificar para obtener una alta densidad de grupos glioxil. Estos soportes serían muy útiles, a escala industrial, para trabajar en medios acuosos y mezclas agua –codisolventes en reactores tipo tanque agitado. Sin embargo, también se pueden desarrollar protocolos similares con muchos otros soportes, que contengan diferentes propiedades mecánicas y diferente resistencia a disolventes anhidros: vidrio poroso, soportes acrílicos, celulosa, nanopartículas magnéticas, etc.

B. Otros métodos de mejora de las propiedades de las enzimas por técnicas de inmovilización y post-inmovilización

i.- Hiperactivación de lipasas. Las lipasas presentan una baja actividad catalítica en medios completamente acuosos, pero se hiperactivan en contacto con gotas de aceites (activación interfacial). Un fenómeno similar se puede diseñar adsorbiendo las lipasas sobre soportes hidrofóbicos (21). Por ejemplo, la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* aumenta 20 veces su actividad tras la adsorción sobre octil-agarosa.

ii.- Rigidificacion orientada y dirigida. La promoción de uniones covalentes multipuntuales de diferentes regiones de la superficie de una enzima (además de un región más rica en lisinas) puede rigidificar regiones cercanas al centro activo y modificar la selectividad de lipasas y otras enzimas hacia substratos no naturales (22).

iii.- Estabilización por técnicas post-inmovilizacion. La modificación física de la superficie de enzimas inmovilizadas con polímeros altamente hidrofílicos puede aumentar drásticamente su estabilidad frente a codisolventes orgánicos.

iv.- Reactivación de enzimas inmovilizadas. Cuando una enzima se inactiva en condiciones químicamente inertes, su estructura primaria permanece intacta y solo puede sufrir cambios conformacionales. Estos cambios, se pueden revertir fácilmente, sobre todo cuando la enzima está inmovilizada sobre un soporte. A veces, la simple reincubación en condiciones

experimentales muy suaves (pH 7, 25 ºC) puede favorecer la reactivación (23). Otras veces, es necesario desplegar estructuras incorrectas estables (p.e. utilizando guanidina) para que la enzima pueda recuperar toda la actividad catalítica inicial.

5. CONCLUSIONES

La purificación e inmovilización correcta de una enzima nos permite inmovilizar una gran cantidad de la enzima de interés por unidad de volumen de biocatalizador y nos permite retener un elevado porcentaje de actividad catalítica por molécula de enzima inmovilizada. De este modo, se pueden preparar catalizadores muy activos sin interferencias de otras actividades enzimáticas indeseables.

A corto o medio plazo, la inmensa mayoría de las enzimas industriales serán recombinantes y su purificación será muy sencilla, ya que las enzimas podrán contener dominios de afinidad (p.e. colas de poli-His) que facilitan enormemente su purificación.

También, existen numerosos métodos sencillos y de bajo coste para la inmovilización de enzimas, aunque en la mayoría de los casos apenas mejoran las propiedades funcionales de las enzimas de interés. Se pueden utilizar soportes comerciales con excelentes propiedades mecánicas para ser usados en cualquier tipo de reactor o en cualquier medio de reacción (acuoso, líquidos iónicos, disolventes orgánicos, etc.).

Coexisten también algunos protocolos de inmovilización más complejos que permiten mejorar enormemente las propiedades funcionales de las enzimas (actividad, estabilidad, selectividad, posibilidades de reactivación, etc.). Esta mejora de las propiedades funcionales por técnicas de inmovilización, representa un complemento ideal de otras disciplinas muy variadas: Microbiología, Biología Molecular, Ingeniería del Reactor, etc. De este modo, la implantación masiva de las enzimas como catalizadores industriales está cada día más cercana. Las enzimas se pueden utilizar en procesos de alto valor añadido (p.e. obtención de compuestos ópticamente puros) o en procesos

de muy bajo valor añadido (p.e. síntesis de biodiesel, eliminación de lactosa en leche, etc.). En cada caso, los diferentes métodos de inmovilización y de mejora de las propiedades de las enzimas deben de ser valorados.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Koeller, K.M., Wong, C.H., Enzymes for chemical synthesis. Nature 2001, **409,** 232–240.

2. Bickerstaff, G.F., Immobilization of enzymes and cells: Methods in Biotechnology 1; Humana Press: Totowa. 1997.

3. Guisan J.M. Immobilization of enzymes and cells, second edition: Methods in Biotechnology 22; Humana Press: Totowa. 2006..

4. Katchalski-Katzir, E., Kraemer, D..M., Eupergit ® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. J. Mol. Catal, B: Enzymatic. 2000, 10, 157-176.

5. Cao, L. Immobilised enzymes: science or art?. Curr. Opin. Chem. Biol, 2005, 9, 217-226 .

6. Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P C, Protein thermostability in extremophiles. Biochimie, 1998, 80, 933-941.

7. Fuentes, M.; Maquiese, J.V.; Pessela, B.C.C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Mateo*, C.; Guisán, J.M. (2004). "New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins" Biotechnol Progr. 20, **284 - 288**

8. Alonso-Morales, N.; Lopez-Gallego, F.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. (2004). "Reversible immobilization of Glutaryl acylase on Sepabeads coated with polyethyleneimine". Biotechnol. Progr. 20, 533 – 536.

9. Torres, R.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Palomo, J.M.; Ortiz, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Tam, A.; Daminati, M. (2003). "Reversible immobilization of invertase on Sepabeads-polyethylenimine: stabilization of a multimeric enzyme" Biotechnol. Progr. 18, 1221-1226.

10. Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Lawson, D M; Turkenburg, J P; Bjorkling, F; Huge-Jensen, B; Patkar, S A; Thim et al.,. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature. 1991, 351, 491-494.

11. Brena B, and Batista-Vieria F. "Immobilization of Enzymes. A literature survey" in Immobilization of enzymes and cells, second edition: Jose M. Guisan ed. Methods in Biotechnology 22; Humana Press: Totowa. NJ. USA. 2006.

12. Axén R, Portath J and Ernback S. “Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogens halides”. Nature, 1067, 214, 1302-1304.

13. Monsan P., Puzo G., and Mazarguil H. On the mechanism of the formation of glutaraldehyde protein bonds. Biochimie, 1975, 57, 1281-1292

14. Mateo C., Abian O., Fernandez-Lorente G., Pedroche J. Fernandez-Lafuente R. and Guisan J.M.. “Sepabeads: a novel epoxy-support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment”. Biotechnol. Progr. 2002. 18, 629-634.

15. Margolin, A. L., and Navia, M. A. (2001) Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew. Chem. Int. Ed. 40*, 2204-2222; Lalonde, J. (1997) Clecs. 2

16. Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase**.** Organ. Lett. 2000, 2, 1361-1364.

17. Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. (2007) Enzyme and Microbial Technology, 40 (6), pp. 1451-1463

18. Mozhaev, V.V., Melik-Nubarov, N.S., Sergeeva, M.V., Sikrnis, V., Martinek, K., Strategy for stabilising enzymes. I. Increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. Biocatalysis, 1990, 3, 179–187.

19. Guisan J.M. Immobilization and Stabilization of Enzymes on Aldehyde-Agarose Gels. Enzyme and Microbial Technology, 1988, 10(6), 375-382.

20. Mateo, C, Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini ,C.et al.. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. Enzyme Microb. Technol. 2005, 37, 456-462.

21. Fernández-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernández-Lafuente, R., Dalmases, P., Huguet, J., Guisán, J.M. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilisation: Enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilised Pseudomonas lipase. Enzyme Microb. Technol. 2001, 28, 389-396.

22. Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M. Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M. Modulation of the enantioselectivity of Candida antarctica B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (±)-α-hydroxy-phenylacetic acid derivatives Tetrahedron: Asymmetry. 2002,13, 1337-1345.

23. Mozhaev, V.V., Berezin, I.V., Martinek, K. Reactivation of immobilized enzymes.(1987) Methods in Enzymology, 135, pp. 586-596.

Capítulo IV

APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS ENTERAS COMO BIOCATALIZADORES A LA SÍNTESIS DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

Josep Vicent Sinisterra Gago

RESUMEN

Las reacciones catalizadas por enzimas han sido abundantemente usadas tanto a escala de laboratorio o industrial. Por el contrario, las reacciones catalizadas por células enteras solo se emplean en casos muy concretos, a pesar de que los tremendos avances de la Biología Molecular, la Metagenómica, la Evolución Dirigida etc., han abierto la puerta al diseño del microorganismo "a la carta" para cada proceso industrial. Las células enteras son muy accesibles y más económicas que las enzimas, pero conducen muchas veces a productos secundarios. Los procesos catalizados por células se circunscriben a tres casos: i) cuando la enzima necesita una coenzima, ii) cuando se trabaja en un proceso multi-enzimático y iii) cuando la enzima es intracelular y difícilmente aislable. En este capítulo, se van a presentar algunos ejemplos de interés para la industria farmacéutica tales como: reducciones estereoselectivas, hidroxilaciones de arenos y de alcanos no-funcionalizados, procesos de mono-oxigenación y síntesis en un solo paso de nucleósidos. El trabajo, se centrará en la alta quimio-, regio- y estereoselectividad así como en la sostenibilidad del proceso.

Palabras clave: Células; Reacciones estereoselectivas; Química sostenible.

ABSTRACT

Whole cell applications as catalysts for the synthesis of pharmaceutical

Enzyme catalyzed reactions are commonly used at laboratory or industrial scale. Contrarily, the whole cells catalyzed reactions are restricted to special cases. The tremendous advances in the last years in Molecular Biology, Metagenomics and more specifically in Metabolic Engineering and in Directed Enzyme Evolution have opened the door to create tailor-made microorganisms or “designer bugs” for industrial purposes. Whole cells catalysts can be much more readily and inexpensively prepared than purified enzymes. Three situations have traditionally been considered convenient to select the use of whole cell catalyzed processes against the free enzyme catalyzed process: i) when the enzyme needs a coenzyme to carry out the catalytic act, iii) in the development of multi-enzymatic processes and iii) when the enzyme is intracellular and its isolation is complicated. In this chapter we will focused towards interesting reactions for pharmaceutical industry such as: stereoselective reductions, hydroxylations of arenes and un-functionalized alkanes, mono-oxygenations, and one-pot nucleoside synthesis.

Keywords: Cell; Stereoselective reaction; Green chemistry.

1. INTRODUCCIÓN

Los biocatalizadores se están introduciendo cada día más en los procesos industriales de síntesis de moléculas de alto valor añadido, cambiando muchos planteamientos de la Química Orgánica Industrial. Hay una serie de factores que están contribuyendo a este hecho entre los que podemos citar: i) rápido aumento del número de enzimas accesibles como resultado de las modernas técnicas de ingeniería genética, ii) la robustez de la evolución dirigida (racional, semiracional o aleatoria), iii) el desarrollo de las técnicas de screening de alta eficacia, iv) la capacidad de expresar en microorganismos

huéspedes de genomas de extremófilos, v) los nuevos descubrimientos realizados utilizando la Metagenómica etc.

Junto a esto, se encuentra la introducción en el ámbito industrial, tanto por motivos medioambientales como por imperativos legales, de los principios de la Química Sostenible (Green Chemistry) como son: i) el factor E, que mide la cantidad de desechos producidos en un proceso, y que se expresa como relación en peso (E= residuos/producto) (1); ii) el concepto de economía atómica que nos lleva a buscar procesos donde el producto final incorpore todos o la inmensa mayoría de los átomos de los reactivos iniciales: iii) el concepto de intensificación de procesos que busca reducir el tamaño de los bioreactores aumentando su eficacia etc. (2,3). Todo ello, es posible gracias a la elevada quimio- regio- y estéreo selectividad de los biocatalizadores

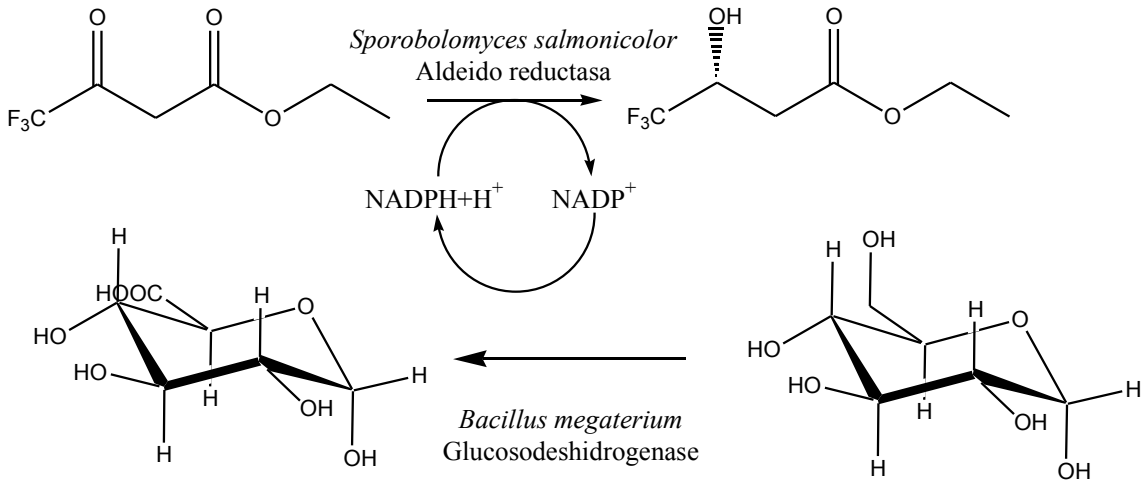
Por último, indicar la importancia que están adquiriendo los disolventes empleados en los procesos sintéticos. No en balde, la industria farmacéutica es una de las máximas generadoras de contaminantes y residuos, ya que la relación en peso residuo/producto varía de 100 a 1.000, siendo la mayoría de los residuos los disolventes empleados en el proceso (4). Dado que los biocatalizadores pueden trabajar con los llamados disolventes verdes (5), la introducción de procesos biocatalizados en un esquema de síntesis aumenta siempre el carácter sostenible del mismo.

2. REDUCCIONES ESTEREOSELECTIVAS

Es de sobra conocido que cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica suele presentar distinta farmacocinética, biodisponibilidad y actividad farmacológica. Por ello, la preparación de fármacos homoquirales es una norma en la actual industria (6). Los alcoholes homoquirales son intermedios clave en la preparación de muchos fármacos. Su preparación mediante la reducción estereoselectiva de cetonas empleando enzimas es un método clásico en las biotransformaciones (7,8).

Las bio-reducciones, necesitan de una cantidad estequiométrica de cetona y de coenzima y pueden llevarse a cabo empleando células enteras o

enzimas. Ambos procesos tienen sus ventajas e inconvenientes. El proceso catalizado por células tiene el inconveniente de la presencia de productos secundarios, debido a la actividad de la máquina celular, teniéndose además que separar el producto del medio de cultivo y de la biomasa. No obstante, las células son mucho más económicas y accesibles que las enzimas. Por el contrario, el empleo de enzimas simplifica el aislamiento del producto al no haber reacciones secundarias, pero tiene como inconvenientes el mismo proceso de producción y aislamiento de la enzima y el de la regeneración de la co-enzima NAD(P)H/H^+. Este problema no ha sido resuelto *in vitro* y a gran escala, a pesar de diversos intentos usando mediadores electrónicos (9), procesos electroquímicos (10), complejos organometálicos (11), procesos fotoquímicos (12) o utilizando una segunda enzima acoplada como son la lacasa, la formiato deshidrogenasa, o la glucosa-dehidrogenasa (13) (Esquema 1).

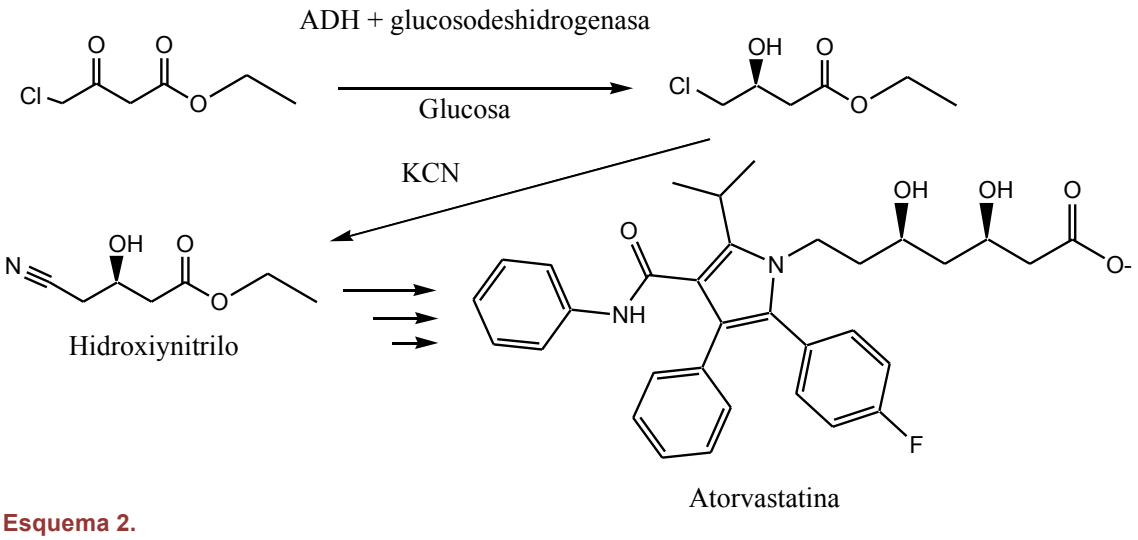


Esquema 1.

Las células, se pueden utilizar libres o inmovilizadas en distintas matrices y generalmente vía atrapamiento en agar/agarosa, alginato de calcio o bario, o poliacrilamida (7), adsorbidas en espuma de poliuretano (14) y otros medios. La inmovilización produce una estabilización de la célula frente a agentes externos y facilita la recuperación del biocatalizador (15).

Como ejemplos de aplicación industrial de esta reacción podemos citar la síntesis del hidroxinitrilo (Esquema 2), que es un intermedio clave en la

síntesis de la Atorvastatina, comercializada tanto por Pfizer como por Lipitor™ y muy utilizado para el tratamiento de hipercolesterolemias. El proceso fue desarrollado por los investigadores de Codexis (16), que mediante ingeniería genética expresaron en *E. coli* la alcohol deshidrogenasa de *C. Magnoliae*, la glucosa-deshidrogenasa de *B. megaterium*, y la halohidrina deshidrogenasa obtenida por evolución dirigida. El organismo genéticamente modificado (OGM) permite obtener el hidroxinitrilo homoquiral (99% e.e) (16). Cabe indicar que la obtención del quirón se hace al principio del proceso de síntesis para reducir el tamaño del reactor en los pasos sucesivos de síntesis.

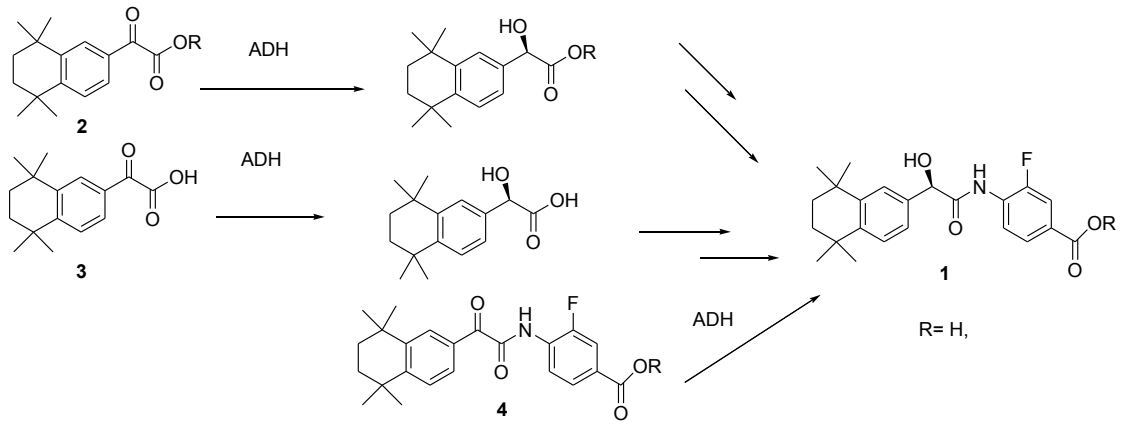


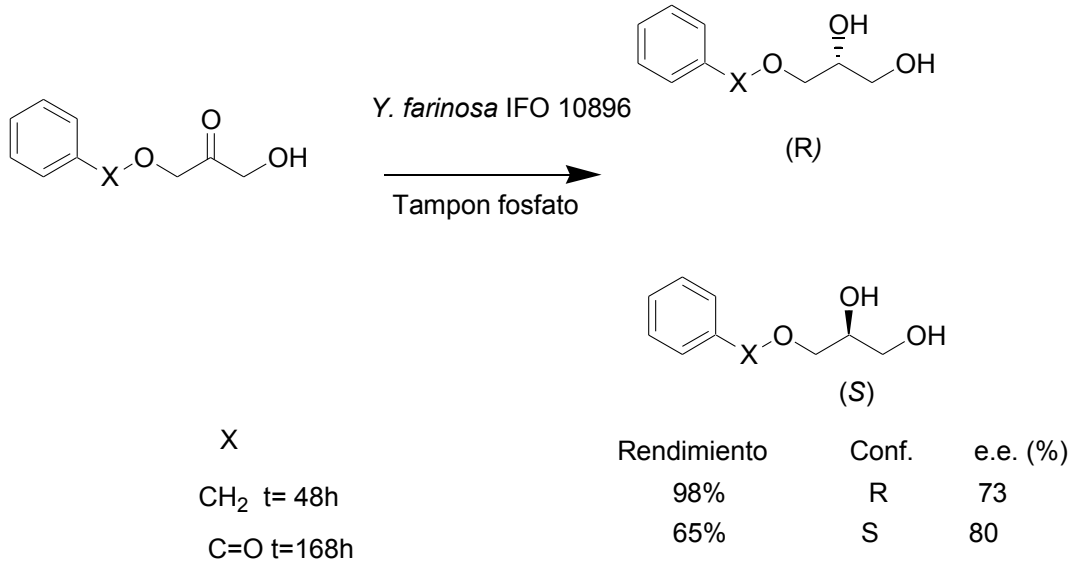
Esquema 2.

Otro ejemplo, es la síntesis del ácido (R)-3-Fluoro-4-[[hidroxi-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil – 2 –naftalenil)acetil]amino]benzoico (1), que es un agonista específico del receptor gamma del ácido retinoico con actividad dermatológica y anti-tumoral. La síntesis, la describieron Patel y col. (17) del Bristol Myers Squibb Research Institute (USA). mediante la reducción estereoselectiva (e.e. >98%) a partir del cetoester 2, del cetoacido 3 o de la cetoamida 4 (Esquema 3).

Por lo que se refiere al curso estereoquímico, hay que indicar que las ADH comercialmente accesibles suelen seguir la regla de Prelog, obteniéndose el alcohol de configuración S. Para poder obtener el otro enantiómero como producto mayoritario, se han hecho una serie de búsquedas en distintas colecciones públicas o privadas. Tsujigami y col. (18a) describieron la

Yamadazyma farinosa IFO 10896 que conducía a la reducción de α-hidroxi-cetonas con buenos excesos enantioméricos (Esquema 4).





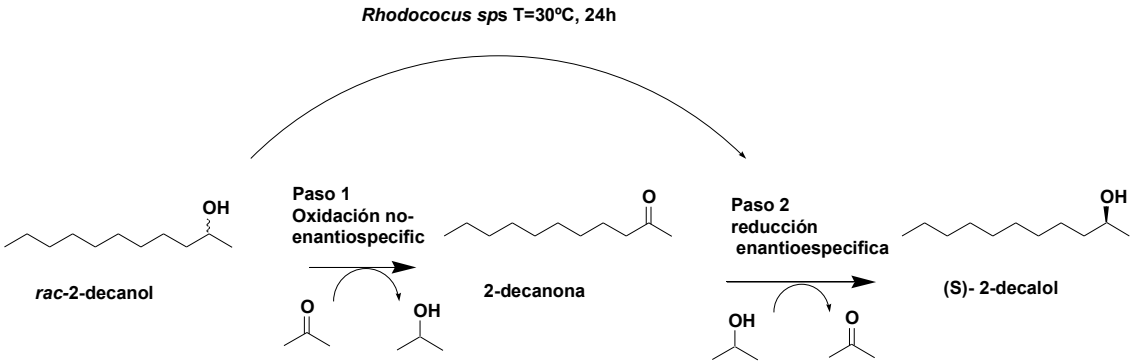
Esquemas 3 y 4.

3. OXIDACIÓN DE ALCOHOLES

La oxidación de alcoholes es un proceso que pocas veces tiene problemas a nivel de la Síntesis Orgánica tradicional. Solamente es interesante la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos, sin que se forme el ácido carboxílico. El proceso se ha llevado cabo en nuestros laboratorios utilizando

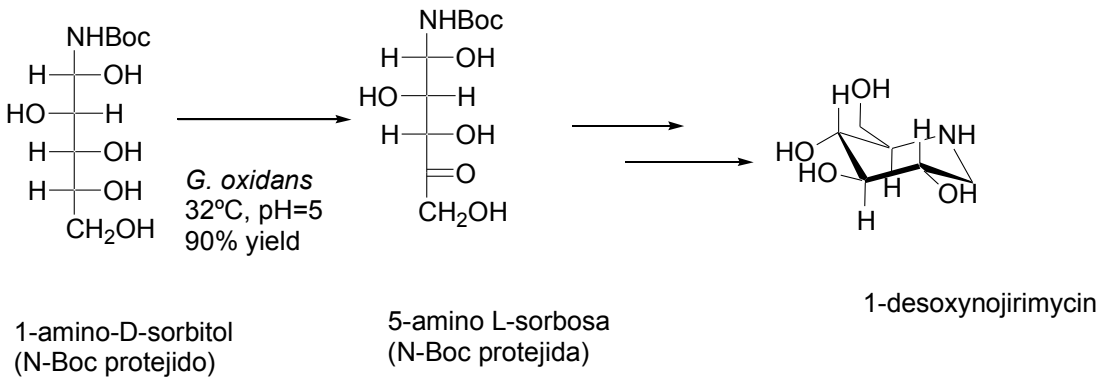
las ADHs intracelulares de *Acetobacter acetii* o *Gluconobacter oxidans* (19) (Villa y col., 2002).

Otro proceso inaccesible a la Síntesis Orgánica es la des-racemización de alcoholes. Voss y col. (20) describieron la des-racemización del rac- 2-decanol vía inversión combinada con una secuencia reducción/oxidación. Se usan células liofilizadas de *Rhodococcus sp* CBS 717.73 o *Rhodococcus ruber* DSM 44541. El proceso ocurre a 30ºC y con una concentración de 10 g/L de sustrato. Se obtiene un 82% de rendimiento y un 92% ee donde el (S)-2-decanol es el mayoritario. El proceso trascurre usando la pareja iso-propanol/acetona como sustratos secundarios. La reacción ocurre en dos etapas en un proceso one-pot. El proceso se ha escalado con *Rhodococus p* 312 CBS 71.73 a un volumen de reacción de 440 mL, obteniendo un 82% del (S)- 2-decanol (ee 92%), aislado (Esquema 5).



Esquema 5.

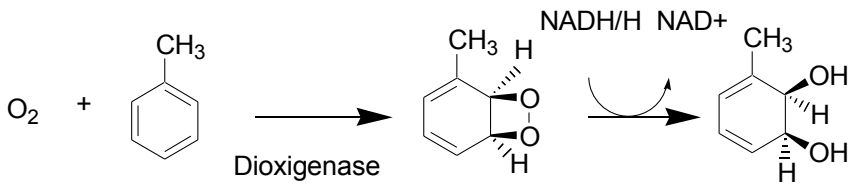
Quizás el proceso de oxidación estereoselectiva de polioles más popular a nivel industrial, sea la síntesis de 6-aminoalkyl-L-sorbosa a partir de 1-aminoBoc-D-sorbitol, usando células suspendidas de *Gluconobacter oxidans* (Bayer AG, Germany) (8). El proceso se realiza en un reactor tipo discontinuo (10.000 L) a 32ºC, pH=5 y [substrato]=1M. La 6-Amino-L-sorbosa es el intermedio clave en la síntesis de inhibidores de la α-glucosidasa y en la del antidabético 1-desoxynojirimycin (Esquema 6).



Esquema 6.

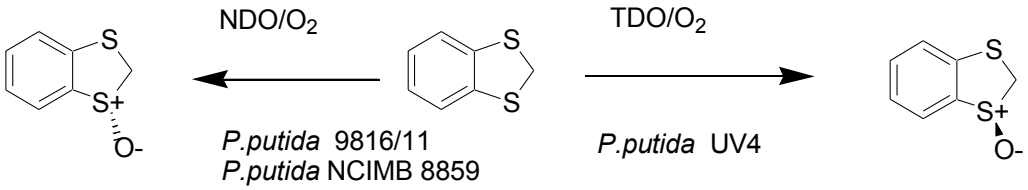
4. DIHIDROXILACIÓN DE ARENOS

Las enzimas intracelulares que oxidan anillos aromáticos a 1,2-cis-dihidrodiol son interesantes, pues estos compuestos no son accesibles por métodos químicos. El proceso ocurre mediante un complejo multienzimático dependiente del NADH que degrada los anillos aromáticos vía oxidación. Utilizando un mutante de *Pseudomonas putida* que carece de cis-dihidrodiol dehidrogenasa, puede excretar el cis-dihydrodiol (Esquema 7), el cual es el producto de partida para la preparación de productos de interés industrial como el pinitol o el fosfato de inositol. Este mutante, se ha usado en la preparación de cis-dihidrodioles de tolueno, naftaleno, benzofurano, quinolina, isoquinolina etc. El proceso se hace en condiciones bifásicas usando la célula atrapada en alginato de bario y un 20% de tetradecano/80% de tampón fosfato. La productividad lograda es de 86,5 g/L de cis-diol aislado (15).



Esquema 7.

La tolueno dioxigenasa (TDO) y la naftalenodioxigenasa de *P. putida* se han utilizado en la preparación de un sulfoxido quiral, intermedio en la síntesis del omeprazol (Esquema 8). El proceso da un 30% de rendimiento y un e.e >90%, trabajando en un bioreactor de 10 L y con 10g de sustrato (21).



Esquema 8.

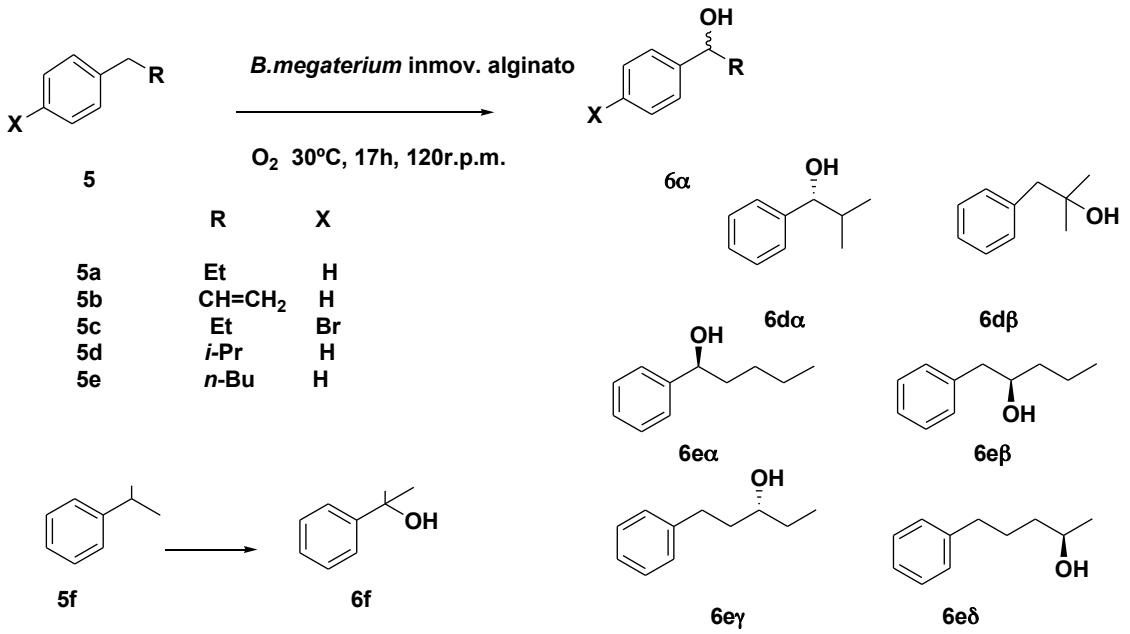
5. HIDROXILACIÓN DE ALCANOS NO-FUNCIONALIZADOS

5.1. Hidroxilación de alcanos y terpenos

La hidroxilación asimétrica de CH_2 proquirales no-funcionalizados catalizada por monoxigenasas libres o incluidas en células enteras es un método muy interesante para obtener alcoholes quirales con buenos rendimientos y e.e. Para la reacción de hidroxilación se utilizan hongos como *Rhizopus nigricans, Mortiella isabellina y Cunninghamella elegans*. El proceso se ha centrado en la industria en la hidroxilación de terpenos o de esteroides

Recientemente Adam y col (22), han descrito la monohidroxilación estreoselelctiva (e.e.>99%) de alquilbencenos (Esquema 9), usando células enteras de *Bacillus megaterium* inmovilizadas en alginato. El proceso está catalizado por un Citocromo P450 intracelular, cuya sobreexpresión se produce al hacer crecer a las células en presencia de fenobarbital. El proceso conduce a la oxidación bencílica como producto mayoritario (Tabla I).

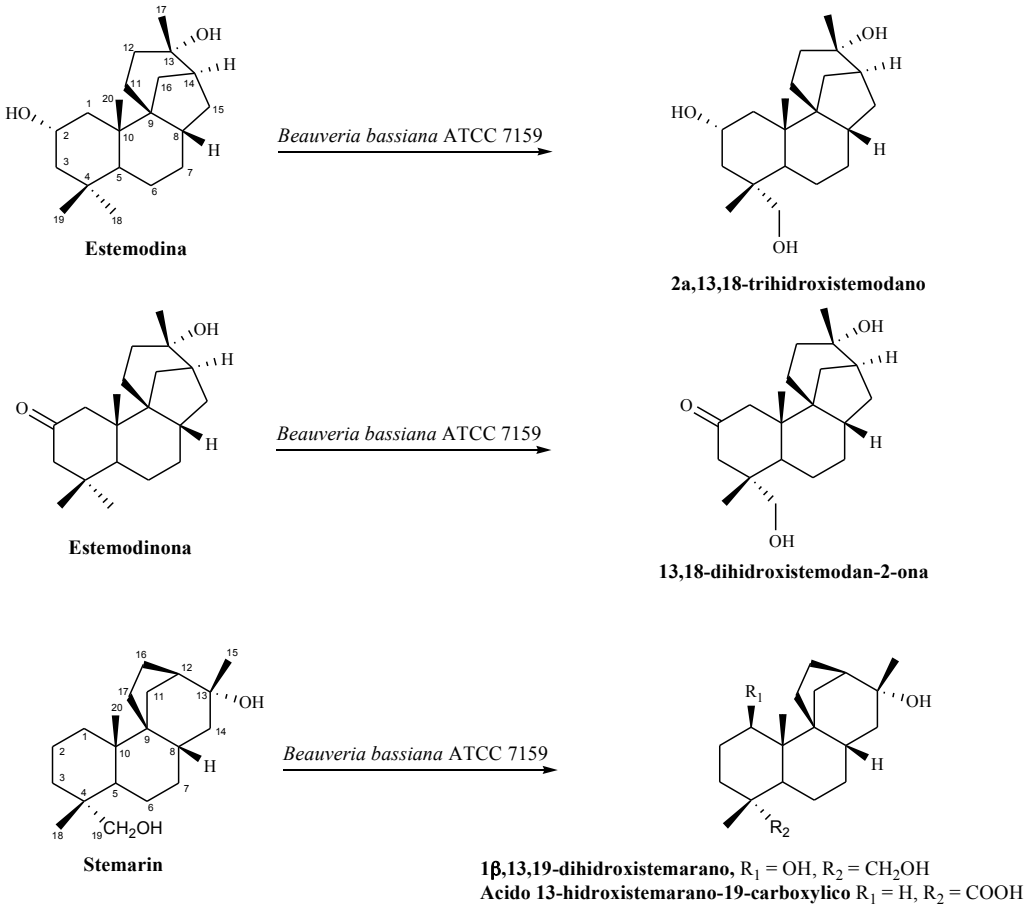
La biotransformación de diterpenos, triterpenos y terpenoides en moléculas de alto valor añadido o en cabezas de serie para la industria farmacéutica es una línea de investigación muy fructífera. El grupo de Reese (23) ha trabajado en la oxidación de sesquiterpenos y diterpenos, habiendo realizado biotransformaciones catalizadas por Beauveria bassiana ATCC 7159 o Stemodia maritima L. de terpenos como la estemodina, la estemodinona y la estemarina (24). La estemodina dio 2α,13,18-trihidroxi-estemodano, la estemodinona dio 13,18-dihidroxi-estemodan-2-ona y la estemarina dio dos compuestos: el 1β,13,19-trihidroxiestemarano y el ácido 13-hidroxi-estemarano-19-carboxilico (Esquema 10).



Esquema 9.

Tabla I. Regio- y enantioselectividades en la hidroxilación de alquilbencenos usando células enteras de B. megaterium (modificada de cita 21).

Sustrato	Producto	Rendimiento alcohol (%)	Regioselectividad (%)	ee (%) Configuración
5a	6aα	63	100	74(R)
5b	6bα	49	96	70(R)
5c	6cα	95	100	68(R)
5d	6dα	43	31	91(R)
	6dβ		69	
5e	6eα	89	29	42(S)
	6eβ		33	88(R)
	6eγ		9	86(R)
	6eδ		14	>99(S)
5f	7fα	95	100	

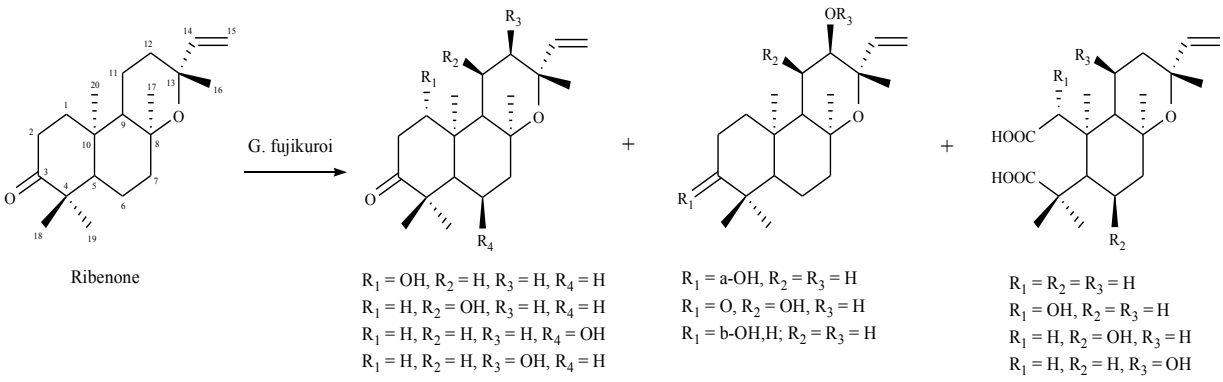


Esquema 10.

El mismo grupo, ha estudiado en la biotransformación catalizada por *Rhizopus oryzae* ATCC 11145 de la estemodina y análogos, la influencia del grupo funcional en C-2 (25). Mientras en la estemodina, la hidroxilación ocurrió en C-7, C-3 y/o C-16, dando 2α,7β,13(S)-trihidroxiestemodano y 2α,3β,13(S),16α-tetrahidroxistemodano, la cetona estemodinona sufre la hidroxilación solo en C-6, dando 6α,13(S)-dihidroxiestemodan-2-ona.

La biotransformación de terpenoides usando hongos también se ha estudiado ampliamente por el grupo de Fraga y col. (26), especialmente con *Gibberella fujikuroi*. Este hongo, produce hormonas vegetales denominadas gibberellinas. En esta línea la biotransformación de la ribenona por *Gibberella fujikuroi* produjo diferentes metabolitos hidroxilados y 2,3-seco-acidos (Esquema 11) (27). Estos autores, han observado que la introducción de una

función oxigenada en la ribenona facilita la nueva oxidación de la molécula por el hongo, atribuyéndose esto a que un aumento en la polaridad del sustrato facilita el paso a través de las membranas. Fraga y col., también han investigado las biotransformaciones catalizadas por *Gibberella fujikuroi* sobre diferentes esqueletos terpénicos tales como el ent-pimareno (28) y ent-manoil oxido derivados (28). Estos mismos sustratos se han biotransformados por Gracia-Granados y col., usando *Curvularia lunata* (29), *Fusarium moniliformis* (30) y por Fraga y col. con *Mucor plumbeus* (31).



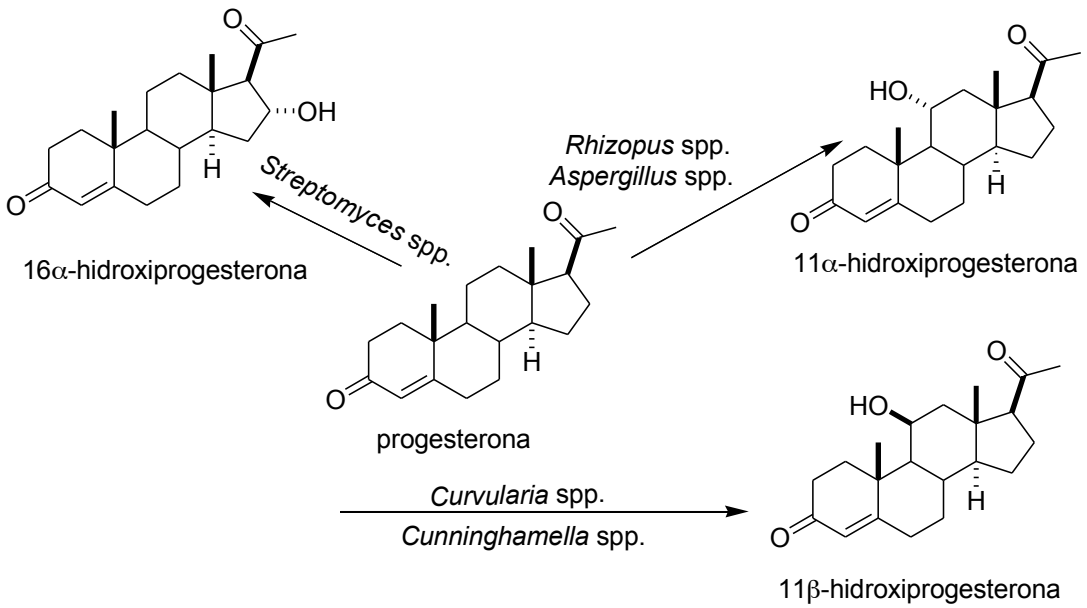
Esquema 11.

5.2. Hidroxilación de esteroides

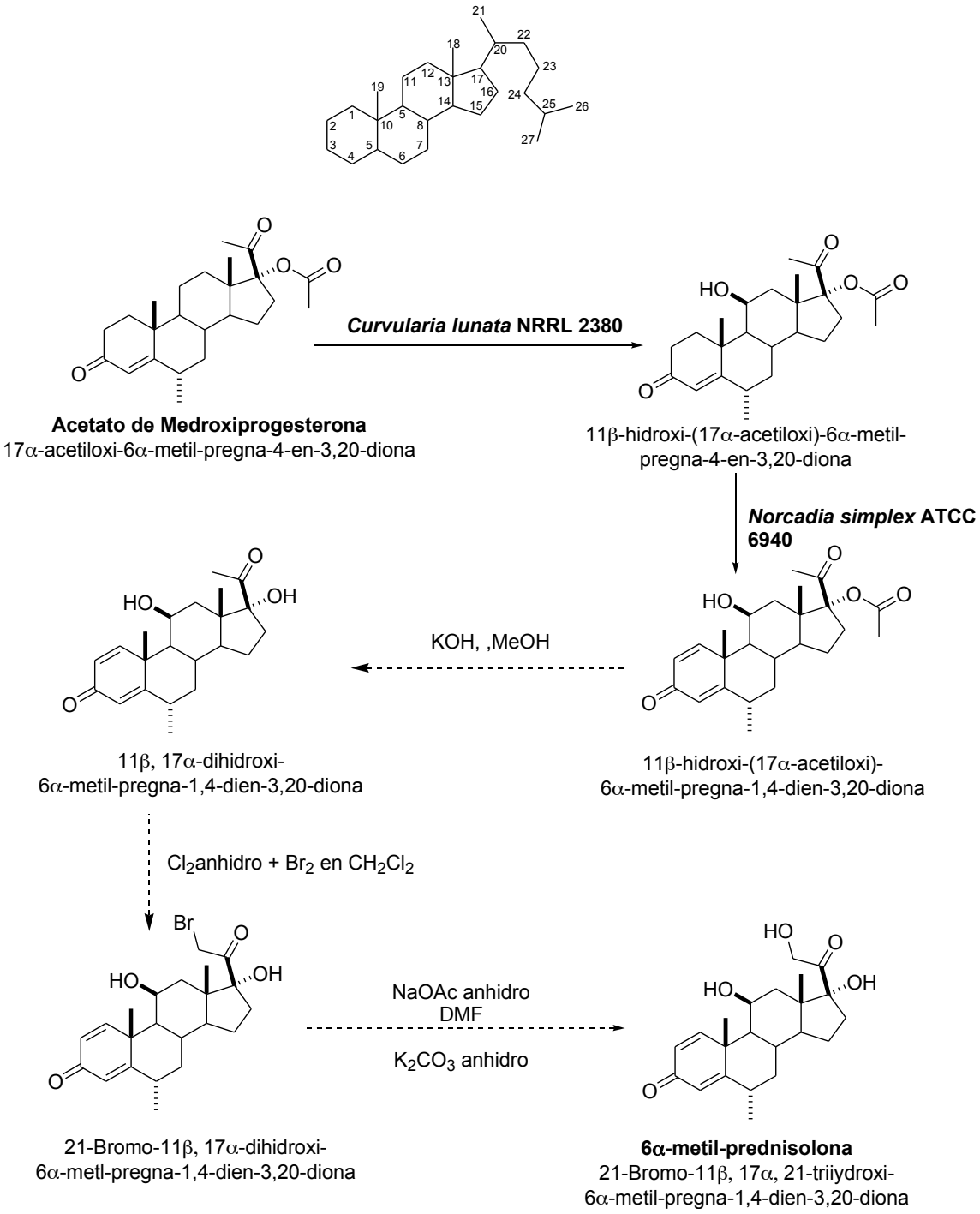
Los esteroides son moléculas de interés farmacológico usadas para el tratamiento o prevención de distintas enfermedades y en diversos campos como endocrinología, oncología, reumatología, ginecología, etc. La complejidad del esqueleto esteroídico y el elevado número de centros estereogénicos hace que su síntesis y su modificación sean líneas principales de trabajo en el campo de las Biotransformaciones (32).

Históricamente, la hidroxilacion en α -7 del colesterol usando *Proactinomyces roseus* en 1949 descrita por Kramli y Horvath fue el primer ejemplo de hidroxilación microbiana (8). Posteriormente, Upjohn Co, describió la transformación de progesterona en 11α-hidroxiprogesterona utilizando *Rhizopus arrhizus*. Bristol-Mayer-Squibb describió la misma reacción usando *Aspergillus niger*. La 11β-hidroxilación microbiana para dar derivados de cortisona simplificó la síntesis de corticoides eliminado entre 10-12 pasos de la

síntesis convencional a partir de ácido deoxicólico (8). La hidroxilacion biológica redujo el precio de la cortisona de 200$USA/g a 6$USA/g y posteriores avances lo han reducido hasta un valor≈ 2$USA/g. Actualmente, prácticamente cualquier centro esterogénico del esqueleto esteroídico puede ser estéreo específicamente hidroxilado utilizando microorganismos. Hoy en día, se puede decir que las hidroxilaciones en 11α-, 11β, 15α- y 16α se hacen industrialmente exclusivamente vía hidroxilación microbiana con buenos rendimientos y e.e., y bajos costos de operación (33). Las hidroxilaciónes en 11α-, 11β- y 16α se suelen llevar a cabo con *Rhizopus sp., Aspergillus sp., Curvularia sp., Cunninghamella sp.,o Streptomyces sp*., (Esquema 12). En el esquema 13 se muestra un ejemplo de proceso quimio-enzimático para la obtención de distintas estructuras de interés



Esquema 12.



Esquema 13.

La hidroxilación en 16α ha suscitado mucho interés al permitir la obtención de la triamcinolona, un eficiente anti-inflamatorio. El proceso se ha descrito para una serie de estreptomicetos (*Streptomyces sp., S. argenteolus y S. roseochromogenes*) y para *Nocardia sp.* Los actinos carecen de especificidad de sustrato pudiendo hacer la hidroxilación en 16α en

testosterona, 1-dehidrotestolactona, dehidroepiandrosterona (DHEA), pregnenolona, androst-5-en-3β,17β-diol, 3β-hidroxi-1,3,5-estratrien-17-ona y progesterona. El complejo enzimático responsable del proceso consta de un Citocromo P-450 acoplado a dos trasportadores de electrones como son la roseoredoxina y la roseoredoxin-reductasa. Esto se ha visto en *S. roseochromogenes* (8).

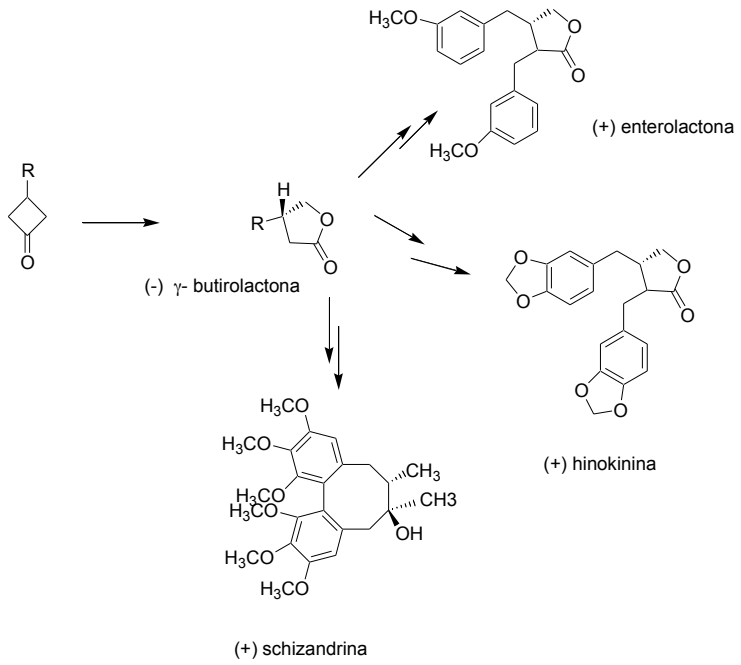
La hidroxilación en 15α se usa en la síntesis del anticonceptivo Desogestrel. La hidroxilación en 15α de la 13-etil-4-gonen-3,17-diona, permite la síntesis del intermedio clave en la producción del contraceptivo Gestoden. La biotrasformación se hace con células enteras de Penicillium raistrickii. La hidroxilación 15β del finasteride por *Cunninghamella elegans* ATCC 9244, se utiliza para obtener 4-aza-esteroides, que son eficientes inhibidores de la testosterona 5-reductasa. Esta enzima, es la responsable de la reducción de la testosterona a dihidro-testosterona, lo que está relacionado con el desarrollo del cáncer de próstata (8).

La hidroxilación en 9α por actinomicetos (32) se usa en la industria farmacéutica para obtener productos de partida para preparar 9α–halo-corticoides y 11-ceto esteroides. La reacción está catalizada por células enteras de *Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus y Mycobacterium*. Así células en no-crecimiento de *Rhodococcus sp*. catalizan la biotransformación de androst-4-ene-3,17-diona (AD) en 9α -hidroxi-AD (9α -OH-AD).

La hidroxilación en 7α de DHEA y de pregnelona (PRG) usando el micelio del hongo *Fusarium moniliforme,* permite obtener compuestos útiles en el tratamiento de algunos cánceres, del Alzheimer y en tratamientos anti-obesitdad y anti-glucocorticoides (33). La mayoría de estas terapias están relacionadas con la actividad de la 7α-hidroxi-PRG. La inducción de la enzima con DHEA hace aumentar las conversiones desde un 2% a un 65-80%, usando *F. moniliforme*. La hidroxilación en 7β del finasteride por *Mortierella isabellina* se puede hacer, pero con bajos rendimientos (20%).

6. REACCIÓN DE BAEYER- VILLIGER

La oxidación microbiana de Baeyer-Villiger tiene gran interés, pues permite obtener lactinas a partir de cetonas de manera regioselectiva. El proceso está catalizado por la denominada Baeyer-Villiger monoxigenasa (BVMO), que es dependiente de flavina y de NADH. La Acinetobacter calcoaceticus ciclohexano monoxigenasa (CHMO) se ha usado como referencia para optimizar la producción de la enzima por métodos convencionales microbiológicos y así poder estudiar la especificidad por el sustrato. El sustrato modelo para evaluar las BVMO es la rac-biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona que da (1R,2S) y (1S, 2R) lactonas (8). Las BVMOs tienen una baja termoestabilidad, habiéndose mejorado ésta por expresión de la enzima en *E. coli.* En el Esquema 14, mostramos la utilización de la BVMO de *Brevibacterium* (99%) y de *Comamonas* (76%) expresadas en *E. coli* para obtener con un 100% de estereoselectividad, la (-) γ- butirolactona que es el intermedio clave en la síntesis de enterolactona (antitumoral), hinokinina (citostático) y schizandrina (antifúngico).



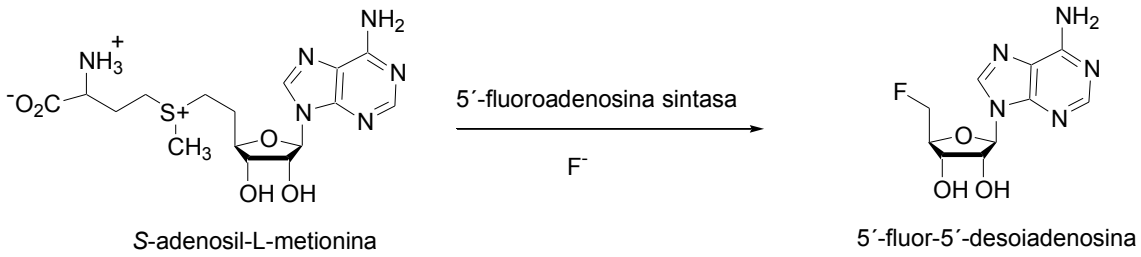
Esquema 14.

7. HALOPEROXIDASAS

Las haloperoxidasas catalizan la halogenación de compuestos orgánicos en presencia de iones haluro y agua oxigenada u otros peróxidos. Las haloperoxidasas se pueden clasificar en enzimas que contienen: i) un grupo hemo, ii) un ion vanadio, y iii) aquellas que no tiene iones metálicos.

La bromoperoxidasa de *Curvularia protuberata* MF5400, ha sido empleada en la conversión de indeno a trans-2S,1S-bromoindanol, intermedio de síntesis del inhibidor de la proteasa del HIV-1 Crixivan® (Merck Labs).

Finalmente, hay que destacar que la 5´-fluorodesoxiadenosina sintasa de S*treptomyces cattleya* cataliza la fluoración de S-adenosil-L-metionina en presencia de ion fluoruro para dar 5´-fluor-5´-desoxiadenosina (Esquema 15) (8).



S-adenosil-L-metionina

5´-fluor-5´-desoiadenosina

Esquema 15.

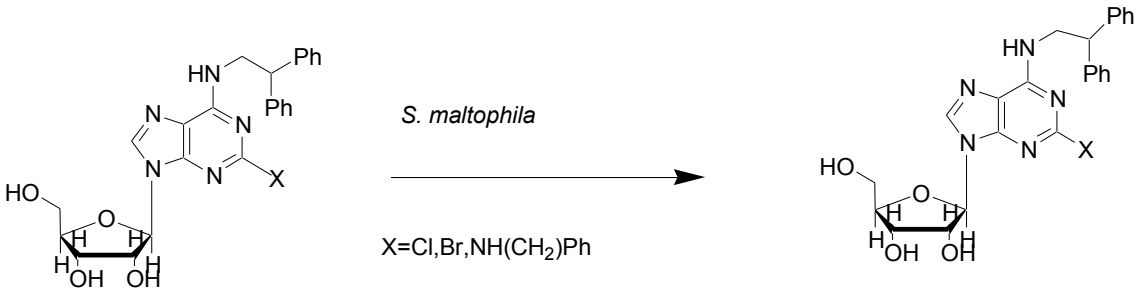
8. SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS USANDO CÉLULAS ENTERAS

Los nucleósidos están implicados en muchos procesos biológicos fundamentales entre los cuales destaca el almacenamiento y transferencia de la información genética. Es por ello, que los análogos de nucleósidos se usan en el tratamiento de enfermedades víricas, como antitumorales, como inhibidores del transporte de nucleósidos, en tratamiento de enfermedades del corazón etc. Se han desarrollado muchos métodos de síntesis química, pero dada la naturaleza lábil y polifuncional de estas moléculas quirales son necesarios muchos pasos de protección-desprotección, lo cual alarga su

síntesis y disminuye el rendimiento global (34). Dadas las altas estereoselectividades, condiciones suaves de reacción y especificidad de sustrato, el empleo de enzimas en la síntesis de nucleósidos modificados es una alternativa quimio-sostenible al proceso químico. Como siempre ocurre, las reacciones enzimáticas que no necesitan de co-enzimas como es la acilacion/desacilación de nucleósidos catalizada por lipasas, proteasas o acilasas (35,36) se llevan a cabo con enzimas libres. Por el contrario, la oxidación del grupo CH_2OH en C-5' a COOH catalizada por oxigenasas, que necesita de una coenzima y los procesos de transferencia de residuos glicosídicos catalizados por Nucleosido fosforilasas o N-2'-desoxiribosiltransferasas, que son procesos multi-enzimáticos, se realizan con células enteras.

8.1. Oxidación enzimática del CH_2OH en nucleósidos no naturales

La oxidación catalizada por células es más limpia que el proceso químico y no necesita de la protección de los otros grupos OH de la molécula. Esta reacción ha sido utilizada por Glaxo-SmithKline (GSK) para obtener una nueva familia de anti-inflamatorios (37,38). GCK utiliza la nucleósido-oxidasa de *Stenotrophomonas maltophila* FERM BP-2252, que muestra gran tolerancia por diferentes grupos funcionales en la base, especialmente en posición C-2, para la obtención de estos compuestos (39).



Esquema 16.

8.2. Síntesis de nucleósidos por transglicosilación

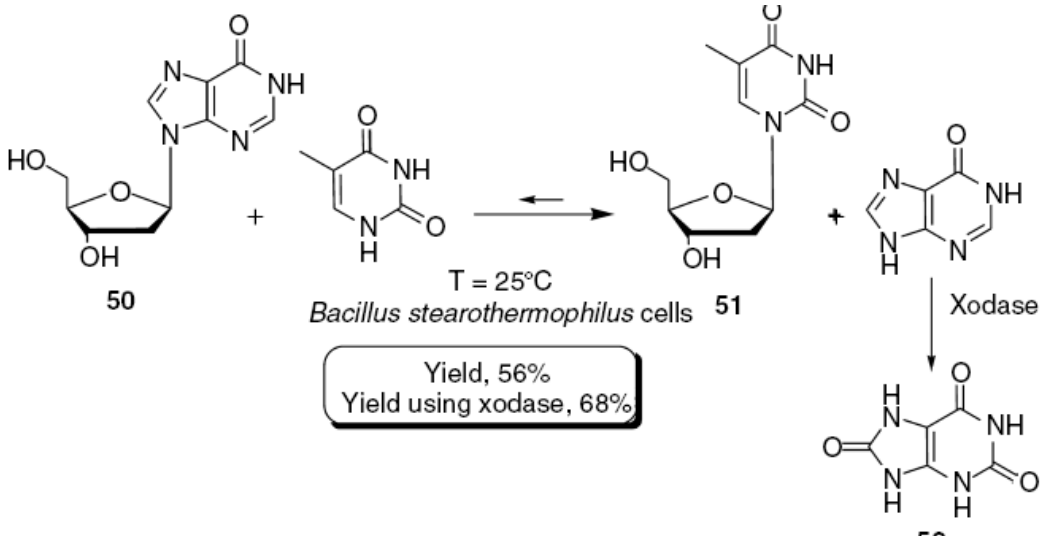
Los análogos de nucleósidos pueden preparase por intercambio de bases usando dos tipos de enzimas intracelulares: i) nucleosido fosforilasas o ii) N-2'-desoxiribosiltransferasas (38). Las nucleósido fosforilasas (NP) catalizan la fosforolisis reversible de nucleósidos y la reacción de transferencia puede

usar bases púricas o pirimidínicas. Purin (E.C.2.4.2.2) y pirimidin (E.C. 2.4.2.1) nucleósido fosforilasas, se han aislado de distintas familias de bacterias: *Bacillaceae, Enterobacteraceae, Lactobacillaceae, Photobacteraceae, Pseudomonaceae Psychrobacter Y Vibrionaceae*. (40,41). Estas enzimas tienen una escasa especificidad. Por el contrario, las N-2'-desoxiribosiltransferasas (EC.2.4.2.6.) catalizan específicamente el intercambio de base entre 2'-desoxiribosil nucleósidos (42). Para una mayor información sobre estas enzimas consultar la referencia de Condezo y col. (38).

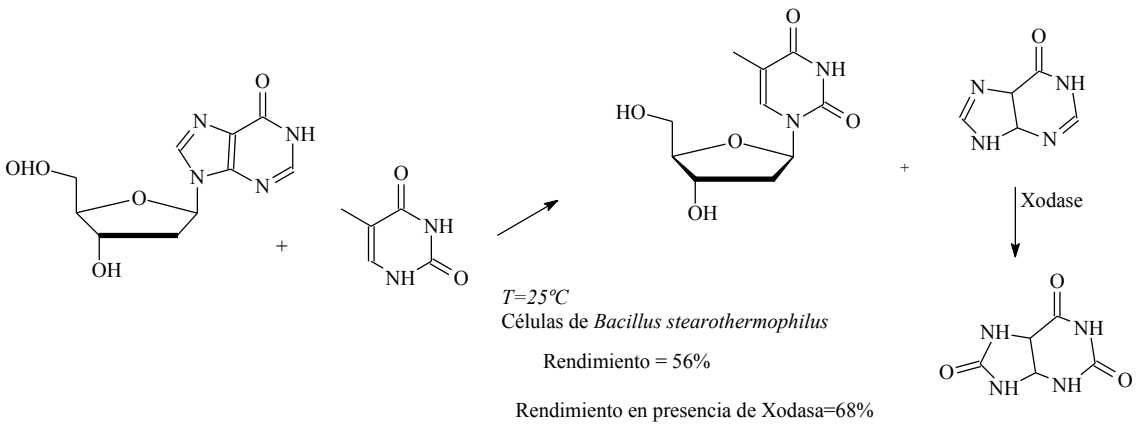
La síntesis de diferentes nucleósidos usando células enteras se ha descrito en la bibliografía (41,43,44). Kulikowska y col. (45), han descrito que la 7-metilguanosina y la 7-metilinosine son excelentes sustratos para las purin nucleósido fosforilasas (PNP) pero poco solubles en agua. Posteriormente Hennen y Wong (46), propusieron el uso de 7-metil-guanosinio o de 7-metilinosinio como donadores soluble en agua para lograr obtener nucleósidos en agua mediante un procesos irreversible y cuantitativo. Shirae y col. (47), describieron el uso de *E. coli* genéticamente modificada en condiciones de no-crecimiento para la preparación de 2',3'-dideoxiadenosine o 2',3'-dideoxinosina con rendimientos del 80-90%.

Rogert y col. (48), han usado *E. coli* BL21 recombinante para hacer ara-nucleósidos a partir de ara-uridina, usando células en estado de no crecimiento a 60ºC y pH=7. Murakami y col (49), describen el uso de células de *E. coli* JA-300 (50ºC y pH=6,5) en la síntesis de 6-halo-2',3'-didesoxipurin-nucleósidos, que se pueden usar como fármacos anti HIV-1. Finalmente, la *E. coli* BM-11 recombinante ha sido utilizada por y Zinchenko y col. (50) para obtener 9-(β-D-arabinofuranosil) guanina activa frente al virus del herpes y que también inhibe la proliferación de linfocitos-T (Esquema 18). La síntesis, partiendo de nucleósidos de guanina conduce a mejores rendimientos que si se usa la base libre. Esto se debe a la pobre solubilidad de la guanina en agua (0,042 g/L), como indicamos anteriormente. También vemos que el reticulado de las células con glutaraldehído favorece la estabilidad del biocatalizador y la conversión que se obtiene aumenta (Esquema 17).

La combinación de las fosforilasas con otras enzimas también se ha usado en este campo. Pal and Nair (51), describieron que la adición de xantin-oxidasa (xodasa) en el matraz de síntesis usando celulas de B. *stearothermophilus* ATCC 12980, conduce a mejores rendimientos en la síntesis de timidina partiendo de 2´-desoxiinosina (68%) que en ausencia de xodasa (58%) (Esquema 18). Esto se debe a que la xodasa desplaza el equilibrio de la reacción reversible por formación de ácido úrico que no es reconocido por la fosforilasa.



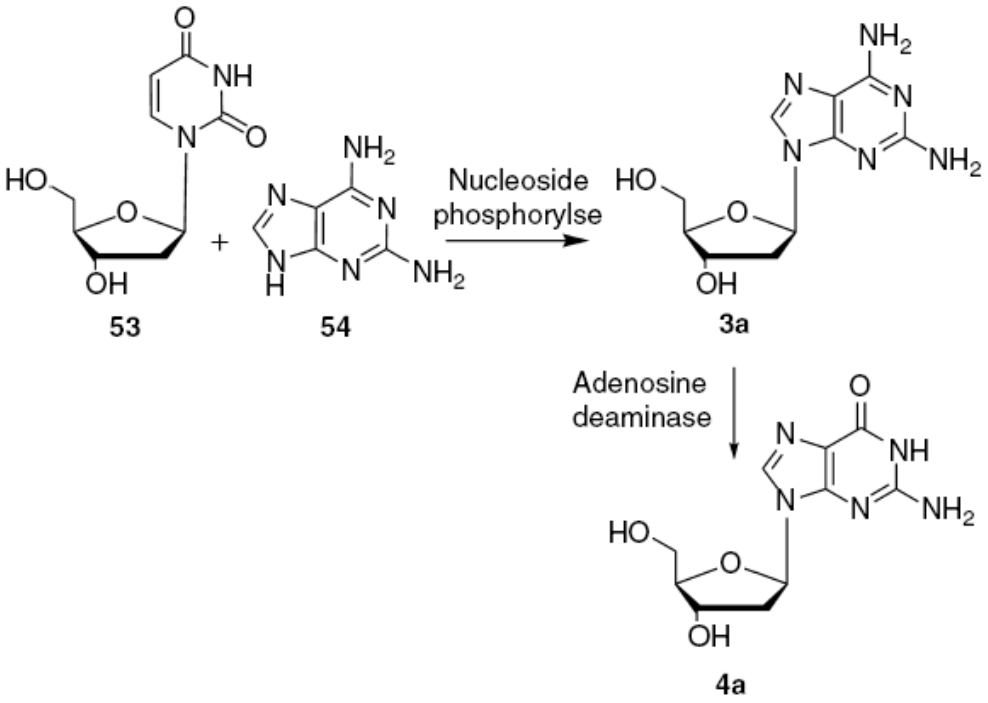
Esquema 17.



Esquema 18.

Finalmente, Yokozeki y Tsuji (52) describieron la síntesis 2'-desoxiguanosina con el 100% rendimiento a 25ºC, usando células enteras de *Enterobacter gergoviae* AJ-11125 (Esquema 19). Esta cepa tiene una

adenosina-deaminasa muy activa, por lo que usando la 2,6-diaminopurina y 2'-desoxiuracilo se puede lograr de forma indirecta, sintetizar este nucleósido cuya síntesis directa es imposible por la baja solubilidad de la guanina en agua.



Esquema 19.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sheldon, R. A.(2008) E factors, green Chemistry and catalysis: an odyssey. Chem. Commun. 29,3352-3365.

2. Anastas P.T., Barlett L.B., Kirchoff M.M. & Williamson T.C. (2000) The role of catalysis in the design, development and implementation of Green Chemistry. Catalysis Today 35, 11-22.

3. a) Horvath, I. T. & Anastas P. T. (2007) Introduction: Green Chemisry. Chem. Rev. 107, 2167-2168. b) Horvath, I. T., & Anastas P. T. (2007) Innovation & Green Chemistry. Chem. Rev. 107, 2169-2173. c) Tao J. & Xu J-H (2009) Biocatalysis in development of green pharmaceutical process, Cur.Opin. Chem.Biol. 13, 43-60.

4. Tanaka, K. (2003) Solvent-free Organic Synthesis, Wiley-VCH, Weinhein, Germany.

5. M. Pérez, J.V. Sinisterra & M. J. Hernaíz, (2010) Hydrolases in green solvents. Curr. Org. Chem. 2010, in press.

6. a) Chartrain, M., Greasham, R., Moore J., Reider, P. Robinsson, D & Buckland, B. (2001) Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. J. Mol. Catal. 11,503-512.

7. Quezada. M. A., Carballeira, J. D., García-Burgos C., Sinisterra J.V. (2008) Monascus kaoliang CBS 302.78 immobilized in tailor-made agars as catalyst for reduction of ketones: On the quest for a green biocatalyst. Proces Biochem. 43,1220- 1226.

8. Carballeira J. D, Quezada M.A, Hoyos, P., Hernaíz, M.J., Simeo Y, Alcantara A.R., Sinisterra J.V. (2009) Microbial cells as catalysts for stereoselective redox reactions. Biotechnology advances 27,686-714, y referencias citadas en la revision.

9. Schwaneberg U, Appel D., Schmitt J. & Schmid R.D., (2000), P450 in biotechnology. Zinc driven omega-hydroxylation of p-nitrophenoxydodecanoic acid using P450 BM-3 F87A J. Biotechnol. 84, 249-257.

10. Hollmann F., Schmid A. & Steckhan E. (2001). The first application of a mono-oxygenase employing indirect electrochemical NADH regeneration. Angew. Chem. Int. Ed. 40, 169-171.

11. Hollmann F., Witholt B., Schmid A. (2002) [Cp*Rh(bpy)(H2O)]2+: A versatile tool for efficient and non enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin coenzymes J. Mol. Cat. B. 791, 1-10.

12. Taglieber A., Schulz F., Hollmann F., Rusek M & Reetz M.T. (2008). Light-Driven Biocatalytic Oxidation and Reduction Reactions: Scope and Limitations. Chem.BioChem 9, 565-572.

13. a) Nakamura K., Yamanaka R., Matsuda T. & Harada T. (2003). Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. Tetrahedron: Asymmetry 14, 2659-2681. B) Aksu S., Arends I.W.C.E. & Hollmann F. (2009) A new regeneration system for oxidized nicotinamide cofactors. Adv. Synth. Catal. 351, 1211-1216.

14. Quezada M. A., Carballeira J. D. & Sinisterra J.V. (2009), Monascus kaoliang CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using iso-propanol as co-substrate: Optimized immobilization conditions. Bioresource Technology.100(6) 2018- 2025.

15. Sinisterra J.V. & Dalton H. (1996). Influence of the immobilization methodology in the stability and activity of P.putida UV4 immobilized whole cells. In R.H. Wijffels, R.M. Buitelarr; C. Bucke y J.Tramper. (Eds). Immobilized cells: Basic & Applications, Elsevier Science B.V. The Netherlands, pp. 416-423.

16. Davis S.C., Grate J.H., Gray D. R., Gruber J.M., Hulsman G. W., Ma S. K., Newman L.M., Sheldon R. & Wang L.A. Halohydrin dehalogenase and method for production of 4-cyano-3-hydroxybutiric acid ester and amines WO 2004/015132 (Codexis Inc.).

17. Patel R. N., Chu L., Chidambaram R., Zhu J. & Kant J. (2002). Enantioselective microbial reduction of 2-(1',2',3',4'-tetrahydro-1',1',4',4'-tetramethyl-6'-naphtalenyl)acetic acid and its ethyl ester. Tetrahedron: Asymmetry 13, 349-355.

18. a)Tsujigami T., Sugai, T. & Ohta H. 2001 Microbial asymmetric reduction of α-hydroxyketones in the anti-Prelog selectivity. Tetrahedron Asymmetry 12, 2543-2549 b) Hu J. & Xu Y. (2006) Anti-Prelog reduction of prochiral carbonyl compound by Oenococcus oeni ina biphasic system Biotechnol. Lett. 28,1115-1119.

19. Villa R., Romano A., Gandolfi R., Sinisterra J.V. & Molinari F. (2002). Chemoselective oxidation of primary alcohols to aldehydes with Gluconobacter oxydans. Tetrahedron Lett. 43, 6059-6061.

20. Voss C.V, Grube Ch. C. & Kroutil W. (2007). A biocatalytic one-pot oxidantion/reduction sequence for deracemization of sec-alcohol. Tetrahedron: Asymmetry 18, 276-281.

21. Boyd, D. R., Sharma N. D, Haughey S. A. & Kennedy M. A. (2004), Dioxygenase-catalysed sulfoxidation of bicyclic alkylaryl sulfides and chemoenzymatic synthesis of acyclic disulfoxides. Tetrahedron 60, 549–559.

22. Adam W., Lukacs Z., Kahle C., Saha-Mo¨ller Ch.R. & Schreier P. (2001) Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons by free and immobilized Bacillus megaterium cells. J. Mol. Catal. B: Enzymatic 11, 377–385.

23. Martin, G.D.A., Reynolds, W.F. & Reese, P.B. (2005), Stemodane skeletal rearrangement: chemistry and microbial transformation. Phytochemistry, 66, 901-909.

24. Buchanan G.O. & Reese P.B. (2001), Biotransformation of diterpenes and diterpene derivatives by Beauveria bassiana ATCC 7159. Phytochemistry, 56, 141-151.

25. Martin, G.D.A.; Reynolds, W.F. & Reese, P.B. (2004) Investigation of the importance of the C-2 and C-13 oxygen functions in the transformation of stemodin analogues by Rhizopus oryzae ATCC 11145. Phytochemistry, 65, 701-710.

26. Fraga, B.M., García-Tellado, F., González, P. & Hernandez, M.G (1993) The microbiological transformation of 14β,19-dihydroxy-ent-kaur-15-ene by Gibberella fujikuroi. Phytochemistry, 34, 1035-1040.

27. Fraga, B.M., Hernández, M.G., García-Tellado, F., González, P. & Perales, A. (1993).The biotransformation of two ent-15β,16β-epoxy-kaurane derivatives by Gibberella fujikuroi. Phytochemistry, 34, 133-138.

28. Fraga, B.M., González, P., Hernandez, M.G. & Suárez, S. (2003) The biotransformation of the diterpene 2β-hydroxy-ent-13-epi-manoyl oxide by Gibberella fujikuroi. Phytochemistry, 62, 67-70.

29. García-Granados, A., Jiménez, M.B., Martínez, A., Parra, A., Rivas, F. & Arias, J.M.(1994), Chemical-microbiological synthesis of ent-13-epi-manoyl oxides with biological activities. Phytochemistry 37, 741-747.

30. García-Granados, A., Liñán, E., Martínez, A., Rivas, F., & Arias, J.M. (1995) Preparation of polyoxygenated ent-13-epi-manoyl oxides by chemical-microbiological semisyntheses. Phytochemistry, 38, 1237-1244.

31. Fraga, B.M., Álvarez, L. & Suárez, S. (2003) Biotransformation of the Diterpenes Epicandicandiol and Candicandiol by Mucor plumbeus. J. Nat. Prod., 66, 327-331.

32. Donova, M. V. (2007), Transformation of steroids by actinobacteria: A review. Appl. Biochem. Microbiol. 43, 1-14.

33. Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M. & Cabral, J. M. S. (2003), Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. Enzyme Microb. Technol. 32, 688-705.

34. Harword, E.A., Hopkins, P.B. & Sigurdsson, S.Th. (2000) Chemical synthesis of cross-link lesions found in nitrous acid treated DNA: A general method for the preparation of N-2-substituted-2'-deoxyguanosine. J. Org. Chem., 65 (10), 2959-2964.

35. Ferrero, M & Gotor, V. (2000) Biocatalytic modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides and C-nucleosides. Chem. Rev. 100 (12) 4319-4347.

36. Moris, F. & Gotor, V. (1993) A useful and versatile procedure for the acylation of nucleosides through an enzymatic reaction. J. Org. Chem. 58 (3), 653-660.

37. Mahmoudian, M., Rudd, B., Cox B., Drake, R.M., Hall, P., Stead, M. J., Dawson, M., Chandler, D. G., Livermore, N.J., Turner & G.Jenkins, (1998) A versatile procedure for the generation of nucleoside 5′ -carboxylic acids using nucleoside oxidase Tetrahedron 54 (28), 8171-8182.

38. Condezo L.A., Fernandez-Lucas J., García-Burgos C.A., Alcantara A.R. & Sinisterra J.V. (2007) Enzymatic synthesis of modified nucleosides. In R. N. Patel (ed) Biocatalysis in the Pharmaceutical & Biotechnology Industries, CRC Press, Boca Raton USA. Capitulo 14, pp. 401-426 y referencias citadas.

39. Zhang F.J. & Sih (1995) Selective oxidation of C-5 OH by oxidase from Stenotrophomonas maltophila Tetrahedron Lett. 36(51),9289-9292.

40. Pal, S. & Nair V. (1997) Enzymatic synthesis of thymidine using bacterial whole cells and isolated purine nucleoside phosphorylase. Biocatal. Biotransfor., 15 (2), 147-158.

41. Trelles J.A., Fernandez-Lucas J., Condezo L. A. & Sinisterra J.V. (2004) Nucleoside synthesis by immobilized bacterial whole cells. J.Mol.Catal.B.Enzymatic 35,219-227.

42. Fernández-Lucas J, Condezo L.A, Martinez-Lagos F. & Sinisterra J.V. (2007) Synthesis of 2'-deoxyriboxylnucleosides using new 2'-deoxyriboxyltransferase microorganism producers. Enzyme Microb. Technol. 40:1147-1155.

43. Krenitsky, T. A., Freeman, G. A. & Shaver, S. R. (1986) Imidazo [4,5-c]pyrimidines (3-deazapurines) by glycosyl transferring and their nucleosides as immunosuppressive and anti-inflammatory agents. J. Med. Chem. 29 (1), 138-143.

44. Utagawa, T. (1999), Enzymatic preparation of nucleoside antibiotics. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 6 (3), 215-222.

45. Kulikowska, E., Bzowska, A. & Wierzchowski, J.; et al. (1986) Properties of two unusual and fluorescent, substrates of Purine-nucleoside phosphorylase 7-methylguanosine and 7-methylinosine. Biochim. Biophys. Acta, 874 (3) 355-363.

46. Hennen, W.J. & Wong, Ch-H. (1989) A new method for the enzymatic synthesis of nucleosides using purine nucleoside phosphorylases. J. Org. Chem.1989, 54 (19), 4692-4695.

47. Shirae, H., Kobayashi K. & Shiragami, H. (1989) Production of 2', 3'-dideoxyadenosine and 2',3'-dideoxyinosine from 2',3'-dideoxyuridine and the corresponding bases by resting cells of Escherichia coli AJ 2595. Appl. Environ. Microb., 55 (2), 419-424.

48. Rogert, M. C.; Trelles, J. A.; Porro, S. & Iribarren A. M.. (2002) Microbial synthesis of antiviral nucleosides using Escherichia coli BL21 as biocatalyst. Biocatal. Biotransfor. 20 (5), 347-351.

49. Murakami, K.; Shirasaka, T. & Yoshioka, H. (1991). Escherichia coli mediated biosynthesis and in vitro anti-HIV activity of lipophilic 6-halo-2',3'-dideoxynucleosides. J. Med. Chem., 34 (5), 1606-1612.

50. Zinchenko, A. I.; Barai, V. N. & Bokut, S. B. (1990) Synthesis of 9-(β-D-arabinofuranosyl) guanine using whole cells of Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biot. 32 (6), 658-661.

51. Pal, S.& Nair V. (1997) Enzymatic synthesis of thymidine using bacterial whole cells and isolated purine nucleoside phosphorylase. Biocatal. Biotransfor., 15 (2), 147-158.

52. Yokozeki, K. &Tsuji T. (2000) A novel enzymatic method for the production of purine-2'-deoxyribonucleosides. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 10 (1-3), 207-213.

Capítulo V

INGENIERÍA DEL MEDIO DE REACCIÓN: MEDIOS NO CONVENCIONALES

José Mª Sánchez Montero

RESUMEN

La utilización de disolventes orgánicos con enzimas y células ha supuesto un avance importante para los químicos orgánicos al mejorar considerablemente la utilidad de estas desde el punto de vista de su aplicación en síntesis orgánica, ya que la mayoría de los productos interesantes para la industria de la Química Fina y Farmacéutica son insolubles en agua. Esto, ha conllevado como paso previo la estabilización del biocatalizador utilizando todo un arsenal de recursos para su consecución. Una de las estrategias más interesantes es el control de la actividad del agua, que causa un efecto muy importante sobre la actividad, selectividad y estabilidad de la enzima. La utilización de líquidos iónicos y fluidos supercríticos ha supuesto un avance significativo, al poder fabricar disolventes a medida y en el caso de los fluidos supercríticos, poder llevar acabo procesos muy eficientes en condiciones mas sostenibles.

Palabras clave: Enzimas; Actividad de agua; Disolventes orgánicos; Líquidos iónicos; Fluidos supercríticos.

ABSTRACT

Reaction medium Engineering: Non conventional media

The use of organic solvents with enzymes and cells has meant a breakthrough for organic chemists due to the considerably improve of their usefulness to organic synthesis, as the most interesting products for the pharmaceutical and fine chemical industry are insoluble in water.

In order to achieve this, it has been neccessary to stabilize the biocatalyser by using the panoply of available resources.One of the most interesting strategies is the control of water activity, as water causes a very important effect on activity, selectivity and stability of the enzyme. The use of ionic liquids and supercritical fluids has meant a breakthrough. In the first case enabling to manufacture "tailoring made" solvents; and in the case of supercritical fluids leading to perform very efficient processes in more sustainable conditions.

Keywords: Enzymes; Water activity; Organic solvents; Ionic liquids; Supercritical fluids.

1. INTRODUCCIÓN

El artículo publicado en Science, hace más de 25 años por Zaks y Klibanov, ha sido considerado como el punto de partida de una rama de la Biotecnología conocida como Biocatálisis en medios no acuosos (1), aunque pueden encontrarse referencias previas en la bibliografía que demuestran que en 1933 un bioquímico polaco (Ernest Aleksander Sym) describió de forma muy detallada procesos de síntesis orgánica catalizada por lipasas en medios orgánicos (2-4). La escasa difusión de los trabajos de Sym puede achacarse a los prejuicios existentes en la época respecto de que las enzimas sólo funcionaban en medios acuosos y no se tenía un profundo conocimiento de las lipasas.

El término *"ingeniería del medio"* originalmente deriva de Klibanov y colaboradores (5) y se refiere a la posibilidad de influir en las propiedades de la enzima, alterando la naturaleza del disolvente en la que la reacción se ha llevado a cabo. La utilidad tecnológica de las enzimas se puede mejorar considerablemente mediante el uso de disolventes orgánicos en lugar de sus medios naturales de reacción acuosa. Los estudios iniciales estuvieron dirigidos al comportamiento de las proteasas en medios orgánicos, primero usados como cosolventes y posteriormente como disolventes puros prácticamente sin apenas contenido en agua.

Este cambio en el disolvente no es solo factible, sino que además en estos entornos aparentemente hostiles las enzimas pueden catalizar reacciones imposibles en el agua, se vuelven más estables, y exhiben un nuevo comportamiento denominado *"memoria molecular"* (6). Este efecto se debe a su alta rigidez conformacional en entornos anhidros.

Mientras que el comportamiento en agua de una enzima es independiente a como se ha preparado la disolución, las propiedades de una enzima en medios orgánicos si es dependiente de su historia. Una forma interesante de ilustrar este efecto puede hacerse mediante el siguiente experimento: La α -quimotripsina liofilizada disuelta en agua y después de diluirse 100 veces en alcohol t-amílico, tiene una actividad específica casi de un orden de magnitud mayor que la de la misma enzima liofilizada directamente y que contiene en suspensión en el mismo disolvente un 1% de agua. Como se añade exceso de agua a esta suspensión, presumiblemente se borra la *memoria* haciendo a la enzima flexible, y la diferencia en las actividades enzimáticas disminuye (7).

Además, cuando la subtilisina se liofiliza en una disolución acuosa que contiene diferentes inhibidores competitivos (seguido de su eliminación por extracción anhidra), no sólo es hasta 100 veces más activa en disolventes anhidros que la enzima liofilizada en ausencia de ligandos (debido al efecto de lioprotección), sino que también tiene distinta especificidad de sustrato y estabilidad (8, 9). Esta *memoria de ligando* inducida desaparece cuando la

enzima se redisuelve en agua (8.) Además, la enantioselectividad de la α-quimotripsina y la selectividad del sustrato de la lipasa, en un determinado disolvente orgánico se afectan fuertemente por la adición de un ligando a una disolución acuosa de la enzima durante la deshidratación. Estos hechos, pueden explicarse fácilmente suponiendo que los ligandos causan cambios conformacionales en los sitios activos de las enzimas y que incluso después de eliminar el ligando esa conformación es retenida por la enzima en el medio anhidro, debido a su rigidez en ausencia de agua (6). Dado que las estructuras de las enzimas con la memoria del ligando son distintas de la de los predecesores no memorizados, también lo son sus propiedades catalíticas.

Además de esta *impresión molecular*, en algunos casos llevar a cabo transformaciones enzimáticas en disolventes orgánicos es beneficioso porque ofrece ventajas específicas frente al agua. Por ejemplo, la mandelonitrilo liasa cataliza la reacción de adición enantioselectiva de cianuro de hidrógeno a varios aldehídos para dar R-cianohidrinas ópticamente activas. En disolución acuosa, la reacción de adición transcurre con bajo rendimiento, dando lugar a una cianhidrina racémica. Esta reacción espontánea se suprime en disolventes orgánicos tales como acetato de etilo y éter di-isopropílico. En consecuencia, cuando se utilizan estos medios de reacción para la formación biocatalítica de la cianhidrina, no sólo se incrementa la solubilidad de los aldehídos considerablemente (conduciendo a una mayor productividad), sino que también, debido a la ausencia de una reacción química no estereoselectiva, se mejora considerablemente la pureza enantiomérica del producto deseado.

2. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN MEDIOS ORGÁNICOS

El uso de disolventes orgánicos es ventajoso especialmente, en la transformación de sustratos que son inestables o poco solubles en agua (10). Así se obtiene una mejor recuperación de productos como consecuencia de la omisión de etapas de extracción durante la purificación. Los agentes causantes de la formación de emulsiones se pueden suprimir y la recuperación de

producto(s) se facilita por el uso de disolventes orgánicos de bajo punto de ebullición.

Por otra parte, también se produce un incremento en la solubilidad de los sustratos orgánicos (no polares), aumentando la velocidad de reacción.

Un medio orgánico es un medio hostil para la vida de las células, por tanto la contaminación microbiana es despreciable (decisivo a escala industrial, donde mantener la esterilidad podría ser un serio problema).

En ausencia de agua, la síntesis de enlaces tipo éster y amida por hidrolasas (principalmente lipasas y proteasas) puede tener prioridad sobre las reacciones de hidrólisis y algunas reacciones secundarias que son dependientes de agua se pueden evitar. En este sentido, algunas de las reacciones responsables de la desnaturalización de enzimas son mediadas por agua como: la hidrólisis de enlaces peptídicos (especialmente en asparragina), la hidrólisis de enlaces amida en cadenas laterales (asparragina y glutamina) o la eliminación y oxidación (principalmente de residuos cisteína) Por tanto, las enzimas deberían ser mas estables en un entorno con bajo contenido en agua (11).

Como consecuencia, algunas reacciones secundarias (hidrólisis de grupos lábiles p.e., epóxidos o anhídridos, polimerización de quinonas, o racemización de cianohidrinas) son dependientes del agua y por tanto pueden suprimirse en medios orgánicos.

La desactivación y/o la inhibición causada por los sustratos y/o los productos lipofílicos se reduce al mínimo, puesto que su baja solubilidad en los disolventes orgánicos conduce a una concentración local reducida en la superficie de la enzima. Como la enzima en la mayoría de los casos no se disuelve en medios hidrofóbicos, ya que permanece sólo en suspensión, esto implicaría que se pueden separar con relativa facilidad después de que la reacción ha terminado, por simple filtración.

No obstante, si se quiere inmovilizar, puede ser suficiente la adsorción sobre la superficie de un soporte barato, como Celita (tierra de diatomeas), sílice o bolas de vidrio (ya que no se produce desorción).

Al variar el disolvente orgánico también es posible controlar la especificidad del sustrato y la regio y enantioselectividad de una enzima determinada.

Por último, pero no menos importante, decir que los equilibrios de las reacciones de hidrólisis se pueden cambiar hacia la condensación en medios casi anhidros. Este aspecto es de crucial importancia, ya que los sustratos que resultan interesantes para trabajar con ellos, son generalmente insolubles en agua.

Las enzimas, son a veces más estables en disolventes orgánicos anhidros que en agua. La lisozima en agua a 100°C se desactiva mas del 50% después de 30 s (pH 8) o después de 100 min (pH 4); sin embargo era activa después de 140 h en ciclohexano o incluso después de 200 h si estaba en forma de polvo liofilizado (12).

Los disolventes orgánicos se pueden reciclar con mayor facilidad que el agua debido a su alta entalpía de vaporización. Sin embargo, a pesar de que las enzimas en medios orgánicos presentan numerosas ventajas, la actividad catalítica es inferior, comparada con disoluciones acuosas (13) y por tanto su eficiencia catalítica es, en muchos casos, inferior en varios órdenes de magnitud respecto a los sistemas acuosos. Este comportamiento, puede deberse a diferentes causas, como altas concentraciones de sustrato, limitaciones difusionales, baja estabilización del estado de transición de la enzima-intermedio sustrato, flexibilidad de la proteína restringida y agregación y distorsión de las moléculas de la enzima causadas por la deshidratación, que se convierten en irreversibles en disolventes anhidros (15).

3. DIFERENTES ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA TRABAJAR CON ENZIMAS EN MEDIOS ORGÁNICOS

Está claro que el agua es imprescindible para estabilizar la conformación activa de la enzima y actúa como "lubricante" de los cambios conformacionales que se dan durante la catálisis. Pero la pregunta que se plantea, es cuanta agua es necesaria, ya que es difícil imaginar que una enzima pueda "*sentir*" más allá de una o unas muy pocas capas de moléculas en torno suyo, y de aquí surge la siguiente hipótesis: ¿se puede sustituir la masa de la reacción, disolución acuosa, por una disolución en otro disolvente? El desarrollo de esta pregunta ha dado lugar a cuatro sistemas principales: i) mezclas miscibles agua-cosolvente orgánico (15), ii) en sistemas bifásicos agua-disolvente orgánico inmiscible (16), iii) en sistemas micelares reversos (17) o iv) en medios orgánicos secos (18-22).

3.1. Agua-co-solvente miscible: sistemas monofásicos

La enzima, el sustrato y/o el producto, están disueltos en una disolución monofásica de agua y un cosolvente. Entre los disolventes que pueden ser utilizados podemos citar los alcoholes de cadena corta como MeOH, EtOH, y PrOH, así como disolventes polares: DMSO (en muy pequeña cantidad), DMF, acetona, dioxano, THF etc. Estos, se usan para la transformación de sustratos lipofílicos que sean escasamente solubles en agua y para acelerar la velocidad de reacción.

En general, la mayor parte de los cosolventes pueden ser usados hasta aproximadamente un 10% (V/V) sin producir problemas en la enzima.

En algunos casos, pueden usarse combinaciones enzima/disolvente de hasta el 50-70%. Si la proporción alcanza un cierto umbral, el agua esencial unida es eliminada, conduciendo a la desnaturalización.

Solo raramente algunas enzimas (inusualmente estables) permanecen catalíticamente activas en disolventes orgánicos miscibles en agua con bajo contenido en ella, entre las que podemos citar a la Subtilisina y algunas lipasas p.e., CAL (lipasa de *Candida antarctica*).

Se han obtenido muy buenos resultados con este sistema y hasta se consigue con buenos rendimientos la síntesis peptídica con α-quimotripsina en EtOH 50%, pues en ciertas condiciones de pH y temperatura, hay una importante diferencia cinética en los dos sentidos del equilibrio, ya que es mucho más rápida la amidación de un éster que su hidrólisis.

En el caso de la enzima termo estable secADH (23-24), obtenida de una bacteria anaerobia termofilica, se demostró que a bajas concentraciones de agua, los disolventes orgánicos miscibles tienen un efecto significativo sobre la enantioselectividad de la enzima en la oxidación del 2- butanol quiral. Así, la adición de (10 a 40% v/v) de acetonitrilo, condujo a un incremento de 2,5 veces en la selectividad para el *R* - enantiómero. Un efecto similar se encontró en la reacción reversa, la reducción de 2-butanona.

Mediante la combinación de criosolventes y bajas temperaturas, se ha conseguido mantener la actividad de numerosas enzimas a temperaturas alrededor de -100ºC ("crioenzimología"). En estas condiciones, las transformaciones enzimáticas tienen lugar tan lentamente que, recurriendo a estas técnicas, se pueden estudiar los pasos intermedios de una transformación, pudiendo aislarse los complejos enzima-metabolito correspondientes a los metabolitos intermedios.

3.2. Agua-co-solvente inmiscible: sistemas bifásicos

En estos sistemas, la enzima se encuentra en la fase acuosa, mientras que los reactivos se disuelven bien en la fase acuosa o la fase orgánica. Independiente de la partición de los reactivos en las dos fases, la catálisis se lleva a cabo principalmente en la fase acuosa y en poca extensión en la interfase entre los dos disolventes. En todos los casos, la reacción es promovida por la extracción de productos en la fase orgánica, por lo que se elimina el producto de la superficie de la enzima. Esto hace que la reacción enzimática solo se produzca en la fase acuosa. En estas condiciones de trabajo, es necesaria una transferencia de masa suficiente de los reactantes a los productos del catalizador y entre las dos fases, por lo que es crucial agitar o remover. En este sentido, la agitación intensiva que normalmente es utilizada

para mejorar la velocidad de transferencia de masa a través de la interfase, lleva a la enzima a la desnaturalización debido a la tensión interfacial (25). Una de las mayores limitaciones del sistema sería la aplicación a productos hidrofóbicos con baja solubilidad en agua. También, son necesarios elevados tiempos de reacción, debido a los equilibrios de partición. En principio, la partición no tiene porqué limitar a la kcat.

En estos sistemas, además de otras variables, como disolvente orgánico, temperatura, pH etc., el contenido en agua es especialmente importante. La utilización de estos sistemas, se ha aplicado con éxito a proteasas (26), así como a otras enzimas como amino oxidasas (27), beta glicosidasa inmovilizada (28), cloroperoxidasa (29), penicilacilasa (30) y otras.

3.3. Micelas reversas

Un refinamiento del sistema bifásico son las micelas reversas donde, la enzima se encuentra en disolución, en minúsculas gotas emulsionadas mediante un detergente en una masa de disolvente orgánico. Estos sistemas coloidales, se forman de manera espontánea una vez se ha añadido una pequeña cantidad de agua a un gran volumen de agua en disolventes orgánicos inmiscibles que contienen un agente tensoactivo. Podríamos resumir, diciendo que el contenido de agua y especialmente la relación entre el agua y el contenido de surfactante, conocido como (W_0), [H_2O]/[surfactante], es el parámetro que más afecta a las micelas, además de otras características físicas.

Aunque las propiedades del agua micelar difieren notablemente de las del agua libre, las proteasas atrapadas en micelas reversas presentan habitualmente una muy alta o también llamada "super actividad" (26).

Desde un punto de vista sintético, las micelas reversas puede considerarse que son microrreactores separados del disolvente orgánico por una capa de surfactante, como se ilustra en la Figura 1.

Como ejemplo, podemos citar las reacciones con el sistema bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT)/isooctano que dio un rendimiento del

80% en la síntesis de Ac-Gly- Asp (OMe)-OMe catalizada por tripsina. Sin embargo, el uso de otros sistemas de micelas reversas como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB)/heptanol/hexanol y Triton X-100/acetato de etilo, disminuyó significativamente la eficiencia en la síntesis de productos o incluso impidió su formación (31). Además, se ha demostrado que los alcoholes de cadena larga, como el hexanol, octanol o decanol, usados como cosurfactantes pueden estabilizar las enzimas encapsuladas. Por otra parte, la presencia de estos alcoholes alifáticos aumenta la solubilidad de los reactivos orgánicos polares en el disolvente (32).

En resumen, se puede concluir que el uso de los sistemas micelares reversos previene la inactivación enzimática en disolventes orgánicos y permite la síntesis de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos. Los principales inconvenientes para un mayor uso práctico son la falta de métodos racionales para optimizar estos sistemas multi- componentes. Además, la presencia de los tensioactivos en el sistema de reacción hace que la separación y purificación de productos a menudo sea difícil. Estos problemas, siguen limitando una mas amplia aplicación de las micelas reversas en la síntesis enzimática.

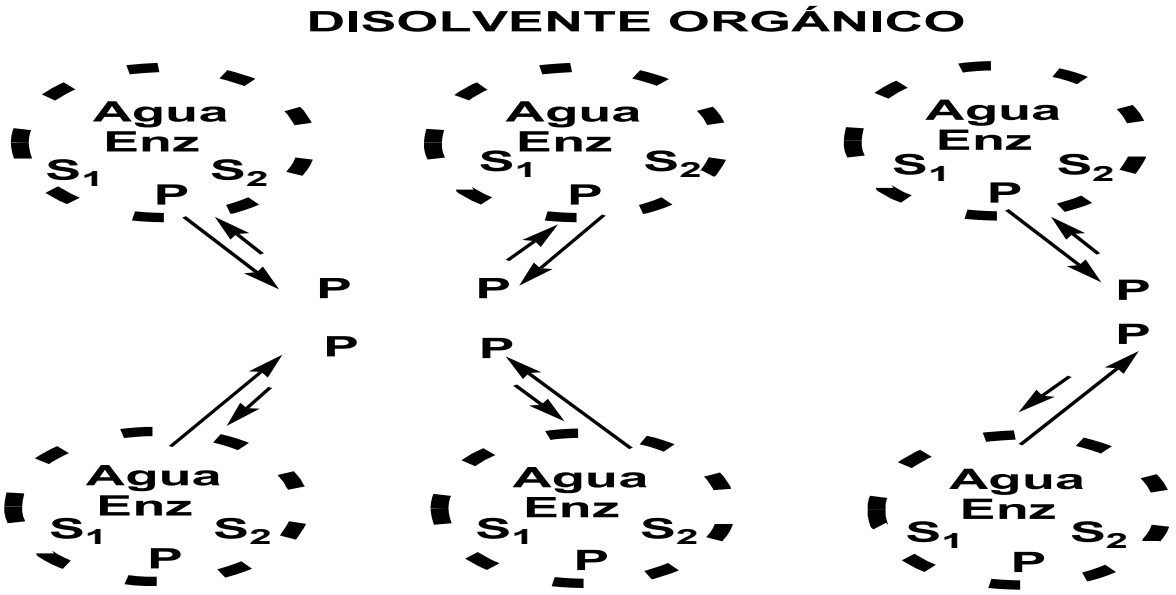


Figura 1.- Visualización esquemática de una micela reversa en el disolvente orgánico.

3.4. Medios orgánicos secos

El cuarto sistema, sí que introduce un cambio total, pues las enzimas ya no se encuentran disueltas, sino que son sólidas en suspensión, en disolventes casi anhidros y surge como una extrapolación de los sistemas bifásicos cuando se va reduciendo el volumen de la fase acuosa hasta reducirla a la simple impregnación de un soporte sólido poroso. Este sistema, es potencialmente el de mayor aplicación en síntesis y con él se han conseguido los mayores éxitos, especialmente en el campo de la Química Fina, pequeñas cantidades de productos de alto valor añadido que serían muy difíciles de obtener con métodos clásicos de síntesis: resolución de enantiómeros y reacciones enantioespecíficas, reacciones regioselectivas de aminoácidos y azúcares, reacciones con o hacia productos inestables, etc., y al que dedicaremos mayor atención en este capítulo.

La forma más directa de cuantificar la cantidad de agua en una mezcla de reacción, es utilizar la concentración de agua (en mol L^{-1} o % en peso o volumen). Sin embargo, las propiedades de la enzima (actividad catalítica, etc.) están mucho más influenciadas por la cantidad de agua unida a la enzima que por la concentración total de agua. Desafortunadamente, es difícil medir la cantidad de agua unida a la enzima directamente. Por otra parte, se ha comprobado que la cantidad de agua ligada a la enzima está en gran parte influenciada por la actividad termodinámica del agua (humedad relativa), la cual puede ser medida por sensores y controlada en mezclas de reacción mediante los métodos descritos a continuación. La actividad de agua, ha sido ampliamente aceptada como la mejor manera de cuantificar el agua en los sistemas de baja cantidad de agua para síntesis enzimática. En el equilibrio, la actividad de agua es la misma en todas las fases. Esto significa que se puede medir siempre donde sea más práctico, lo que a menudo significa hacerlo en la fase gaseosa (33-34). Existen diferentes metodologías para determinar la actividad de agua dependiendo de la escala de la reacción, las cantidades de agua que se haya añadido o retirado, y la disponibilidad de equipos.

3.5. Control de la actividad de agua utilizando disoluciones salinas saturadas

Un método que no requiere equipo especial y es útil a escala de laboratorio, consiste en el equilibrado con disoluciones salinas saturadas a través de la fase gaseosa (35). Dado que la solubilidad de una sal en agua tiene un valor fijo (a una temperatura fija), la disolución saturada tiene una actividad de agua fija (y concentración de agua). De esta manera, recipientes pequeños con la preparación de la enzima o disolución del sustrato se pueden poner en grandes contenedores con disoluciones salinas saturadas. Después del período de pre-equilibrio, tanto el preparado enzimático como la disolución de sustrato tendrán la actividad de agua, igual a la disolución saturada de sal, la cual se puede comprobar realizando la correspondiente medición. Las disoluciones de sal se utilizan como "*buffers*" de la actividad de agua.

Mediante el uso de diferentes sales, se pueden obtener un amplio rango de actividades de agua (Tabla I). Si la reacción es lenta, el equilibrado a través de la fase gaseosa, como se describió anteriormente, puede ser utilizado para mantener la actividad agua, pero si deben ser eliminadas o añadidas a la reacción grandes cantidades de agua, a una actividad de agua fijada es necesario un sistema más eficiente del control de la misma. Una forma de lograr esto, es bombear la disolución saturada de sal a través de tubos de silicona inmersos en el reactor (36). La superficie del tubo de silicona se puede elegir para que coincida con la capacidad de transporte requerido de agua.

Otra forma de determinar la actividad de agua, es mediante el uso de sensores. Idealmente debería poderse medir la actividad de agua en el medio de reacción líquido, no obstante, los sensores disponibles se han diseñado para realizar mediciones en la fase gaseosa húmeda. Los sistemas controlados automáticamente se han utilizado con éxito para el seguimiento y control de las reacciones enzimáticas en medio orgánico (37).

Tabla I. Actividad de agua de disoluciones saturadas de agua a 25 ºC.

Sal	Actividad de agua
$Zn\ Br_2$	**0,077**
LiCl	**0,113**
$MgCl_2$	**0,225**
KCH_3CO_2	**0,328**
$K_2CO_{.3}$	**0,432**
$Mg(NO_3)_2$	**0,529**
$CoCl_3$	**0,649**
$SrCl_2$	**0,708**
KCl	**0,843**
KNO_3	**0,936**
K_2SO_4	**0,973**

Un método alternativo, consiste en el uso de sales hidratadas, con diferente número de moléculas de agua, que son interconvertidos a a_w fijas. Por ejemplo, el $Na_2CO_3.10H_2O$, se convierte en Na_2CO_3.7H2O a una actividad de agua de 0,74 a 24°C, es decir, las sales hidratadas actúan como "*buffers*" de la actividad de agua. Mientras la sal hidratada esté presente, la actividad de agua se mantiene en 0,74. Si la actividad de agua deseada es otra, debe elegirse otro par de sales hidratadas. Las sales hidratadas se pueden añadir directamente a la mezcla de reacción orgánica teniendo cuidado de que estas sales hidratadas no interfieran con la enzima o la reacción enzimática (38).

3.6. Distribución del agua

Durante la Biocatálisis en medios orgánicos, las pequeñas cantidades de agua que intervienen en la reacción se asocian a diversos componentes del sistema: disueltos en el disolvente, unido a la enzima y unida al soporte en caso de estar inmovilizada y otros aditivos que podrían estar presentes. El agua, es intercambiada entre los distintos componentes, y en el equilibrio, la actividad de agua es la misma en toda la mezcla de reacción y la fase gaseosa en equilibrio con ella.

La cantidad de agua unida a la enzima puede cuantificarse por la isoterma de adsorción de agua. De la Rosa y colaboradores, demostraron que a la hora de realizar una isoterma, ha de tenerse en cuenta el disolvente en el que se lleva a cabo la reacción (39). Dada la necesidad de controlar la cantidad de agua del sistema, la determinación del parámetro a_w a partir de la isoterma de adsorción de agua ha dado excelentes resultados. Esta se ha de determinar con la lipasa en aire y en el disolvente y por último solo con el disolvente. Por otra parte, el valor de log P del disolvente va a condicionar enormemente el reparto de agua entre la enzima y el disolvente. Como las cantidades de agua puestas en juego son pequeñas, y a pesar de que los mejores disolventes en el caso de las lipasas son hidrofóbicos y absorben poca cantidad de agua, si bien en un principio podría parecer que las isotermas son muy similares, unas pequeñas diferencias en la isoterma resultan significativas en el valor de a_w (33). Un ejemplo de lo anteriormente dicho, se muestra en la Figura 2 donde se representa la esterificación de (*R,S)*-ibuprofeno con 1-propanol catalizada por lipasa de *C. antártica B*(CALB) inmovilizada sobre sílice en isooctano como disolvente. Puede comprobarse, como el control del agua añadida inicialmente ejerce un efecto crítico en el transcurso de la reacción. La máxima conversión se obtiene a a_w=0,85 que es el valor de equilibrio obtenido a partir de la isoterma mientras que a valores superiores o inferiores la conversión baja drásticamente (22).

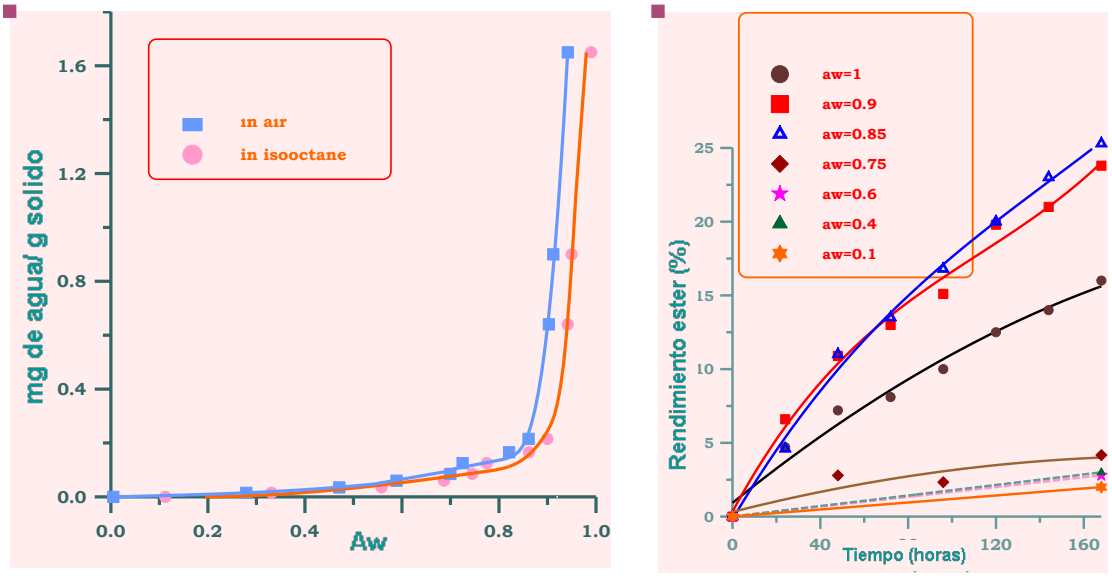


Figura 2.- (A)Isotermas deAdsorción de CALB immobilizada sobre sílice. Condiciones de medida: 200 mg de derivado (en aire); 200 mg de derivado con 1mlde isooctano(en disolvente). (B) Esterificación de(R,S) ibuprofeno catalizado por CALB inmovilizado sobre siliceactivada con triclorotriazina. Condiciones 66 mM acido + 66 mM 1-propanol. 37 º C; 300 rpm; 200 mg de derivado /ml isooctano (15.6 mg SP525/g derivado).

Cuando se trabaja con una concentración fija de agua, hay que considerar la capacidad de absorción de agua del soporte en el caso de las enzimas inmovilizadas. Este hecho se conoce con el término de acuafilia, el cual da una idea de como el soporte puede competir con la enzima por el agua del sistema. Un alto valor de acuafilia significa que el soporte absorbe una gran cantidad de agua, dejando poco para la enzima, lo que resulta en una baja actividad de la enzima en la mayoría de los casos. Sin embargo, cuando trabajamos a una actividad de agua fija, se obtienen iguales actividades de enzimas sobre diferentes soportes, aunque algunas diferencias se pueden encontrar (40). Por otra parte, hay que tener en cuenta cuando se llevan a cabo isotermas de adsorción de agua que pueden aparecer fenómenos de histéresis que pueden ser debidos a pequeños cambios conformacionales en la enzima.

4. EFECTO DEL AGUA SOBRE LA ACTIVIDAD, SELECTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

La actividad catalítica de una enzima en un medio orgánico, puede variar en varios órdenes de magnitud, dependiendo del grado de hidratación de una enzima, por tanto el control del grado de hidratación o la actividad de agua es un parámetro clave a la hora de optimizar la conversión en un disolvente orgánico. La forma más habitual de utilizar las enzimas en medios orgánicos es en estado liofilizado, aunque este procedimiento implica una pérdida de actividad por inactivación de la enzima (41). Mediante espectroscopia TF-IR se ha comprobado que la liofilización conlleva una disminución en el contenido de α-hélice y un incremento de β-hojas (sheet) comparado con la enzima nativa y con la enzima en disolución acuosa. Los cambios conformacionales durante la liofilización se pueden prevenir usando lioprotectores, como análogos de sustrato o polietilenglicol. Se han utilizado otros aditivos, como sales inorgánicas y éteres corona, para mejorar la actividad después de la liofilización. El agua actúa como un lubricante de las enzimas en los medios orgánicos. La respuesta de las enzimas a un incremento en la actividad del agua varía considerablemente de unas a otras. Así, hay lipasas que expresan su máxima actividad a valores tan bajos como 0,0001, mientras que otras requieren valores más altos. Si comparamos la a_w a la que las enzimas expresan el 10 % de su máxima actividad, en el caso de las glicosidasas se sitúa entre 0,5 -0,8 mientras que en las lipasas sería entre 0 y 0,2.

Por otra parte, cuando las moléculas de agua interaccionan con una enzima, es natural que puedan producirse cambios conformacionales que podrían afectar a la selectividad de una enzima aunque es difícil generalizar los efectos. En algunos estudios de reacciones de esterificación catalizadas por lipasas, no se observaron efectos de la a_w sobre la enantioselectividad. En un estudio similar, sin embargo, se observó que la enantioselectividad disminuyó a medida que aumentaba la a_w. La enantioselectividad en reducciones catalizadas por alcohol deshidrogenasas de *Thermoaerobium brocki* aumentó con el incremento de la a_w en hexano. Otro tipo importante de selectividad se

produce entre reacciones de hidrólisis y transferencia de grupos (transesterificación, transglicosilacion, etc.) catalizadas por hidrolasas. Así, en reacciones catalizadas por glicosidas y proteasas la relación transferasa/hidrólisis puede aumentar o disminuir con el aumento de a_w (42). En este caso, el agua puede actuar como un reactivo y como una sustancia que modifica las propiedades de la enzima. Mientras que en el primer caso, el efecto irá regido por la concentración o a_w, en el segundo es más difícil de predecir. Para determinar la competencia entre las dos reacciones lo más fácil es medir las velocidades iniciales de las dos reacciones. Aunque el agua es considerada el mejor disolvente para trabajar con una enzima, puede reaccionar en algunos sitios con la enzima causando su inactivación. Ejemplos de lo anteriormente dicho, incluirían hidrólisis de enlaces peptídicos en la enzima, reacciones de deamidación de los aminoácidos de cadenas laterales y destrucción de enlaces cistina. La eliminación de la mayor parte del agua que rodea la enzima favorece la estabilización, comparado con la situación en disolución acuosa. En estas condiciones, se ha visto que las enzimas pueden trabajar a temperaturas por encima de su temperatura crítica o de estabilidad y además se puede aumentar la actividad catalítica disminuyendo la actividad de agua y aumentando la temperatura.

4.1. Efectos del disolvente sobre la actividad de la enzima

La actividad de la enzima en medios orgánicos depende en gran medida de la naturaleza del disolvente. Estos efectos, están referidos fundamentalmente a la distinta polaridad o hidrofobicidad de los disolventes utilizados. Los valores de K_m encontrados para las reacciones enzimáticas en disolventes orgánicos suelen ser mayores que los obtenidos para las mismas en medios acuosos. Estos efectos, son debidos a la solvatación efectiva del sustrato que se lleva a cabo en el disolvente orgánico, reduciendo su energía libre, por lo que la energía libre de activación de la reacción enzimática se incrementa resultando en una menor velocidad de reacción. La velocidad de reacción se puede incrementar aumentado la concentración de sustrato. Una forma de medir la solvatación de un sustrato en un rango de disolventes

considerado es determinar la partición de la sustancia entre estos dos disolventes y un disolvente *estándar* que es inmiscible con los otros dos.

Se han realizado muchos intentos para correlacionar la actividad de la enzima, estabilidad y selectividad con diferentes descriptores como el log P, constante dieléctrica, momento bipolar, parámetro de solubilidad de Hildebrand y algunos otros. Los resultados más fiables se han obtenido usando log P, logaritmo del coeficiente de partición de un disolvente dado entre 1-octanol y agua. El método, no es aplicable a disolventes orgánicos miscibles con el agua. Un camino alternativo para cuantificar la solvatación, consiste en realizar cálculos teóricos de las interacciones entre los distintos componentes de la mezcla de reacción. El universal UNI Funcional Actividad Coeficiente, conocido como modelo UNIFAC, constituye actualmente el método estándar más conveniente para evaluar los coeficientes de actividad en mezclas líquidas (43). Este modelo, tiene en cuenta las interacciones intermoleculares y la forma y tamaño de la molécula de cada componente del sistema y es especialmente adecuado para evaluar el comportamiento de soluciones formadas por compuestos orgánicos. Existe una buena correlación entre las velocidades de reacción y los coeficientes de partición, calculados a partir de los coeficientes de actividad en los diferentes disolventes. Es crucial, que los efectos de los disolventes sean estudiados a una actividad de agua fija. Los efectos indirectos causados por la competencia del agua entre la enzima y el disolvente pueden causar fuertes efectos y enmascarar los verdaderos efectos del disolvente. En general, podemos decir que son los disolventes hidrofóbicos los que mejor funcionan.

4.2. Efectos sobre el equilibrio

La constante de equilibrio de una reacción viene dada por la expresión:

$$K = \frac{a_C a_D}{a_A\, a_B}$$

El valor de K, no depende de la composición de equilibrio en principio y esta es la única constante de equilibrio necesario. Sin embargo, dado que las

actividades de sustratos y productos son a menudo de difícil acceso, las constantes de equilibrio basadas en la concentración, se utilizan con bastante frecuencia en lugar de aquellas. Las concentraciones se pueden, por ejemplo, expresar como la relación molar (x A, etc.). Para cada sustrato o producto, la relación molar y la actividad se pueden transformar usando los coeficientes de actividad (γ A, etc.), donde $a_A = \gamma_A x_A$.

Las diferentes constantes de equilibrio están por lo tanto relacionadas, como sigue:

$$K = K_\gamma K_x = \frac{x_C x_D}{x_A x_B} \frac{\gamma_C \gamma_D}{\gamma_A \gamma_B}$$

Donde K_x es la constante de equilibrio basada en la relación molar y Kγ es la combinación de los coeficientes de actividad mostrados en la fórmula. Los efectos del medio sobre las constantes de equilibrio basados en la concentración son descritos por los coeficientes de actividad. Para las reacciones del tipo ácido + alcohol ⇔ éster + agua, se ha sugerido una constante de equilibrio que considera la actividad de agua y las concentraciones:

$$K_o = \frac{[\text{ester}]\, a_w}{[\text{acido}][\text{alcohol}]}$$

La razón fundamental, es que la actividad del agua puede ser fácilmente medida y/o controlada en las mezclas de reacción y se fija para obtener buenas condiciones en la reacción enzimática. Para los otros reactantes es más práctico usar las concentraciones.

Tal y como puede verse a partir del equilibrio, el rendimiento se incrementa cuando disminuye la actividad de agua y esta es la tendencia general en reacciones de esterificación, aunque es necesario particularizar en cada caso ya que la necesidad de agua del catalizador en función de su estado (liofilizado, inmovilizado, modificado etc.) puede variar (19-22).

4.3. Efecto de los disolventes sobre enzimas no hidrolíticas

La mayoría de los trabajos recogidos en la bibliografía, hacen referencia a enzimas hidrolíticas. En medios acuosos, la posición de equilibrio de las reacciones catalizadas por estas enzimas normalmente favorece a los productos hidrolizados. La sustitución de la mayor parte del agua por un disolvente orgánico, permite dirigir la reacción en la dirección opuesta.

Para otros tipos de enzimas, especialmente enzimas redox, el reemplazo del agua o la adición de cosolventes apenas afectará a la posición de equilibrio de la reacción. Sin embargo, puede ser ventajoso el aumento de la solubilidad de sustratos y productos. Hasta ahora, sólo se han estudiado en esas condiciones un número limitado de enzimas no- hidrolíticas (44). Un interesante ejemplo, ha sido el estudiado por Cowan y col. (23). Usando una secADH (24) termoestable de una bacteria anaerobia termofílica, demostraron que unas bajas concentraciones de agua con disolventes orgánicos miscibles, tienen un efecto significativo sobre la enantioselectividad de la enzima. En la oxidación de 2 -butanoles quirales, el aumento de concentraciones (10 a 40% v/v) de acetonitrilo inducía un aumento de la selectividad para el R–enantiómero de 2,5 veces.

Un efecto similar, se encontró en la reacción inversa, la reducción de la 2-butanona. De Gonzalo y col., reportaron el uso de cosolventes orgánicos para oxidar sulfuros orgánicos con monooxigenasas Baeyer - Villiger, BVMOs, de diferentes fuentes: fenilacetona monooxigenasa (PAMO) de *Thermobifida fusca*, 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) de *Pseudomonas fluorescens* ACB y etionamida monooxigenasa (EtaA) de *Mycobacterium tuberculosi* (45). A pesar de que se obtuvieron actividades bajas, sin embargo, se consiguieron unas significativas mejoras en la enantioselectividad de la oxidación de tioanisol por PAMO y EtaA, que podrían ser inducidas por la adición de alcoholes de cadena corta como metanol y etanol. También, se observó una inversión de la enantio preferencia con EtaA, cuando se usó ^{t}BuOMe éter. Los autores, sugieren que en estas enzimas los disolventes ejercen su influencia sobre la enantioselectividad por unión en, o cerca del

centro activo de la enzima y, dependiendo de su estructura, interferirá con la unión del sustrato.

Otro ejemplo interesante, ha sido descrito por Yun y col. (46). Estos, sintetizaron un *cis* - (1 *S*, 2 *R*) - 1 - amino - 2 – indanol, un importante auxiliar quiral para resolver, por ejemplo, inhibidores de la proteasa del VIH, usando ω–transaminasas (ω–TA), de *Vibrio fluvialis* JS17 expresado en *E. coli*, por transaminación enantioselectiva del sustrato (R)-2-hidroxi indanona. En este caso, se produjo un aumento sustancial de la estéreo selección, cuando fueron añadidas cantidades relativamente grandes (hasta un 5% en peso) de γ - ciclodextrina, y la temperatura de reacción se redujo a 4°C.

A pesar de que los éteres corona y ciclodextrinas no son disolventes orgánicos en un sentido estricto, su efecto sobre la enantio selectividad presenta algunas similitudes con los cosolventes orgánicos (47).

Una posible explicación a estos hechos, se puede basar en saber si la relación entre la flexibilidad de la enzima y el rendimiento enantio selectivo en disolventes orgánicos está bien establecido. Simulaciones de dinámica molecular sobre la flexibilidad de la subtilisina y la movilidad de moléculas de agua unidas con tetracloruro de carbono, corroboran la idea de que los disolventes orgánicos reducen la flexibilidad molecular vía interacciones en los sitios específicos de la unión (48).

Así, podrán desarrollarse herramientas de predicción en base al conocimiento generado en este campo.

5 MODELADO MOLECULAR EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISOLVENTES

El Modelado Molecular, debe intentar interpretar y predecir resultados experimentales, y puesto que los procesos biocatalíticos se llevan a cabo en presencia de disolventes, esta herramienta de predicción podría ser muy interesante a la hora de estudiar el efecto de la solvatación.

Inicialmente, la mayoría de los cálculos de modelado incluyen las moléculas de agua que se encuentran en la estructura de cristal, pero no las moléculas de agua adicionales del disolvente, cuyo efecto generalmente se simula utilizando un parámetro dieléctrico dependiente, para intentar imitar la solvatación (49). Ke y cols. (50) utilizaron un método mejorado para simular el agua disolvente, un modelo electrostático continuo, pero los resultados fueron similares a los obtenidos del modelo más simple. Este tratamiento incompleto de solvatación es claramente una aproximación. Está documentado en la bibliografía que el disolvente puede cambiar la selectividad de la enzima, aunque existe aún desacuerdo sobre por qué ocurre esto (51).

Una de las posibles explicaciones propuestas atribuye la capacidad de estereodiscriminación a la diferente solvatación de los complejos diastereoisoméricos enzima-sustrato. En este sentido, Ke y Klibanov (51) estudiaron la enantio selectividad de la α-quimotripsina en la acilación de un diol proquiral, encontrando que el estado de transición que conducía hacia la acilación en el hidroxilo *pro-R,* colocaba un resto de 3,5-dimetoxifenilo en un bolsillo de la enzima, mientras que el estado de transición conducente a la acilación en el hidroxilo *pro-S* dejaba este resto arilo expuesto hacia disolvente. La propuesta de estos autores correlacionaba la enantio selectividad observada con los coeficientes de actividad termodinámica de la zona aromática expuesta, no como una predicción cuantitativa, sino como una correlación directa en el sentido de mejor solvatación de partes expuestas, mayor enantio selectividad. Sin embargo, este método no pudo ser extrapolado a otros sustratos.

Para complicar aún más la situación, también debe considerarse que ciertos aminoácidos que no están en contacto directo con el sustrato pueden influir de manera decisiva en la selectividad, tal y como sucede con el residuo 225 en la trombina, que nunca contacta con el sustrato, pero ejerce su influencia en la forma de canal de agua que se localiza en la proximidad del centro activo (52).

La capacidad de ciertas enzimas para trabajar de manera eficiente en medios no acuosos es ampliamente conocida. Entre estos medios, no

convencionales podemos considerar disolventes orgánicos (6, 53), líquidos iónicos (54) o fluidos supercríticos (55). En este sentido, las lipasas son enzimas especialmente interesantes (56), dado su excepcional actividad en disolventes orgánicos, por lo que el estudio mediante Modelado Molecular de su comportamiento en dichos medios constituye un campo de trabajo muy habitual. Una aplicación interesante, la constituyen las enzimas termoresistentes. En este caso, cuando se utilizan para trabajar en líquidos iónicos, debido a la naturaleza de estos disolventes pueden resistir temperaturas de hasta 120ºC, muy por encima de su temperatura de estabilidad. Nuestro grupo, ha demostrado recientemente al estudiar mediante dinámica molecular el comportamiento de estas enzimas, concretamente con lipasa de *Geobacillus thermocatenolatus* en el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio, que la energía necesaria para romper un puente de hidrogeno es el doble en el caso del líquido iónico respecto del agua. La estabilidad en el disolvente iónico a alta temperatura, se justifica parcialmente por la alta energía necesaria para la ruptura de los puentes de hidrógeno disolvente-proteína. Aunque los efectos hidrofóbicos podrían contribuir muy significativamente a la estabilidad. Para realizar este experimento, ha sido necesaria la construcción de una caja de moléculas de líquido iónico, para realizar la dinámica molecular, así como una caja de moléculas de agua tal como se muestra en la Figura 3. La temperatura de simulación fue de 363 K.

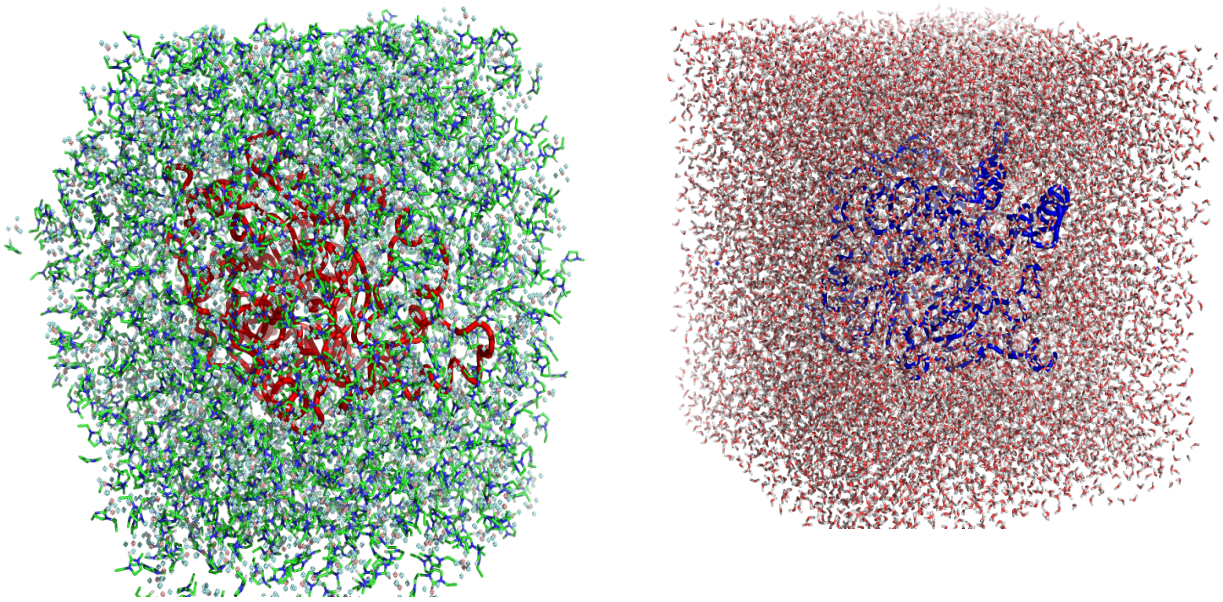


Figura 3.- Caja de moléculas de disolvente en la lipasa de Bacillus thermocatenulatus (A) liquido iónico (B) agua.

6. LÍQUIDOS IÓNICOS EN BIOCATÁLISIS

6.1. Propiedades solventes de los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos, han causado gran entusiasmo entre los químicos académicos e industriales en la última década. Se han utilizado como disolventes para producir transformaciones inorgánicas, orgánicas, organometálicas, y catalizadas por metales de transición. Como su nombre indica, estos disolventes, son sales líquidas (es decir, contienen sólo iones) y se refieren generalmente a sales de relativamente bajo punto de fusión (<100ºC) (57). Dentro de los más utilizados, son de especial interés los líquidos iónicos a temperatura ambiente, ya que son sales líquidas en una intervalo amplio de temperaturas y contienen típicamente por lo menos un ión orgánico, generalmente el catión. Este último, está estéricamente impedido, con baja simetría, débil interacción intermolecular y baja densidad de carga (57). Dentro de los más usados, destacan los cationes del 1-alquil-3-metilimidazolio, como son: 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim]+) o 1-etil-3-metilimidazolio ([emim]+), y de 1-alquil-1-metilpirrolidinio como: 1-butil-1-metilpirrolidinio ([bmpy]+). Los

aniones son típicamente inorgánicos en naturaleza con similares características que los cationes. Por ejemplo: $[BF_4]^-$, $[PF_6]^-$, $[SbF_6]^-$, $[CF_3SO_3]^-$ o $[(CF_3SO_2)_2N]^-$.

Recientemente, se han realizado excelentes revisiones sobre sus propiedades físicas y químicas, aplicaciones en catálisis, reacciones orgánicas y en química de metales de transición. Dentro de las propiedades (57-58) más importantes, se pueden destacar las siguientes: estos líquidos poseen excelente capacidad solvatante para una gran variedad de materiales orgánicos, inorgánicos, y poliméricos; no tienen presión de vapor medible; y se puede contener, reciclar y prevenir su escape al ambiente muy fácilmente. En este sentido, son frecuentemente considerados como disolventes no contaminantes. Pueden provocar aumentos significativos en la velocidad de reacción, producción y selectividad en reacciones químicas. Por ejemplo, han mostrado tener un efecto dramático en las velocidades y selectividades en reacciones de Diels-Alder (57), sustitución nucleofílica (SN_2), y Biocatálisis. Son generalmente líquidos incoloros con relativamente bajas viscosidades, con propiedades ácidas, básicas y superácidas inusuales (57-58). No son inflamables y tienen alta estabilidad térmica. Son frecuentemente disolventes polares no coordinantes, lo que les permite actuar como buenos disolventes para compuestos polares e iónicos sin el peligro de actuar como nucleófilos hacia centros metálicos activos en síntesis y catálisis. La variación del anión o el catión permite la preparación de literalmente miles de líquidos iónicos con la posibilidad de cambiar las propiedades de una sal para una aplicación específica. Por ejemplo, es posible cambiar la capacidad dadora de puente hidrógeno del disolvente sin variar la aceptora de puente de hidrógeno, y viceversa. En cuanto a la polaridad, si bien casi no hay gran influencia con la variación del catión o anión, todos tienen polaridad semejante a alcoholes de cadena corta (metanol, etanol). Por esto ellos son llamados disolventes de diseño (57-58).

6.2. Enzimas en líquidos iónicos

La desactivación de enzimas por disolventes orgánicos, incluyendo líquidos iónicos, se atribuye a la pérdida del agua esencial generalmente. Muchas enzimas requieren una capa de hidratación completa para ser activas,

aunque hay muchas excepciones como la lipasa de *Candida Antarctica* B que mantiene su actividad después de ser secada con pentóxido de fósforo y la proteasa de subtilisina, que sólo requiere unas pocas moléculas de agua fuertemente unidas por molécula de enzima para ser activa (59).

Los disolventes que son bien tolerados por estas hidrolasas, como por ejemplo, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, éteres y alcoholes (excepto metanol) interactúan débilmente, y se podría suponer que éstos actúan como haciendo un vacío a la enzima. Sólo los alcoholes, que son donadores y aceptores de H^+, se sabe que inhiben lipasas. Los solventes que interactúan fuertemente con las proteínas, tales como DMSO y DMF, incluso hasta el punto de disolverlas, también tienden a causar la pérdida irreversible de actividad.

El bajo *turnover* observado en medios orgánicos se ha atribuido, entre otras cosas, a la desestabilización que se produce en el estado de transición como resultado de la baja constante dieléctrica de los medios orgánicos habituales, lo que aumenta la energía del estado de transición altamente polarizado en comparación con el agua. Por lo tanto, los líquidos iónicos pueden, sobre la base de su naturaleza altamente polar, producir una menor desestabilización en el estado de transición.

Pueden preverse varios escenarios para la Biocatálisis en líquidos iónicos. La enzima puede estar disuelta en una mezcla acuosa-líquido iónico, que puede ser mono o bifásica, o podría estar suspendida o disuelta en un líquido iónico, con poca o ninguna agua presente. Por otra parte, las células en su conjunto podrían estar suspendidas en un líquido iónico, en presencia o ausencia de una fase acuosa. Medios acuosos-medios orgánicos mezclados se usan frecuente en las biotransformaciones para aumentar la solubilidad de reactivos y productos hidrofóbicos. Del mismo modo, mezclas acuosas con líquidos iónicos, se han utilizado para una variedad de biotransformaciones, pero en la mayoría de los casos no hay ninguna ventaja clara sobre la mezcla agua y disolventes orgánicos miscibles, tales como el ^{t}butanol.

La incompatibilidad de las enzimas y ciertos líquidos iónicos anhidros puede ser racionalizada sobre la base de los puentes de hidrógeno. En

particular, aniones que pueden formar fuertes puentes de hidrógeno, pueden disociar los enlaces de hidrógeno que mantienen la integridad estructural de la α - hélices y β - hojas, haciendo que la proteína se desenrolle completamente o parcialmente. El ión lactato, por ejemplo, puede formar enlaces de hidrógeno estables con el esqueleto polipéptidico. Ya se ha observado, que la desactivación de CaLB por [BMIm] [NO_3^-], por ejemplo, es parcialmente reversible. Este hecho, está de acuerdo con el modelo cinético generalmente adoptado de desactivación de la enzima, lo que implica un primer paso reversible y un segundo irreversible. La desactivación de CaLB por [BMIm] [dca], por el contrario, fue irreversible, y un experimento realizado con un pequeño ángulo de dispersión de neutrones indicó la formación de agregados (60), como se observa a menudo en el desenrollado de enzimas. Presumiblemente, los enlaces de hidrógeno también mantienen la conformación de la enzima desactivada de forma reversible. La reconstitución requiere que estos enlaces de hidrógeno se hayan disociado y rehecho en las formas nativas. Los desnaturalizantes diluidos a menudo facilitan la reconstitución, que incluye desnaturalización por líquidos iónicos, como se mencionó anteriormente, probablemente facilitando la reconstrucción a través de la formación de enlaces de hidrógeno transitorios.

Algunos ejemplos de enzimas en líquidos iónicos casi anhidros

Las lipasas que son conocidas por su tolerancia a los disolventes orgánicos, son interesantes candidatas para biocatálisis en líquidos iónicos. De hecho, las lipasas microbianas estables, tales como Cal B (61) y la lipasa de *Pseudomonas cepacea* (PCL) (62) fueron catalíticamente activas en líquidos iónicos del tipo 1-alquil-3-metilimidazolio y 1- alquilpiridinio en combinación con aniones tales como [BF_4], [PF_6], [Tfo]y [Tf_2N]. La lipasa llevó a cabo reacciones de transesterificación en estos líquidos iónicos con una eficiencia comparable a la del alcohol terc-butílico (63), dioxano (64), o tolueno. La lipasa de *Candida antarctica A* (CAL A), que fue diez veces más activa en [BMPy] [BF_4] y [BMIm] [Tf_2 N] que en diisopropiléter (DIPE) (65) es una excepción. Otras lipasas microbianas como por ejemplo, *Alcaligenes sp*. (ASL) (65, 66), CAL A, lipasa R*hizomucor miehei* (RML), y la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (65) también se han utilizado con éxito en líquidos iónicos anhidros.

La lipasa de páncreas porcino, PPL, catalizó reacciones de transesterificación en [BMIm] [NTF $_2$] pero no en [BMIm] [PF_6] (65, 66). La lipasa de *Candida rugosa* (CRL), que es generalmente mucho menos tolerante con los medios anhidros que otras lipasas microbianas, ha logrado ser utilizada en medio anhidro, así como en líquidos iónicos saturados en agua (67, 68). La lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* fue utilizada en [BMIm] [PF_6] y [BMIm] [BF_4] a diferentes valores de a_w con buenos rendimientos de esterificación (69). Las proteasas también se han utilizado con éxito en líquidos iónicos. La papaína llevó a cabo la hidrólisis enantioselectiva de una serie de ésteres de aminoácidos en una mezcla 80: 20 de [BMIm] [BF_4] y agua (70). La velocidad de reacción fue de aproximadamente el 50% de lo se obtiene en tampón acuoso e igual a las que se obtienen, en mezclas acuosas que contienen 70-80% de disolventes tales como acetonitrilo o alcohol terc-butílico.

Las Epóxido hidrolasas (EHasas) catalizan la apertura hidrólitica del anillo de epóxidos con formación de un diol. La justificación para el uso de un epóxido hidrolasa en un líquido iónico es mejorar la solubilidad de los reactivos hidrófobos. La hidrólisis del óxido trans-β-metilestireno en [BMIm] [BF_4], [BMIm] [PF_6], y [BMIm] [Tf_2 N] que contiene 1-10% de agua (dependiendo del preparado enzimático) fue sólo ligeramente más lenta que la misma reacción en el tampón acuoso (71). La β -galactosidasa de *B.circulans* fue activa en [MMIm] [$MESO_4$] en la reacción de condensación con sólo el 0,6% de agua, entre la galactosa y la glucosa para dar lactosa con un 18% de rendimiento (72). Cabe señalar que la reacción no se controló frente al tiempo, y la conversión de equilibrio podría ser más alta. También se han realizado tranglicosilaciones en [MMIm] [MESO 4]/agua (25: 75 v/v) con rendimientos mayores en comparación con los obtenidos en tampón acuoso (73). Las reacciones redox biocatalizadas se han llevado a cabo utilizando la maquinaria biocatalítica de la célula debido a la necesidad de reciclar el cofactor redox. Se ha visto que la fase orgánica, que a menudo se utiliza para almacenar los reactivos y productos poco solubles, puede ser sustituida por un líquido iónico, que parece menos perjudicial para la membrana celular (74). Una serie de cetonas se han reducido enantio selectivamente a los correspondientes (S)-

alcoholes por una levadura inmovilizada en un medio bifásico [BMIm] [PF_6]/ agua (91:9) (75). Los resultados fueron comparables a los obtenidos en un medio convencional acuoso-orgánico. La reducción de 4-cloroacetofenona mediada por L. Kefi se detuvo en 46% de conversión debido a que el reactivo y/o el producto resultaron tóxicos para la membrana celular. La adición de TBME (20% v/v) empeoró la situación debido a la toxicidad de este disolvente a la membrana, y el rendimiento del producto se redujo al 4%. Con líquidos iónicos, en particular [BMIm] [NTF_2], como fase orgánica, la conversión aumentó y el ee de producto, que siempre fue alto, mejoró a > 99%.

7. FLUIDOS SUPERCRÍTICOS EN BIOCATÁLISIS COMO MEDIOS DE REACCIÓN

Cuando un fluido se somete a condiciones por encima de su presión y temperaturas críticas, se encuentra en su estado supercrítico. En este estado, la línea de separación de fases líquido-gas se interrumpe. Esto implica la formación de una sola fase (Figura 4), en la que el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas: así pues, mientras se mantiene una gran difusividad (propia de los gases), se consigue una alta densidad (cercana a la de los líquidos).

En general, los fluidos supercríticos presentan unas propiedades como disolventes que permiten que puedan sustituir a los disolventes orgánicos y al agua, lo que desde el punto de vista medioambiental es muy interesante al reducir su consumo. Las ventajas de los FSCs respecto a los disolventes convencionales son numerosas, ya que tienen menos resistencia a la transferencia de materia; la solubilidad en estos FSCs es mayor que en fase gaseosa y similar a los disolventes líquidos; su densidad y poder solvatante puede modularse ajustando la presión y temperatura dentro de la zona supercrítica; también poseen altas difusividades, características de los gases y bajas viscosidades. En los procesos en los que se usan FSCs, se gasta menos energía que en aquellos que están basados en disolventes orgánicos. Una buena elección del FSC elimina los inconvenientes desde el punto de vista

medioambiental y de seguridad de los disolventes orgánicos como volatilidad, residuos, inflamabilidad y toxicidad.

Otra aplicación interesante de los FSCs, es la relacionada con su capacidad para ser usados como agentes de extracción, ya que los productos obtenidos se pueden recuperar fácilmente y el disolvente puede ser reutilizado. Esta tecnología se aplica a la obtención del café o te descafeinado, tabaco sin nicotina, fármacos, aromas, pinturas, antioxidantes, polímeros etc. Mediante una simple descompresión se puede provocar que el FSC pase a estado gaseoso, produciéndose una separación de fases y la precipitación de la sustancia extraída.

La tecnología supercrítica requiere equipos con especificaciones especiales, lo que acarrea un mayor costo inicial de las instalaciones. También se produce un aumento de los costes por los equipos auxiliares de control, prevención y protección.

El CO_2 se encuentra en la naturaleza de forma abundante, aunque a efectos prácticos todo el CO_2 que se destina a uso comercial, se obtiene como subproducto del proceso de fabricación del amoniaco tras ser purificado. Lo lógico, desde el punto de vista medioambiental y de la Química verde sería tomarlo de la atmósfera. Sus parámetros críticos son 31,3ºC y 72,9 bar, que son fácilmente alcanzables. Estas características, junto con su facilidad de transporte lo convierten en una opción barata y segura para ser usado como FSC al no ser tóxico y no dejar residuos (76-77).

En cuanto a sus propiedades como disolvente, también son buenas, ya que posee una baja reactividad, alta densidad y baja tensión superficial lo que reduce las limitaciones difusionales de los sustratos. No obstante, presenta algunos inconvenientes como su baja constante dieléctrica, lo que limita la solubilidad de sustratos polares. La adicción de un co-solvente polar como acetona, agua o etanol aumentaría la polaridad por formación de puentes de hidrógeno. También debido a que el CO_2 es un ácido de Lewis, puede reaccionar con bases fuertes lo que complica su uso en estos casos. Además, en presencia de metales nobles puede reducirse. Por otra parte, el CO_2 denso

produce bajos valores de pH si se encuentra en presencia de agua (formación de H_2CO_3). Cuando se trabaja con enzimas puede producir la desnaturalización de las mismas.

Dióxido de carbono supercrítico en biocatálisis

Desde el año 1985, se sabe que muchas enzimas son activas y estables en FSCs. La mayoría se corresponden a CO_2 supercrítico (CO_2sc) debido a las propiedades ya reseñadas (78).

La actividad en CO_2sc ha sido ensayada en enzimas como lipasas (79) polifenol oxidasa (80), fosfatasa alcalina (81) y colesterol oxidasa (82).

En el caso de las lipasas, se ha estudiado la esterificación de ácido oleico con etanol en CO_2sc catalizada por Lipozima IM60 inmovilizada en duolita (82), encontrándose una fuerte inhibición debido al etanol. Otras reacciones catalizadas por lipasas utilizando ácido mirístico y etanol obtuvieron una mayor conversión cuando el medio fue CO_2sc en relación al acetonitrilo (77). También en este caso, se observó inhibición por etanol. La acilación enantio selectiva de 1-feniletanol con acetato de vinilo como dador de acilo catalizada por lipasa de *Pseudomonas cepacea* produjo altas velocidades de reacción, mostrándose la enzima muy selectiva hacia uno de los isómeros (84). La presencia de agua en este tipo de sistemas produce los mismos efectos que en los disolventes orgánicos convencionales, pero es necesaria una mayor cantidad de agua para notar el efecto a nivel cuantitativo. El CO_2sc desplaza el coeficiente de partición del agua retirando el agua de la enzima debido a su gran hidrofilicidad.

El contacto directo de las enzimas con el FSC, no ejerce ningún efecto negativo, aunque si se produce pérdida de actividad en las etapas de descompresión. Este efecto es más acusado cuando hay gran cantidad de agua de hidratación alrededor de la enzima. El CO_2sc, puede tener efectos adversos sobre la enzima por disminución del pH del micro entorno de la enzima, por modificación covalente de los grupos amino de la superficie de la enzima, por formación de carbamatos o por desactivación debido a los ciclos de presurización despresurización (84). Otro aspecto interesante, es el conocer

cómo afectan las variaciones en las condiciones de reacción sobre la estabilidad de la enzima. Por regla general, un aumento en la presión estabiliza, mientras que un aumento de la temperatura produce desestabilización por desnaturalización térmica. El efecto que produce el aumento sucesivo de presión, se debe a la modificación de la solubilidad del agua en el medio (85). También se observa una mejoría de la estabilidad al aumentar la densidad del medio supercrítico. Desde el punto de vista de su aplicabilidad, el CO_2sc debido a su alta volatilidad y baja polaridad es muy interesante para su combinación con un disolvente no volátil y bastante polar como son los líquidos iónicos. Las diferentes miscibilidades de CO_2sc y de los líquidos iónicos conducen a sistemas de dos fases que encuentran aplicación en varias áreas. El éxito de estos sistemas bifásicos, está basado en la alta solubilidad del CO_2sc en el líquido iónico, que está controlada por la presión y la insolubilidad del líquido iónico en CO_2sc, a diferencia de los disolventes orgánicos moleculares (86). La utilización de líquidos iónicos para el desarrollo de métodos de separación es un campo inexplorado ya que se han utilizado fundamentalmente como disolventes y medios de reacción. Para líquidos iónicos miscibles con agua o cuando esta sea inadecuada para el tipo de reacción deseada, la opción de implicar extracción con CO_2sc, puede ser la más idónea. El principal interés por estos sistemas reside en la combinación de las buenas propiedades de los líquidos iónicos como disolventes y las buenas cualidades del CO2sc como agente de extracción. Esta combinación permite realizar cualquier reacción en un líquido iónico y recuperar los productos disueltos en el CO2 de una manera sencilla, rápida y limpia.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzymatic catalysis in organic media at 100-degrees-C. Science 1984, 224, (4654), 1249-1251.

2. Sym, E. A., On the esterase-effect. III. Biochemische Zeitschrift 1933, 258, 304-324.

3. Sym, E. A., The esterase effect. IV. Biochemische Zeitschrift 1933, 262, 406-424.

4. Sym, E. A., Action of esterase in the presence of organic solvents. Biochemical Journal 1936, 30, 609-617.

5. Wescott, C. R.; Klibanov, A. M., The solvent dependence of enzyme specificity. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology 1994, 1206, (1), 1-9.

6. Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature 2001, 409, (6817), 241-246.

7. Ke, T.; Klibanov, A. M., On enzymatic activity in organic solvents as a function of enzyme history. Biotechnology and Bioengineering 1998, 57, (6), 746-750.

8. Russell, A. J.; Klibanov, A. M., Inhibitor-induced enzyme activation in organic-solvents. Journal of Biological Chemistry 1988, 263, (24), 11624-11626.

9. Rich, J. O.; Dordick, J. S., Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates. Journal of the American Chemical Society 1997, 119, (14), 3245-3252.

10. Dordick, J. S., Enzymatic catalysis in monophasic organic-solvents. Enzyme and Microbial Technology 1989, 11, (4), 194-211.

11. Ogino, H.; Watanabe, F.; Yamada, M.; Nakagawa, S.; Hirose, T.; Noguchi, A.; Yasuda, M.; Ishikawa, H., Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant Pseudomonas aeruginosa PST-01. Journal of Bioscience and Bioengineering 1999, 87, (1), 61-68.

12. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzyme-catalyzed processes in organic-solvents. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1985, 82, (10), 3192-3196.

13. Michels, P. C.; Dordick, J. S.; Clark, D. S., Dipole formation and solvent electrostriction in subtilisin catalysis. Journal of the American Chemical Society 1997, 119, (40), 9331-9335.

14. Fessner, W.-D.; Anthonsen, T., Modern Biocatalysis. Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2009.

15. Butler, L. G., Enzymes in non-aqueous solvents. Enzyme and Microbial Technology 1979, 1, (4), 253-259.

16. Gargouri, M.; Legoy, M. D., The kinetic behaviour of a two-enzyme system in biphasic media: Coupling hydrolysis and lipoxygenation. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology 1997, 1337, (2), 227-232.

17. Verhaert, R. M. D.; Hilhorst, R.; Vermue, M.; Schaafsma, T. J.; Veeger, C., Description of enzyme-kinetics in reversed micelles .1. Theory. European Journal of Biochemistry 1990, 187, (1), 59-72.

18. Arroyo, M.; SanchezMontero, J. M.; Sinisterra, J. V., A new method to determine the a(w) range in which immobilized lipases display optimum activity in organic media. Biotechnology Techniques 1996, 10, (4), 263-266.

19. Chamorro, S.; Alcantara, A. R.; de la Casa, R. M.; Sinisterra, J. V.; Sanchez-Montero, J. M., Small water amounts increase the catalytic behaviour of polar organic solvents pre-treated Candida rugosa lipase. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2001, 11, (4-6), 939-947.

20. de Maria, P. D.; Sanchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R., Understanding Candida rugosa lipases: An overview. Biotechnology Advances 2006, 24, (2), 180-196.

21. Sanchez-Montero, J. M.; de la Casa, R. M.; Sinisterra, J. V., Water sorption isotherm as a tool to explore hydration of the microenvironment of biocatalysts. Stability and Stabilization of Biocatalysts 1998, 15, 453-458.

22. Arroyo, M.; Sanchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V., Thermal stabilization of immobilized lipase B from Candida antarctica on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. Enzyme and Microbial Technology 1998, 24, (1-2), 3-12.

23. Cowan, D. A., Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology 1997, 118, (3), 429-438.

24. Keinan, E.; Greenspoon, N., Highly chemoselective palladium-catalyzed conjugate reduction of alpha,beta-unsaturated carbonyl-compounds with silicon hydrides and zinc-chloride cocatalyst. Journal of the American Chemical Society 1986, 108, (23), 7314-7325.

25. Khmelnitsky, Y. L.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; Martinek, K., Engineering biocatalytic systems in organic media with low water-content. Enzyme and Microbial Technology 1988, 10, (12), 710-724.

26. Bordusa, F., Proteases in organic synthesis. Chem Rev 2002, 102, (12), 4817-68.

27. Chaplin, J. A.; Budde, C. L.; Khmelnitsky, Y. L., Catalysis by amine oxidases in nonaqueous media. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2001, 13, (4-6), 69-75.

28. Papanikolaou, S., Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl-beta-glucosides in a water-alcohol two-phase system. Bioresource Technology 2001, 77, (2), 157-161.

29. Kiljunen, E.; Kanerva, L. T., Chloroperoxidase-catalysed oxidation of alcohols to aldehydes. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2000, 9, (4-6), 163-172.

30. Park, C. B.; Lee, S. B.; Ryu, D. D. Y., Penicillin acylase-catalyzed synthesis of cefazolin in water-solvent mixtures: enhancement effect of ethyl acetate and carbon tetrachloride on the synthetic yield. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2000, 9, (4-6), 275-281.

31. Gargouri, M.; Legoy, M. D., Bienzymatic reaction for hydroperoxide production in a multiphasic system. Enzyme and Microbial Technology 1997, 21, (2), 79-84.

32. Jorba, X.; Clapes, P.; Xaus, N.; Calvet, S.; Torres, J. L.; Valencia, G.; Mata, J., Optimization and kinetic-studies of the enzymatic-synthesis of ac-phe-leu-nh2 in reversed micelles. Enzyme and Microbial Technology 1992, 14, (2), 117-124.

33. delaCasa, R. M.; SanchezMontero, J. M.; Sinisterra, J. V., Water adsorption isotherm as a tool to predict the preequilibrium water amount in preparative esterification. Biotechnology Letters 1996, 18, (1), 13-18.

34. Halling, P. J., Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media - theory, tests, and recommendations for experimental-design and analysis. Enzyme and Microbial Technology 1994, 16, (3), 178-206.

35. Bell, G. H., M.;Lindsay B-D.; Moore, D.A.; Ulijn, R.; Valivety, R., Enzymes in non aqueous solvents (Eds.:Vulfson E.N. halling, P.J. Holland, H.L. Humana Press, Totowa, New Jersey 2001, 105-126.

36. Wehtje, E.; Svensson, I.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B., Continuous control of water activity during biocatalysis in organic media. Biotechnology Techniques 1993, 7, (12), 873-878.

37. Petersson, A. E. V.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B., A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. Biotechnology and Bioengineering 2007, 97, (2), 235-241.

38. Zacharis, E.; Omar, I. C.; Partridge, J.; Robb, D. A.; Halling, P. J., Selection of salt hydrate pairs for use in water control in enzyme catalysis in organic solvents. Biotechnology and Bioengineering 1997, 55, (2), 367-374.

39. de la Casa, R. M.; Sanchez-Montero, J. M.; Rojas, R.; Sinisterra, J. V., Simple determination of the water content in lyophilized isoenzymes of Candida rugosa lipase. Biotechnology Techniques 1998, 12, (11), 823-827.

40. Adlercreutz, P., On The Importance Of The Support Material For Enzymatic-Synthesis In Organic Media - Support Effects At Controlled Water Activity. European Journal of Biochemistry 1991, 199, (3), 609-614.

41. Gupta, M. N.; Roy, I., Enzymes in organic media - Forms, functions and applications. European Journal of Biochemistry 2004, 271, (13), 2575-2583.

42. Hansson, T.; Andersson, M.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P., Influence of water activity on the competition between beta-glycosidase catalysed transglycosylation and hydrolysis in aqueous hexanol. Enzyme and Microbial Technology 2001, 29, (8-9), 527-534.

43. Fredenslund, A.; Jones, R. L.; Prausnitz, J. M., GROUP-CONTRIBUTION ESTIMATION OF ACTIVITY-COEFFICIENTS IN NONIDEAL LIQUID-MIXTURES. Aiche Journal 1975, 21, (6), 1086-1099.

44. Klibanov, A. M., Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents. Current Opinion in Biotechnology 2003, 14, (4), 427-431.

45. de Gonzalo, G.; Pazmino, D. E. T.; Ottolina, G.; Fraaije, M. W.; Carrea, G., 4-Hydroxyacetophenone monooxygenase from Pseudomonas fluorescens ACB as an oxidative biocatalyst in the synthesis of optically active sulfoxides. Tetrahedron-Asymmetry 2006, 17, (1), 130-135.

46. Yun , H., Kim , J. , Kinnera , K. , Kim , B. - G.; , Biotechnol. Bioeng. 2005, 93 390 – 395

47. Berglund, P., Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. Biomolecular Engineering 2001, 18, (1), 13-22.

48. Zheng, Y. J.; Ornstein, R. L., Molecular dynamics of subtilisin Carlsberg in aqueous and nonaqueous solutions. Biopolymers 1996, 38, (6), 791-799.

49. Kazlauskas, R. J., Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. Curr Opin Chem Biol 2000, 4, (1), 81-8.

50. Ke, T.; Tidor, B.; Klibanov, A. M., Molecular-modeling calculations of enzymatic enantioselectivity taking hydration into account. Biotechnology and Bioengineering 1998, 57, (6), 741-745.

51. Ke, T.; Klibanov, A. M., Insights into the solvent dependence of chymotryptic prochiral selectivity. Journal of the American Chemical Society 1998, 120, (18), 4259-4263.

52. Guinto, E. R.; Caccia, S.; Rose, T.; Futterer, K.; Waksman, G.; Di Cera, E., Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999, 96, (5), 1852-1857.

53. Adlercreutz, P., Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents. In Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media, Carrea, G.; Riva, S., Eds. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008; pp 3-24.

54. Itoh, T.; Tomoko, M., Biotransformation in ionic liquid. In Future Directions in Biocatalysis, Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2007; pp 3-20.

55. Matsuda, T.; Harada, T.; Nakamura, K.; Ikariya, T., Asymmetric synthesis using hydrolytic enzymes in supercritical carbon dioxide. Tetrahedron: Asymmetry 2005, 16, (5), 909-915.

56. Reetz, M. T., Lipases as practical biocatalysts. Curr Opin Chem Biol 2002, 6, (2), 145-50.

57. Dent, A. J.; Lees, A.; Lewis, R. J.; Welton, T., Vanadium chloride and chloride oxide complexes in an ambient-temperature ionic liquid. The first use of bis(trichloromethyl) carbonate as a substitute for phosgene in an inorganic system. Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions 1996, (13), 2787-2792.

58. Dupont, J.; de Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z., Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. Chemical Reviews 2002, 102, (10), 3667-3691.

59. Dolman, M.; Halling, P. J.; Moore, B. D.; Waldron, S., How dry are anhydrous enzymes? Measurement of residual and buried O-18-labeled water molecules using mass spectrometry. Biopolymers 1997, 41, (3), 313-321.

60. Sate, D.; Janssen, M. H. A.; Stephens, G.; Sheldon, R. A.; Seddon, K. R.; Lu, J. R., Enzyme aggregation in ionic liquids studied by dynamic light scattering and small angle neutron scattering. Green Chemistry 2007, 9, (8), 859-867.

61. Lozano, P.; De Diego, T.; Carrie, D.; Vaultier, M.; Iborra, J. L., Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2003, 21, (1-2), 9-13.

62. Kim, K. W.; Song, B.; Choi, M. Y.; Kim, M. J., Biocatalysis in ionic liquids: Markedly enhanced enantioselectivity of lipase. Organic Letters 2001, 3, (10), 1507-1509.

63. Erbeldinger, M.; Mesiano, A. J.; Russell, A. J., Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. Biotechnology Progress 2000, 16, (6), 1129-1131.

64. Nara, S. J.; Harjani, J. R.; Salunkhe, M. M., Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study. Tetrahedron Letters 2002, 43, (16), 2979-2982.

65. Schofer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U., Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. Chemical Communications 2001, (5), 425-426.

66. Itoh, T.; Akasaki, E.; Kudo, K.; Shirakami, S., Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: Reaction of enzyme anchored to the solvent. Chemistry Letters 2001, (3), 262-263.

67. Ulbert, O.; Frater, T.; Belafi-Bako, K.; Gubicza, L., Enhanced enantioselectivity of Candida rugosa lipase in ionic liquids as compared to organic solvents. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2004, 31, (1-3), 39-45.

68. Yu, H. W.; Chen, H.; Yang, Y. Y.; Ching, C. B., Effect of salts on activity, stability and enantioselectivity of Candida rugosa lipase in isooctane. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2005, 35, (1-3), 28-32.

69. Jesús Ramos Martín, M. N., Jose Vicente Sinisterra Gago,, J. M. S.-M., Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids

at high temperatures using a thermostable lipase of

Bacillus thermocatenulatus: A comparative study. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2008, 52–53, 162–167.

70. Liu, Y. Y.; Lou, W. Y.; Zong, M. H.; Xu, R.; Hong, X.; Wu, H., Increased enantioselectivity in the enzymatic hydrolysis of amino acid esters in the ionic liquid 1-butyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate. Biocatalysis and Biotransformation 2005, 23, (2), 89-95.

71. Chiappe, C.; Leandri, E.; Lucchesi, S.; Pieraccini, D.; Hammock, B. D.; Morisseau, C., Biocatalysis in ionic liquids: the stereoconvergent hydrolysis of trans-beta-methylstyrene oxide catalyzed by soluble epoxide hydrolase. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2004, 27, (4-6), 243-248.

72. Kaftzik, N.; Neumann, S.; Kula, M. R.; Kragl, U., Enzymatic condensation reactions in ionic liquids. In Ionic Liquids as Green Solvents: Progress and Prospects, Rodgers, R. D.; Seddon, K. R., Eds. 2003; Vol. 856, pp 206-211.

73. Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U., Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the beta-galactosidase catalysed synthesis of N-acetyllactosamine. Organic Process Research & Development 2002, 6, (4), 553-557.

74. Howarth, J.; James, P.; Dai, J. F., Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF6 and water mix. Tetrahedron Letters 2001, 42, (42), 7517-7519.

75. De Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L., Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the alpha-chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. Biotechnology and Bioengineering 2004, 88, (7), 916-924.

76. Dumont, T.; Barth, D.; Corbier, C.; Branlant, G.; Perrut, M., Enzymatic-Reaction Kinetic - Comparison In An Organic-Solvent And In Supercritical Carbon-Dioxide. Biotechnology and Bioengineering 1992, 40, (2), 329-333.

77. Srivastava, S.; Madras, G.; Modak, J., Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide. Journal of Supercritical Fluids 2003, 27, (1), 55-64.

78. Chulalaksananukul, W.; Condoret, J. S.; Combes, D., Geranyl Acetate Synthesis By Lipase-Catalyzed Transesterification In Supercritical Carbon-Dioxide. Enzyme and Microbial Technology 1993, 15, (8), 691-698.

79. Nakamura, K.; Chi, Y. M.; Yamada, Y.; Yano, T., Lipase activity and stability in supercritical carbon-dioxide. Chemical Engineering Communications 1986, 45, (1-6), 207-212.

80. Hammond, D. A.; Karel, M.; Klibanov, A. M.; Krukonis, V. J., Enzymatic-reactions in supercritical gases. Applied Biochemistry and Biotechnology 1985, 11, (5), 393-400.

81. Randolph, T. W.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; Wilke, C. R., Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. Biotechnology Letters 1985, 7, (5), 325-328.

82. Erickson, J. C.; Schyns, P.; Cooney, C. L., Effect of pressure on an enzymatic-reaction in a supercritical fluid. Aiche Journal 1990, 36, (2), 299-301.

83. Celia, E.; Cernia, E.; Palocci, C.; Soro, S.; Turchet, T., Tuning Pseudomonas cepacea lipase (PCL) activity in supercritical fluids. Journal of Supercritical Fluids 2005, 33, (2), 193-199.

84. Lozano, P.; Villora, G.; Gomez, D.; Gayo, A. B.; Sanchez-Conesa, J. A.; Rubio, M.; Iborra, J. L., Membrane reactor with immobilized Candida antarctica lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. Journal of Supercritical Fluids 2004, 29, (1-2), 121-128.

85. Kamat, S. V.; Iwaskewycz, B.; Beckman, E. J.; Russell, A. J., Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids - tuning enzyme-activity by changing pressure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993, 90, (7), 2940-2944.

86. Dzyuba, S. V.; Bartsch, R. A., Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO_2 systems. Angewandte Chemie-International Edition 2003, 42, (2), 148-150.

Capítulo VI

BIOCATÁLISIS APLICADA A LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS (I) ENZIMAS HIDROLÍTICAS

María J. Hernáiz

RESUMEN

En este capítulo se presenta una introducción sobre la versatilidad de las enzimas hidrolíticas en las biotransformaciones y sus principales aplicaciones en la síntesis de fármacos. El capítulo principalmente está centrado en el estudio de dos tipos de hidrolasas, las lipasas y proteasas. En esas dos secciones, se describen los ejemplos de mayor interés industrial donde se han utilizado estas enzimas de diferentes orígenes para la obtención de fármacos.

Palabras clave: Biocatálisis; Hidrolasas; Lipasas; Proteasas; Fármacos.

ABSTRACT

Applied Biocatalysis in drugs synthesis (I) Hydrolitic enzymes

This Chapter presents an introduction about the versatility of hydrolytic enzymes in biotransformations and theirs applications in the synthesis of drugs. The chapter is focus mainly on two types of hydrolytic enzymes, lipases and proteases. These two sections describe examples of industrial interest where these enzymes from different origins have been used in the synthesis of drugs.

Keywords: Biocatalysis; Hydrolases; Lipases; Proteases; Drugs.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, la búsqueda de nuevas moléculas con actividad farmacológica se ha llevado a cabo mediante técnicas innovadoras. Los avances en diferentes campos, tales como la biología molecular, bioquímica, química orgánica y biotecnología, entre otros, han permitido el alcance de nuevos objetivos a través de procesos más eficaces y rápidos. Se han desarrollado muchos y nuevos métodos sintéticos que permiten la obtención de extensas librerías de productos con potencial actividad terapéutica. En este sentido, el empleo de biocatalizadores, tanto en forma de enzimas aisladas o sistemas celulares ha sido de vital importancia.

Los grandes progresos realizados en los estudios a nivel molecular de los mecanismos de actuación de muchos compuestos, han revelado la importante influencia de la quiralidad en la efectividad de muchas moléculas. Una gran variedad de funciones biológicas tienen lugar a través de mecanismos de reconocimiento molecular, lo que requiere un perfecto acoplamiento entre el receptor y el ligando. En los sistemas biológicos, las enzimas y receptores son capaces de diferenciar los dos enantiómeros de un compuesto racémico a través de las diferentes uniones establecidas, lo que supone también una diferencia en la actividad de cada enantiómero. La quiralidad es un factor determinante en la eficacia de muchos fármacos, aditivos y otros productos químicos. En general, sólo uno de los enantiómeros, el eutómero, presenta la actividad biológica deseada; el otro isómero (o distómero) presenta diferente actividad; en algunos casos es inocuo para el organismo, pero en otros muchos puede inhibir el efecto del eutómero, o presentar otra actividad, dañina para el organismo (1), como ocurre en el conocido caso de la Talidomida (el enantiómero *R* presenta la actividad deseada contra los mareos y vómitos de mujeres embarazadas, mientras que el enantiómero *S* es teratógeno). En otros casos, los 2 enantiómeros presentan otras diferencias, como ocurre con el edulcorante artificial Aspartamo: un enantiómero es dulce y sin embargo el otro es amargo (2).

Por todo ello, la fabricación de la forma activa (enantiómero puro) de muchas sustancias se ha convertido en uno de los objetivos primordiales de la industria farmacéutica y agroalimentaria. La síntesis de compuestos ópticamente activos juega

un papel de gran relevancia en la obtención de nuevos principios activos quirales, así como en la obtención de intermedios sintéticos.

Las tres principales metodologías a partir de las cuales se pueden obtener compuestos ópticamente activos son las siguientes***: i)*** utilización de precursores quirales; ***ii)*** resolución cinética de mezclas racémicas mediante métodos físicos, catalizadores químicos o enzimáticos y ***iii)*** síntesis asimétrica, utilizando auxiliares químicos o biocatalizadores.

Actualmente, no sólo existe un gran interés en el diseño y descubrimiento de compuestos enantioméricamente puros, sino también en el desarrollo de nuevos procesos sintéticos a escala industrial, para permitir procesos más económicos y ambientalmente sostenible. Entre las diferentes metodologías para la obtención de enantiómeros puros cabe destacar la creciente importancia de la biocatalisis. En los últimos años, se ha producido un gran aumento en la utilización de enzimas y microorganismos en la transformación de múltiples sustratos con elevada quimio-, regio- y enantioespecificidad (3). Las enzimas son por naturaleza materiales quirales, por lo que pueden ser obtenidas sustancias ópticamente activas con un elevado exceso enantiomérico, a partir de mezclas racémicas o sustratos proquirales, o mediante transformaciones asimétricas. Tradicionalmente, estos productos se han obtenido a través de semi-síntesis, mediante la modificación de productos ya existentes, o a través de síntesis completas, lo que implica rutas sintéticas muy largas y en ocasiones difíciles de escalar. El desarrollo de procesos biocatalíticos en las dos últimas décadas, ha permitido su inclusión en procesos sintéticos, facilitando y simplificando esas rutas (4).

El número de procesos biocatalíticos llevados a cabo en la industria ha aumentado considerablemente en los últimos años, principalmente en el sector farmacéutico o en la fabricación de productos de alto valor añadido (5). Las enzimas utilizadas como catalizadores de reacciones orgánicas se pueden dividir en seis grupos (6): oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. La mayoría de los procesos biocatalíticos se desarrollan con la utilización de hidrolasas (60 %), seguido de oxidorreductasas (25 %); los otros 4 grupos de enzimas constituyen el 15 % restante (Figura 1), pero adquiriendo cada vez mayor importancia, como ocurre con las liasas, formadoras de enlace C-C (7).

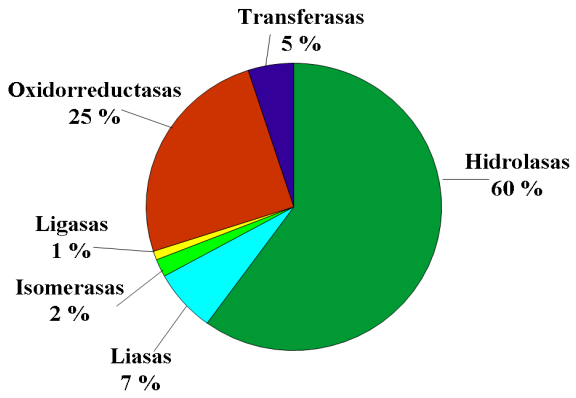


Figura 1.- Frecuencia del uso de las diversas enzimas como catalizadores químicos.

La utilización de biocatalizadores en síntesis presenta una serie de ventajas (8):

1. Son catalizadores eficientes, que actúan en intervalos de temperatura moderada (20-40ºC) y presión atmosférica, minimizando los problemas de epimerización, racemización e isomerización que puedan ocurrir.
2. Presentan una elevada selectividad: regio-, quimio- y enantioselectividad.
3. Su actividad no queda restringida a sus sustratos naturales, sino que admiten una gran variedad de sustratos.
4. Pueden catalizar un extenso abanico de reacciones, incluso llevar a cabo reacciones que químicamente no se podría, sobre grupos no activados del sustrato.
5. Principalmente las hidrolasas, presentan actividad catalítica en medios orgánicos, lo que permite la transformación de sustratos hidrofóbicos.
6. Los biocatalizadores pueden ser inmovilizados, lo que aumenta su actividad en determinados casos, y reutilizados en diferentes ciclos.
7. Las reacciones biocatalizadas son altamente compatibles con el medio ambiente, cumpliéndose los principios de la Química Sostenible (9).
8. Contribuyen al desarrollo de procesos ambientalmente benignos para la obtención de productos de alto valor añadido.
9. Los biocatalizadores son biodegradables.
10. Las enzimas pueden ser sobreexpresadas, haciendo los procesos biotecnológicos económicamente eficientes. La sostenibilidad de un proceso incluye la energía y materia prima utilizadas, las pérdidas de rendimiento con

productos secundarios, la seguridad del proceso y la calidad del producto. Ya existen numerosos procesos biocatalíticos establecidos en la industria, que han proporcionado una mejora de estos aspectos, lo que implica también una mejora económica del proceso y mayor competitividad (5c).

Frente a estas ventajas, la utilización de enzimas o de células enteras también presenta limitaciones. Muchas presentan actividad en un rango estrecho de pH y temperatura, pudiendo desactivarse fácilmente fuera de esos límites. La gran mayoría son susceptibles de sufrir inhibición por el sustrato o por el producto. Su actividad natural se lleva a cabo en medios acuosos, por lo que algunas pueden ser desactivadas en medios orgánicos. Existen diferentes técnicas para superar estas limitaciones y aumentar la eficacia de los biocatalizadores, como la alteración del medio de reacción (10) o la inmovilización del catalizador (11). En los últimos años, gracias a los avances en biología molecular, ingeniería genética y bioinformática, se están desarrollando técnicas tales como procesos de evolución dirigida, mediante los que se consiguen biocatalizadores más específicos, aumentando su actividad, su resistencia y su enantioselectividad, que incluso puede ser cambiada (12). Todo esto hará que en un futuro se incremente enormemente la implementación de procesos biocatalíticos en la industria.

2.BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR HIDROLASAS

Las hidrolasas constituyen, con diferencia, el grupo más extenso de catalizadores químicos utilizados en la industria farmacéutica. Son un grupo grande de enzimas que se clasifican en función del tipo de enlace que hidrolizan. La función natural de la mayoría de las hidrolasas es digestiva, ya que convierten los alimentos en unidades más pequeñas para la digestión. Por ejemplo, las proteasas hidrolizan las proteínas a péptidos más pequeños y luego a aminoácidos, las lipasas hidrolizan los lípidos (triglicéridos) a glicerol y ácidos grasos etc.

Tres características hacen a las hidrolasas útiles para el químico orgánico. En primer lugar, presentan una amplia especificidad de sustratos; además las hidrolasas suelen aceptar como sustratos diferentes intermedios sintéticos. En segundo lugar, presentan una alta estereoselectividad, incluso sobres sustratos no naturales y tercero, también catalizan otras reacciones, además de la hidrólisis, como

condensaciones (hidrólisis reversa) y alcoholisis (utilizar un alcohol en lugar de agua). Además, poseen otras características que hacen a las hidrolasas biocatalizadores útiles para la síntesis orgánica. Muchas hidrolasas están disponibles comercialmente, no requieren cofactores y toleran la adición de disolventes miscibles con el agua (por ejemplo, DMSO, DMF). Las lipasas, esterasas y proteasas también son estables y activas en un gran número de otros disolventes orgánicos más hidrofóbicos.

Las enzimas se clasifican por un número de la Comisión Europea (CE) en función del tipo de reacción que cataliza. En esta clasificación las hidrolasas pertenecen al grupo 3 y éstas a su vez se clasifican según el tipo de enlace que hidrolizan (Tabla I).

Tabla I. Hidrolasas útiles en síntesis orgánica.

Número EC	Tipo de enlace que hidrolizan	Ejemplos
3.1	Éster	
3.1.1	**Ésteres de ácido carboxílico**	**Lipasas**
3.2	Glicosídico	
3.2.1	***O*-glicosídico**	**α-Amilasa; β-Galactosidasa**
3.3	Éter	
3.3.2	**Epóxidos**	**Epoxidohidrolasa**
3.4	Peptídico	
3.4.16.21	**Serin proteasa**	**Subtilisina; Tripsina**
3.4.17.24	**Metalo proteasa**	**Termolisina**
3.5	Otras amidas	
3.5.1	**Amidas lineales**	**Penicilin G acilasas**
3.5.2	**Amidas cíclicas**	**Hidantoinasas**
3.5.3	**Nitrilos**	**Nitrilasas**

A continuación comentaremos la aplicación de las hidrolasas más utilizadas (lipasas y proteasas) en la producción a nivel industrial en la obtención de fármacos o sintones para la posterior preparación de los mismos y en los que se aprovechan la regio y estereoselectividad de las hidrolasas.

2.1. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3), son enzimas pertenecientes al grupo de hidrolasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga, de una forma regio- y enantioselectiva. Dada su estabilidad en medios orgánicos, el hecho de que no requieran cofactores, su elevada regio-, quimio- y enantioselectividad y el amplio espectro de sustratos que pueden transformar (13), son en muchas ocasiones el biocatalizador de elección en la preparación de

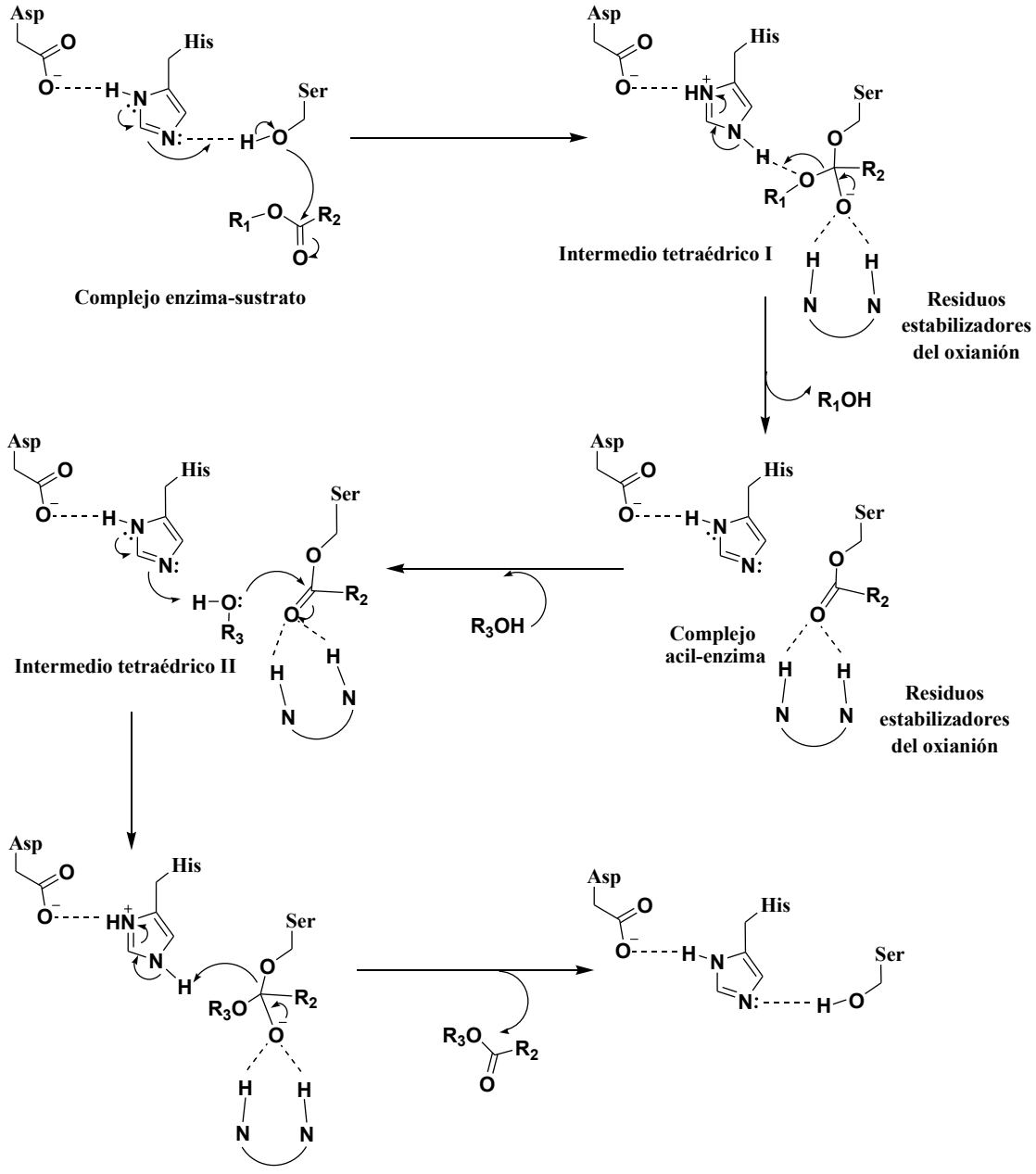
moléculas orgánicas quirales. Son las enzimas que mayoritariamente se emplean en procesos de resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes, ácidos, ésteres y aminas. Se utilizan preferentemente en la resolución de alcoholes secundarios (14), mediante procesos de hidrólisis de los correspondientes ésteres o procesos de transesterificación, por la elevada enantioselectividad que presentan frente a este tipo de sustratos. Se podría resumir que la enantioselectividad del proceso dependerá del origen de la lipasa, la estructura del sustrato y las condiciones experimentales de la reacción.

La versatilidad de estas enzimas hace que sean capaces de llevar a cabo también la hidrólisis de otros sustratos no naturales, así como la síntesis en medio orgánico de ésteres y otros compuestos. El mecanismo catalítico de las lipasas (desarrollado en el Esquema 1) es similar al descrito para las serín-proteasas (15), estando implicados los aminoácidos que conforman la triada catalítica, con las siguientes etapas:

1. El sustrato (R_1COOR_2) accede al centro activo de la enzima (complejo enzima-sustrato), situándose de forma que el carbono carbonílico es atacado por la serina catalítica, a través de su grupo hidroxilo activado. Esta activación se produce por la colocación especial de los tres aminoácidos catalíticos, que provoca una disminución del valor de p*K* del grupo hidroxilo de la serina: el protón del grupo –OH de la serina es captado por el nitrógeno Nε del anillo imidazólico de la His del centro activo, cuya carga positiva es estabilizada por el aspartato (o glutamato) que forma parte de la triada. Se forma así, el primer intermedio tetraédrico (I). La carga negativa, en principio situada en el oxígeno Oγ de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originándose un oxianión, el cual es estabilizado a través de la formación de uno o varios puentes de hidrógeno con los aminoácidos que constituyen el *"hueco oxianiónico".*
2. El intermedio tetraédrico se rompe al transferirse al oxígeno del alcohol saliente, el protón previamente cedido a la His, liberándose el alcohol y formándose el complejo acil-enzima.
3. Se produce un segundo ataque nucleofílico por parte del segundo sustrato R_3OH (H_2O en sistemas biológicos), previa activación similar a la descrita en el

apartado 1, sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima, formándose un nuevo intermedio tetraédrico (II).

4. El intermedio tetraédrico II colapsa tras la cesión al oxígeno de la serina del H captado por la His a partir del nucleófilo atacante, liberándose el producto (un ácido graso como producto natural) y regenerándose la serina catalítica.

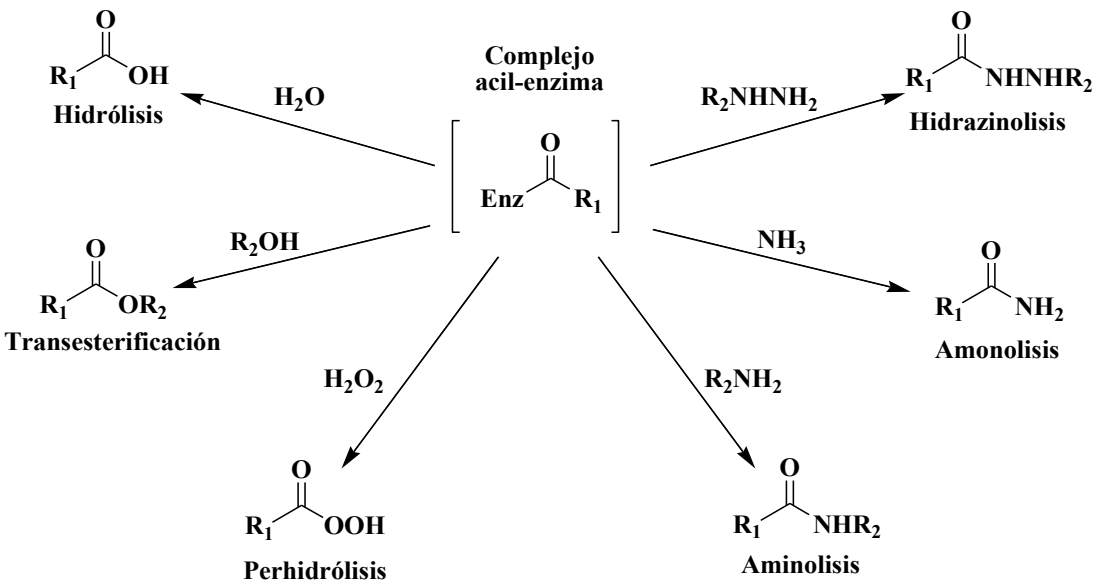


Esquema 1.- Mecanismo de hidrólisis de las lipasas.

Si el nucleófilo R_3OH es agua, la lipasa llevará a cabo la hidrólisis del éster sustrato, pero en un entorno con baja actividad de agua otros nucleófilos pueden competir con el agua en el ataque al intermedio acil-enzima, dando lugar a diferentes

productos. Esta versatilidad es utilizada en biotransformaciones para llevar a cabo distintos procesos (Esquema 2):

- Procesos de transferencia de acilo, en los que el ataque de un alcohol conduciría a la formación de ésteres (16).
- Procesos de aminolisis, como consecuencia del ataque de una amina, dando lugar a la formación de amidas (17).
- Procesos de amonolisis, si el nucleófilo utilizado es NH_3 (18).
- Formación de perácidos, cuando el peróxido de hidrógeno actúa como nucleófilo (19).
- Hidrazinolisis, actuando como nucleófilo una hidracina (20). La actuación como nucleófilo de una hidroxilamina dará lugar a la formación de derivados de ácido hidroxámixo (21).



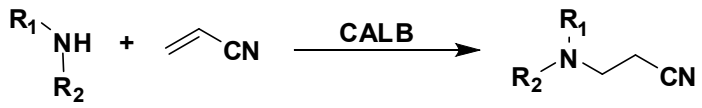
Esquema 2.- Reacciones catalizadas por las lipasas.

En este contexto se engloba el concepto de *"promiscuidad"* de las lipasas y de las enzimas en general, referido a la capacidad de estos biocatalizadores de llevar a cabo diferentes transformaciones químicas sobre un amplio número de sustratos, naturales o no (22).

Hule y Berlung (23), establecen tres tipos de *promiscuidad* enzimática, debidas a: i) las condiciones de reacción, ii) la variedad de sustratos y iii) la actividad catalítica

de la enzima. En el primer tipo, algunos autores incluirían la capacidad de muchas enzimas de presentar actividad en su medio no convencional, como es el caso de las lipasas en disolventes orgánicos. El segundo tipo de promiscuidad, se refiere al amplio rango de sustratos que pueden ser aceptados por las enzimas, como las lipasas, tal y como se ha descrito anteriormente. El mecanismo de acción sobre estos sustratos es similar en todos ellos, formándose un estado de transición equivalente al que se formaría con un sustrato natural. En este grupo, también se incluyen aquellos mutantes con los que se han obtenido enzimas capaces de tolerar un mayor número de sustratos que la enzima nativa, o con estereoselectividad opuesta, como en el caso de la lipasa de *Candida antartica*, isoforma B (CALB), cuya enantioselectividad fue transformada por Magnusson *y cols*. (24), pasando a ser *S*-selectiva en lugar de *R*-selectiva. De esta forma, mediante las diversas técnicas de biología molecular, a través de las cuales se obtienen diferentes mutantes enzimáticos, se está logrando la obtención de biocatalizadores activos frente a un mayor rango de sustratos (25) y más enantioselectivos (26).

Por último, el último tipo de *promiscuidad* enzimática mencionado, se refiere a la capacidad del sitio activo de las enzimas de catalizar más de una transformación química. Algunos investigadores han desarrollado otro tipo de reacciones, mediante el aprovechamiento de la maquinaria catalítica de las lipasas: el grupo de Gotor ha demostrado cómo se puede llevar a cabo una reacción de adición de Michael catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*, a partir de acrilonitrilo y diferentes aminas secundarias (Esquema 3) (27).



Esquema 3.- Reacción de adición de Michael catalizada por la lipasa B de Candida antartica (27).

Así mismo, en la bibliografía aparecen descritas otras innovadoras aplicaciones sintéticas de lipasas, como son las reacciones de formación de enlace C-C catalizadas por mutantes de CALB (mutantes Ser105Ala y Ser105Gly), que mostraron actividad aldolasa (28). También se demostró esta actividad en la lipasa nativa, pero en menor grado.

Recientemente, se ha demostrado que también algunas enzimas pueden llevar a cabo nuevas transformaciones químicas, en las que estaría implicado un centro catalítico diferente al que normalmente interviene en la actividad catalítica de la enzima (29).

Esta gran habilidad de las enzimas de presentar actividad frente a un amplio rango de sustratos, bajo diferentes condiciones, así como la mejora de biocatalizadores que se está logrando a través de ingeniería genética, supone un gran potencial en su aplicación en un amplio número de metodologías sintéticas.

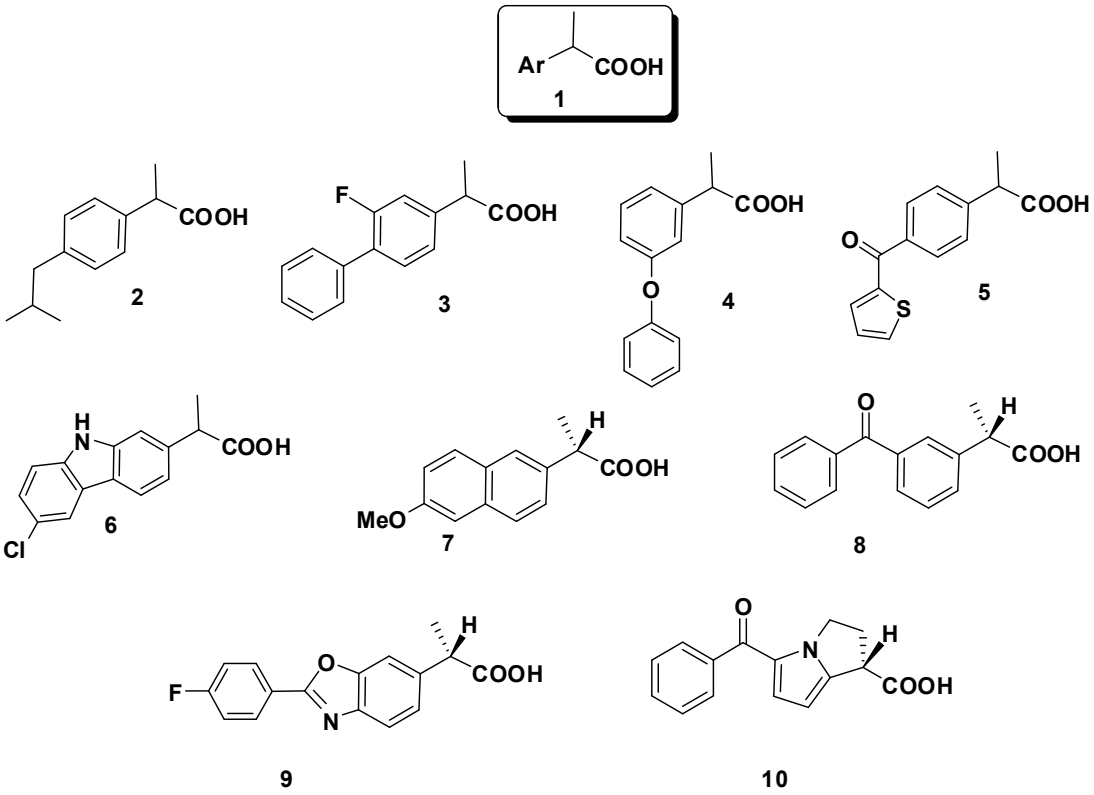
Dentro de las diversas aplicaciones de las lipasas en el campo de las biotransformaciones, en este capítulo nos centraremos en algunos ejemplos dónde se utilizan lipasas de diferentes orígenes en la obtención de compuestos de interés para la industria farmacéutica.

2.1.1. Lipasa de *Candida cylindracea* o *Candida rugosa*

La lipasa de *Candida rugosa*, también conocida como *Candida cylindracea* es una de las más utilizadas en biotransformaciones (30). Se conoce su estructura tridimensional (31) y se comercializa en diferentes preparados enzimáticos que contienen un porcentaje proteico bajo (aproximadamente un 16 % de proteínas) (32). Estos preparados se diferencian en la actividad enzimática pero no en la estereoselectividad de esta lipasa (33).

Existen numerosos ejemplos industriales dónde se usa esta lipasa para la obtención de productos de interés farmacéutico. Uno de estos, son los antiinflamatorios no esteroídicos, también conocidos como los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos, de estructura genérica **1** (Esquema 4) tienen una gran importancia. Entre ellos, citaremos el Ibuprofeno **2**, Flurbiprofeno **3**, Fenoprofeno **4**, Suprofeno **5**, Carprofeno **6**, Naproxeno **7**, Dexketoprofeno **8**, Flunoxaprofeno **9** o el Ketorolaco **10**. Estos fármacos, se suelen utilizar en gran número de procesos inflamatorios y especialmente en el tratamiento de las enfermedades reumatoides e incluyen una serie de procesos tales como artrosis, artritis reumatoide, dolores en columna vertebral, lumbago, etc., los cuales son responsables de una alta incidencia de bajas laborales. La actividad de estos fármacos está asociada a su capacidad de inhibir la ciclooxigenasa, responsable de la biotransformación del ácido arquidónico hasta prostaglandinas o tromboxanos (34). Numerosos estudios farmacológicos acerca de

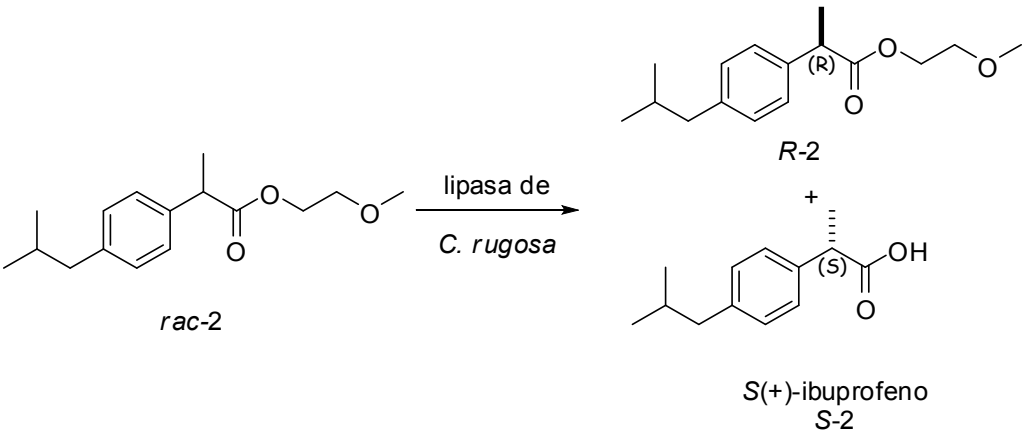
la actividad terapéutica de los dos enantiómeros de estos compuestos han demostrado que el isómero *S*(+) no sólo tiene un mayor poder antiinflamatorio -28 veces en el caso del Naproxeno (35) o 160 veces para el *S*(+) Ibuprofeno- frente al su antípoda *R*(-) (36), el cual es esencialmente inactivo como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (37), aunque puede tener efecto analgésico por mecanismos diferentes (38), sino que también el eutómero *S*(+) alcanza su concentración terapéutica en sangre antes que el racemato (39). No obstante, sólo el Naproxeno **7**, Dexketoprofeno **8**, Flunoxaprofeno **9** y el Ketorolaco **10** se venden cono enantiómeros puros, mientras que el más vendido de todos, el Ibuprofeno **2**, se comercializa como racémico.



Esquema 4.- Estructura de los antiinflamatorios no estereoídicos más utilizados.

De entre las diferentes metodologías descritas para la obtención enantioselectiva del eutómero *S* de estos compuestos, la utilización de lipasas que catalicen, bien la hidrólisis enantioselectiva de derivados racémicos de los profenos, bien la esterificación enantioselectiva de los mismos, resulta una interesante alternativa. La compañía norteamericana Pfizer ha desarrollado un proceso industrial para la obtención del eutómero *S*(+)-Ibuprofeno ***S*-2** partiendo de una mezcla

racémica del correspondiente éster metoxietílico ***rac*-2** (Esquema 5), catalizado por la lipasa de *C. rugosa* inmovilizada en los poros de un reactor de membrana (40).



Esquema 5.- Obtención del S(+)-ibuprofeno (S-2) por hidrólisis del éster racémico rac-2.

La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 20ºC, y a pH= 5, puesto que, aunque la lipasa muestra actividad en un amplio intervalo de valores de pH, se necesita un medio ácido para que disminuya la solubilidad del Ibuprofeno, puesto que la enzima se inhibe por exceso de producto. El principal inconveniente del proceso -la baja solubilidad de los productos en medio acuoso (por debajo de 1mM para el ***rac*-2**), que implicaría operar con reactores de gran volumen-, se elimina trabajando en un reactor de fibra hueca, donde la lipasa está atrapada no covalentemente en los poros de una membrana que separa un sistema bifásico agua-disolvente orgánico. Así, el sustrato ***rac*-2** se disuelve en la fase orgánica, y se circula por el exterior de la membrana, donde es convertido por la enzima y el correspondiente ácido se extrae a la fase acuosa. Posteriormente, un segundo reactor de membrana, fijado a un pH alto, permite la separación del producto ***S*-2** del enantiómero del éster que no ha reaccionado, ***R*-2**, el cual puede recircularse, lo que permite alcanzar altas productividades volumétricas (40).

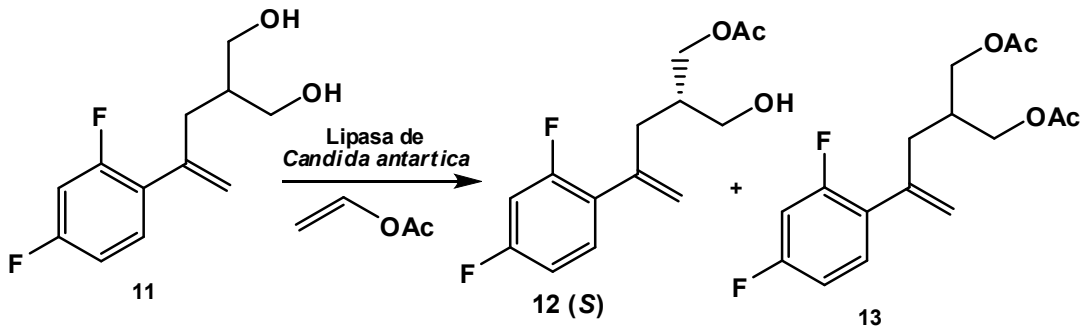
2.1.2. Lipasa de *Candida antarctica*

Es una de las lipasas más versátiles empleada en el campo de las biotransformaciones. Existen dos isoenzimas de esta lipasa, la forma A y la forma B, que presentan ciertas diferencias (41). La lipasa A (CALA) es dependiente de Ca^{2+} y más termoestable, mientras que la lipasa B (CALB) es menos termoestable y no dependiente de metales para su actividad. Su especificidad de sustrato presenta grandes diferencias, ya que la CALB es muy activa frente a gran variedad de

sustratos no naturales, mientras que la CALA tiene una menor versatilidad. Ambas isoenzimas han sido obtenidas en forma pura a través de procesos de clonación y sobreexpresión en *Aspergillus oryz*ae. Para aplicaciones preparativas CALB ha sido mucho más utilizada (42).

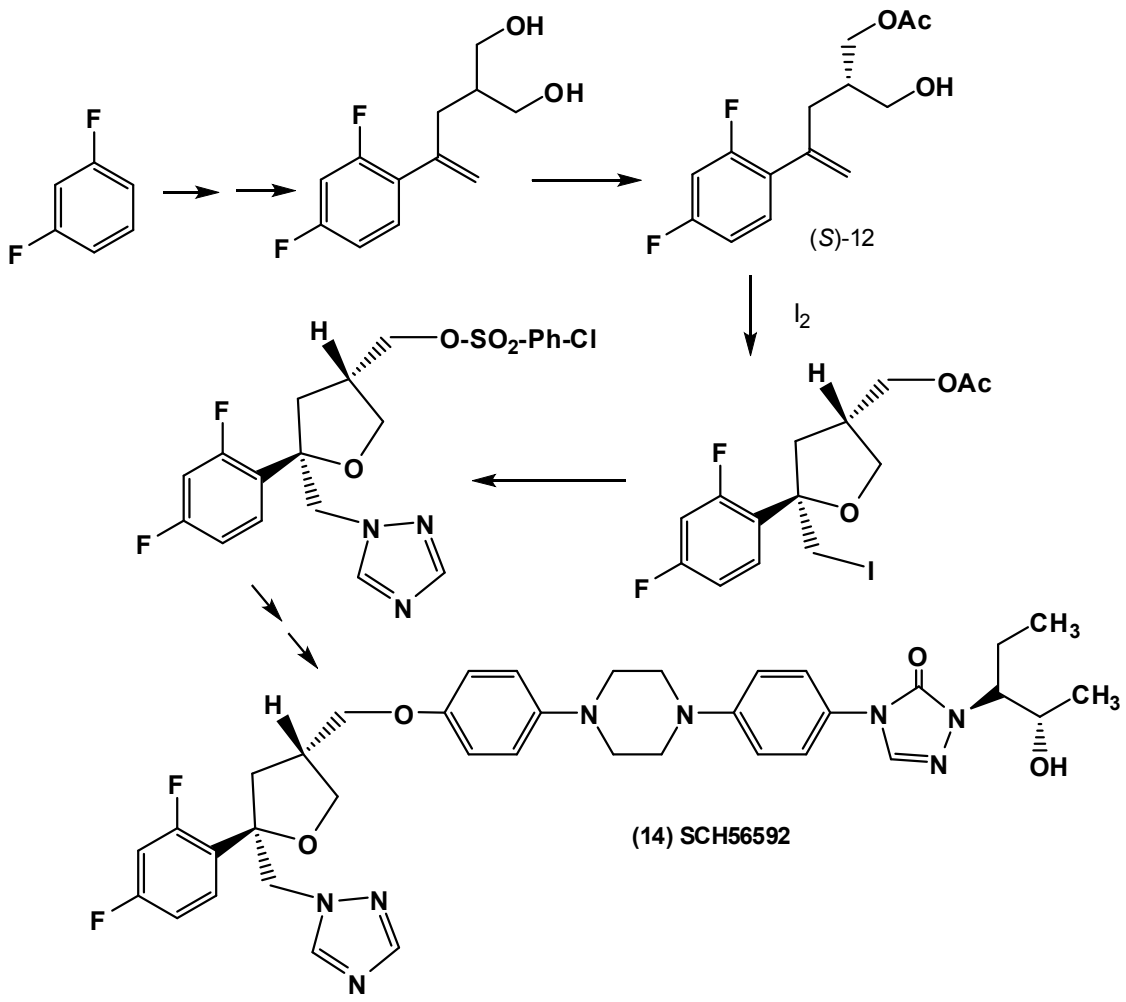
La estructura tridimensional de la CALB libre ha sido resuelta mediante difracción de rayos X (43). La CALB se presenta en diferentes preparados comerciales que difieren en el soporte sobre el que se incorpora el enzima. Uno de los preparados comerciales más empleado es el comercializado por Novo Nordisk como "Novozym 435", donde la enzima está soportada en una resina conocida como "Lewatit E". Una de las ventajas de este preparado es que es más estable que el enzima nativo (44).

La compañía Shering Plough ha desarrollado un proceso industrial para la obtención del sintón quiral (**12, *S***) (Esquema 6), clave en la síntesis de un potente antifúngico (compuesto SCH56592, **14**) (Esquema 7) utilizando la lipasa de *Candida antártica* Novozym 435 (45) y el acetato de vinilo como agente acilante. Esta enzima es capaz de llevar a cabo la acilación regioselectiva del compuesto **11** para obtener el compuesto monoacilado **12** de forma estereoselectiva y el compuesto diacilado **13** (Esquema 6). Esta reacción se lleva a cabo a una temperatura de 0ºC usando acetonitrilo como medio de reacción, ya que la siguiente reacción de iodociclación para la obtención del fármaco también se lleva a cabo en este mismo disolvente. La enzima es eliminada del medio de reacción tras una simple filtración y la mezcla de reacción es directamente llevada al siguiente paso químico del bioproceso (Esquema 7).



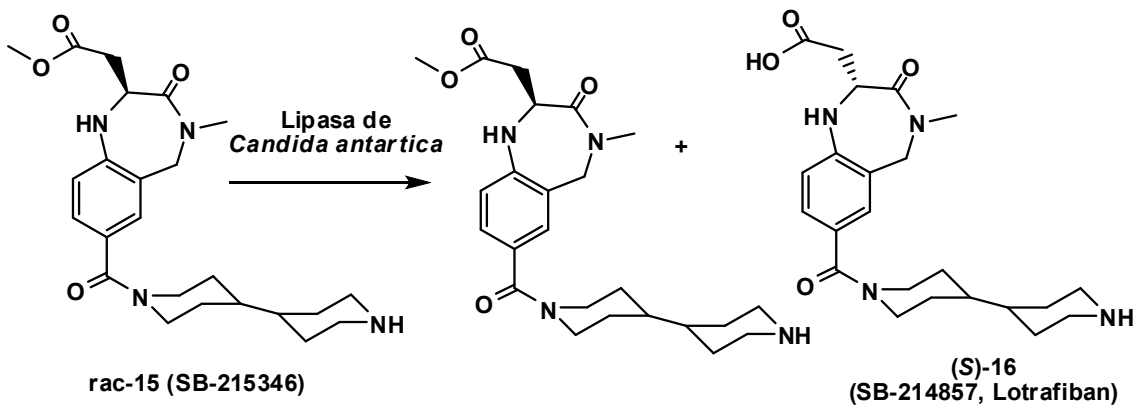
Esquema 6.- Obtención del sintón quiral 12 (S) por acilación quimio y regioselectiva del éster racémico 11.

El compuesto SCH56592 (**14**) es un potente antifúngico desarrollado por Schering que presenta una gran actividad en infecciones sistémicas producidas por *Candida pulmonary* y *Aspergillus*. El aumento de la actividad de este compuesto con respecto a otros antifúngicos que también presentan un grupo triazol en su estructura es debida a la presencia del anillo de tetrahidrofurano, el cual sustituye a un anillo de l,3-dioxolano presentes en otros azoles (46). La ruta sintética para el producto final trascurre a través de una intermedio clave que es el (2*R*, 4*S*)-fenilsulfonato, que posee la estequiometría necesaria en las posiciones 2- y 4- en el anillo de tetrahidrofurano, obtenida gracias a la iodociclación del monoester quiral (*S*)**12,** seguida por el desplazamiento del iodo por el anillo de triazol.



Esquema 7.- Síntesis quimioenzimática del antifúngico SCH56592.

Otro ejemplo industrial dónde se utiliza la lipasa *de Candida antartica* es el desarrollado por la compañía GlaxoSmithKline Pharmaceuticals para la síntesis del antitrombótico **Lotrafibran S-16**. Este fármaco, se utiliza en la prevención de los episodios trombóticos, es activo por via oral y es un antagonista de los receptores de fibrinógeno GPIIb /IIIa (47).

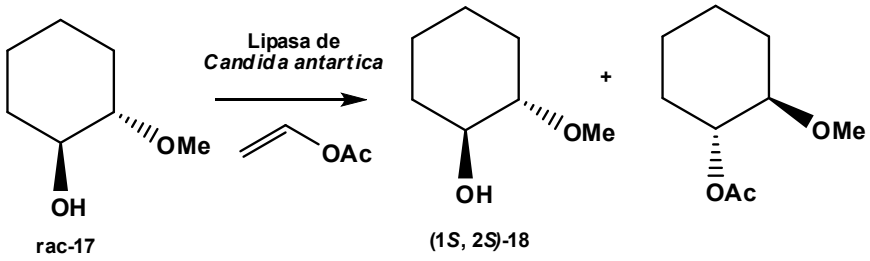


Esquema 8.- Obtención del lotrafiban (S)-16 por hidrólisis del éster racémico rac-15.

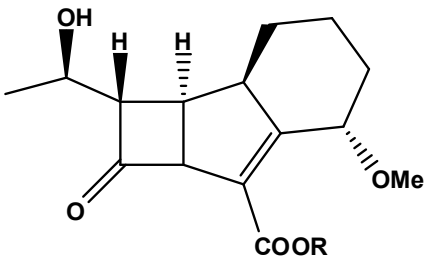
El compuesto (***S***)**-16** se preparó mediante un proceso de hidrólisis enantioselectiva a partir de la mezcla racémica **rac-15** (48). El proceso enzimático fue llevado a cabo en medio acuoso a 30ºC, utilizando la lipasa de *Candida antartica B* (CALB) inmovilizada covalentemente sobre una resina macroporosa Chirazyme L-2 suministrada por Boehringer–Mannheim. Tras las múltiples reutilizaciones del enzima, el coste de biocatalizador por Kg de fármaco obtenido fue mínimo (7-14€ por Kg de producto). El proceso enzimático fue escalado hasta 2.400 L, usando lipasa inmovilizada en un reactor tipo batch (tanque agitado). La separación del fármaco del medio de reacción es muy sencilla, ya que tras el tratamiento de la solución acuosa del medio de reacción con diclorometano, el ácido (***S***)**-16** permanece en la fase acuosa y el éster **rac-15** en la orgánica. De esta forma, se consigue aislar el ácido **(*S*)-16** con un rendimiento del 85 % y 99 % de exceso enantiomérico, con una pureza del 99 %.

Esa misma compañía (GlaxoSmithKline) también ha desarrollado un proceso enzimático para la obtención del (*1S,2S*)-metoxiciclohexanol (Esquema 9) (49), síntón

quiral utilizado en la síntesis de nuevos antibióticos β-lactámicos que presentan una estructura tricíclica (Esquema 10). El proceso enzimático fue llevado a cabo en reactor tipo batch, usando la lipasa de *Candida antarctica* comercializada por Novo Nordisk como Novozym 435 a temperatura ambiente y usando ciclohexano como medio de reacción. De esta forma, se consigue aislar el compuesto **1*S*,2*S*-18** con un rendimiento del 36 % y 99 % de exceso enantiomérico, con una pureza del 99 %.



Esquema 9.- Hidrólisis enantioselectiva de rac-17 utilizando la lipasa de candida antartica para la obtención del síntón quiral 1S,2S-18.



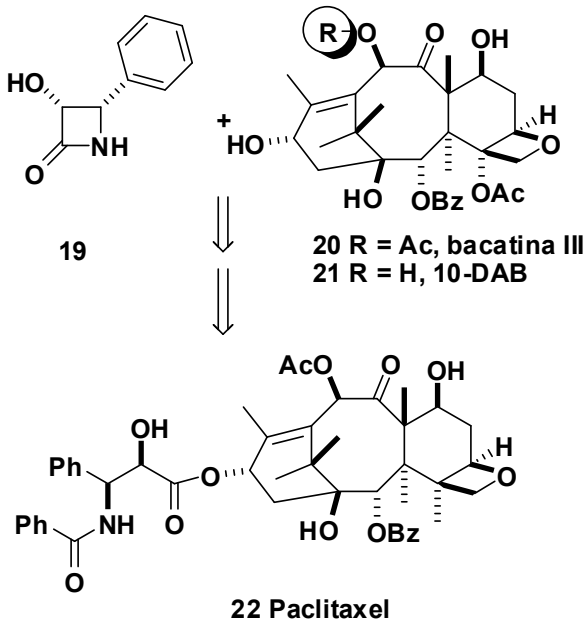
Esquema 10.- Estructura de nuevo antibióticos β-lactámicos tricíclicos.

2.1.3. Lipasa de Pseudomonas cepacia

Esta lipasa, al igual que otras aisladas pertenecientes a la especie *Pseudomonas,* ha sido empleada con alta selectividad tanto en reacciones de hidrólisis y alcolisis de ésteres y anhídridos, como en procesos de transesterificación de alcoholes. La estructura de rayos X de su conformación abierta ha sido elucidada, presentando la típica estructura de α/β-hidrolasa (50). Parece que esta lipasa

presenta un centro activo mucho más estrecho que otras lipasas, ya que en ciertos casos presenta inconvenientes para acomodar sustratos muy voluminosos.

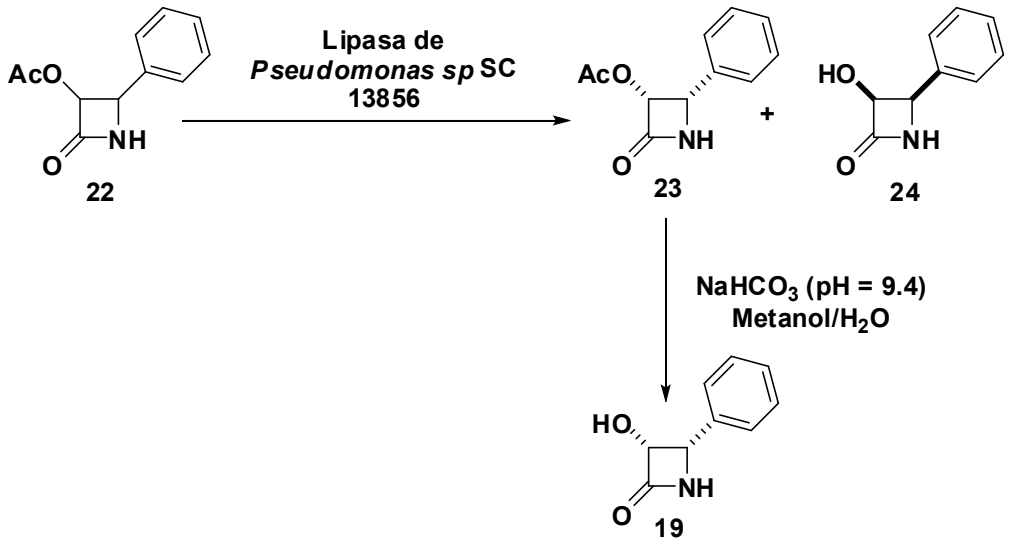
El Paclitaxel (Taxol) es un agente antimitosis, utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer entre los que podemos citar el cáncer de ovarios y de cáncer de mama (51). El Paclitaxel fue originalmente aislado de la corteza del tejo *Taxus brevifolia* y también se ha encontrado en otras variedades de tejo. El principal inconveniente es que el rendimiento es muy bajo (0,07%). Se ha estimado que son necesarias unas 20.000 libras de corteza de tejo (equivalente a 3.000 árboles) para producir 1 Kg de Paclitaxel (52). El desarrollo de un proceso semisintético para la producción de Paclitaxel a partir de, por un lado, bacatina III **20** o 10-desacetilbacatina III **21** y por el otro de la estructura lactámica **19** es una muy interesante propuesta (Esquema11).



Esquema 11.- Síntesis del Paclitaxel.

Para ello, se llevó a cabo la obtención de la estructura lactámica **19** mediante la hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidinona **22**. (Esquema 12) al correspondiente alcohol **23** y el *R*-acetato **24** (53) usando una lipasa PS-30 de *Pseudomonas cepacea* (Amano) y BMS lipasa (lipasa extracelular obtenida de la fermentación de *Pseudomonas sp.* SC 13856). El rendimiento de reacción

obtenido para el (R)-acetato **24** fue superior al 48 % (máximo teórico del 50 % para una resolución cinética) con un exceso enantiomérico superior al 99,5 %.



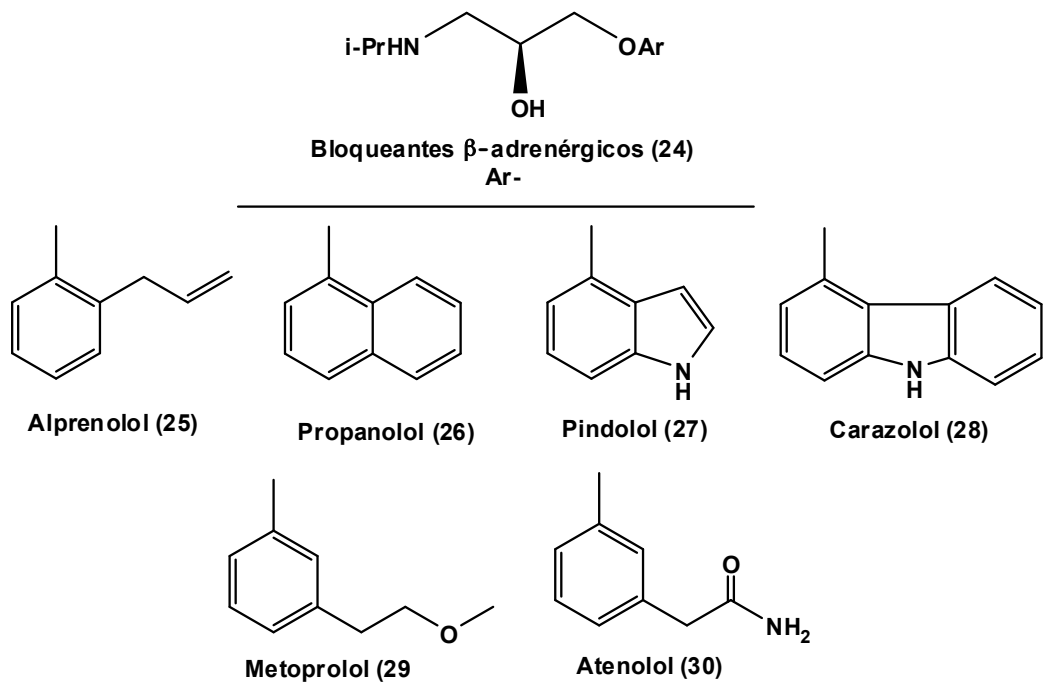
Esquema 12.- Hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico.

Las lipasas BMS y PS-30 fueron inmovilizadas sobre polipropileno Accurel (PP), y estas se pueden reutilizar (diez ciclos) sin pérdida de actividad enzimática, productividad o enantiopureza del producto **23** en el proceso de resolución. El proceso enzimático fue escalado hasta 250 L (2,5 Kg de sustrato), usando las lipasa BMS y PS-30, respectivamente. De cada "*batch*" de reacción, se aisló el *R*-acetato **23** con un 45 % de rendimiento y 99,5 % de ee. Mediante una suave hidrólisis en medio básico, el *R*-acetato se transformó químicamente al *R*-alcohol **19**, sintón que al ser acoplado a la bacatina III **20**, tras una protección y desprotección, permite preparar paclitaxel por un proceso semisintético (54).

2.1.4. Lipasa de páncreas porcino

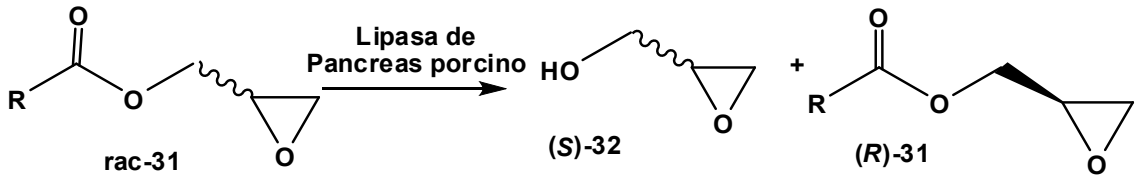
Esta lipasa es una de las más baratas y más utilizada en biotransformaciones. Se conoce su estructura terciaria y al igual que las otras lipasas mencionadas anteriormente e igualmente esta enzima se comercializa en diversos preparados enzimáticos (55).

Las ariloxipropanolaminas constituyen un extenso e importante grupo de fármacos bloqueadores β–adrenérgicos o β–bloqueantes muy utilizados en el tratamiento de la hipertensión, las arritmias, algunas formas de angina y ciertos tipos de ansiedad (**S-24-30**) (Esquema 13). Todos poseen un anillo aromático, un grupo amino terminal que presenta un sustituyente voluminoso para asegurar la afinidad por los receptores β y un carbono asimétrico en la cadena lateral, que es muy importante para el mantenimiento de sus acciones farmacológicas. La actividad ß bloqueante sólo aparece en los enantiómeros (*S*). Los (*R*), son agentes estabilizantes de membrana sin actividad antagonista ß. La compañía holandesa DSM ha desarrollado un proceso quimioenzimático para la preparación de estos bloqueadores β–adrenérgicos.



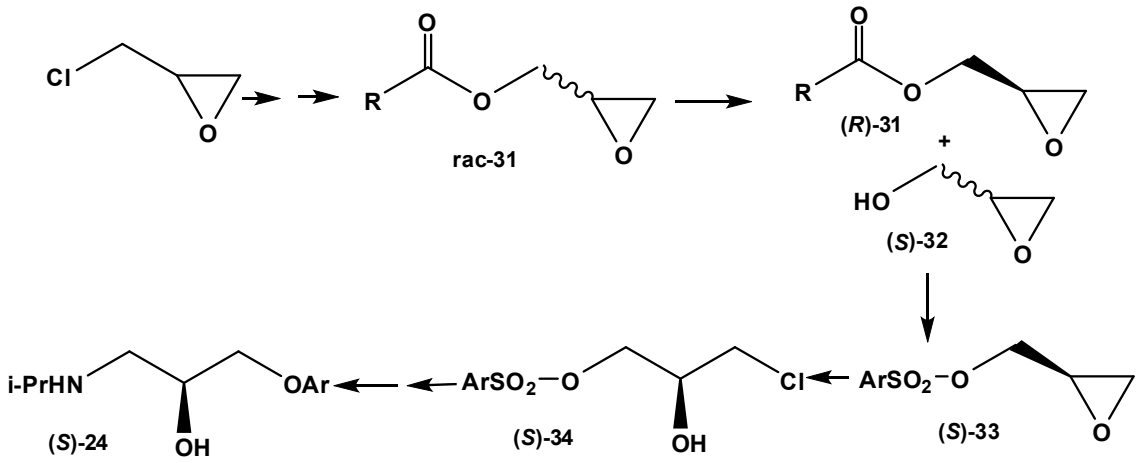
Esquema 13.- Estructura de los β–bloqueantes con estructura ariloxipropanolaminas.

En este sentido, el compuesto ***S*-31** es un intermedio quiral para la síntesis enantioselectiva de los fármacos β–bloqueantes (Esquema 14). La hidrólisis enantioselectiva del éster racémico **rac-31** se ha llevado a cabo con lipasa de páncreas porcino inmovilizada en un reactor de tanque agitado (56).



Esquema 14.- Hidrólisis enantioselectiva del compuesto rac-31 para la obtención del sintón quiral R-31.

En este bioproceso, se obtuvo un rendimiento superior al 85 % y un exceso enantiomérico superior al 99,9 % para la obtención del sintón quiral **(*R*)-31**, clave en la síntesis química de los fármacos β–bloqueantes con estructura de ariloxipropanolaminas (Esquema 15).

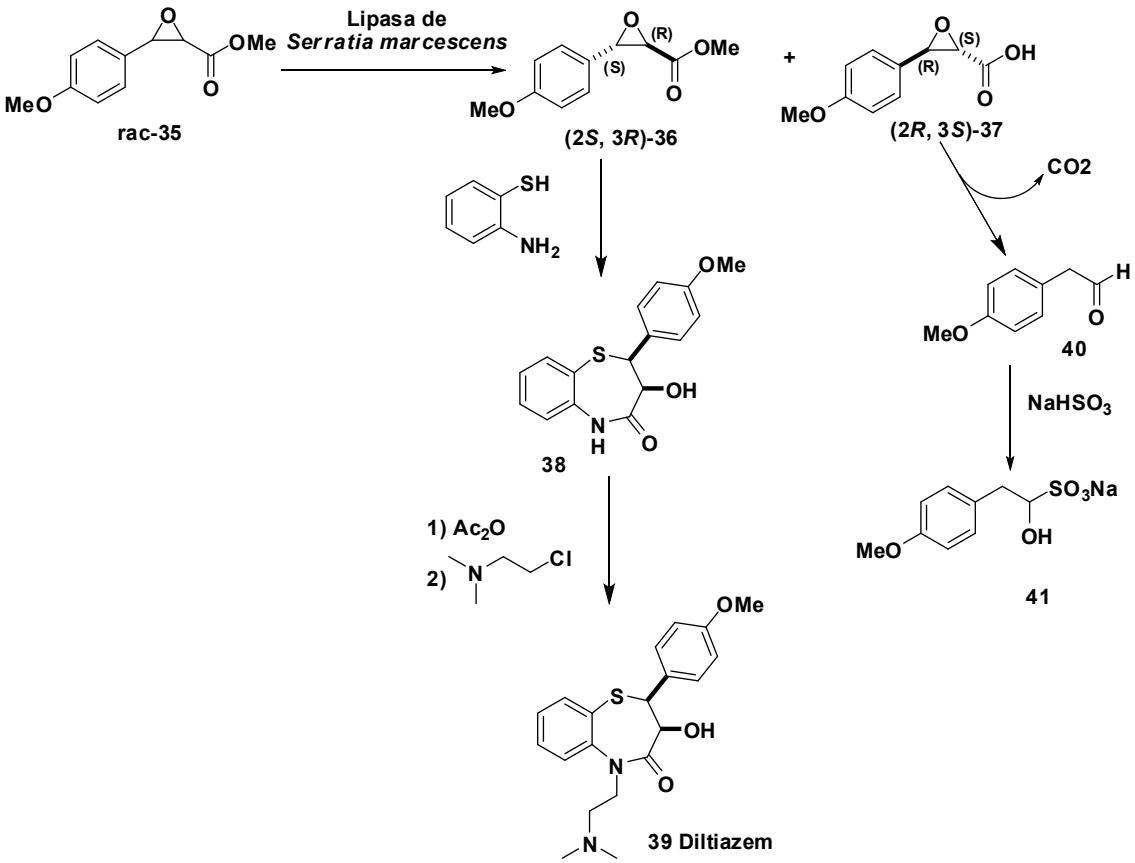


Esquema-15.- Esquema sintético para la preparación de fármacos β–bloqueantes adrenérgicos.

2.1.5. Lipasa de *Serratia marescens*

Esta lipasa es mucho menos conocida y utilizada a nivel industrial, pero cabe resaltar su uso en la obtención de un sintón quiral muy importante en la síntesis del Diltiazem (bloqueante de los canales de calcio). Los fármacos bloqueantes de los canales de calcio forman un grupo diverso, desde el punto de vista químico y

farmacológico. Desde el punto de vista químico, el diltiazen es una benzodiacepina que se usa para tratar la hipertensión y para controlar el dolor en el tórax (angina). Funciona al relajar los vasos sanguíneos para que el corazón no tenga que bombear con dificultad. También aumenta el suministro de sangre y de oxígeno al corazón. La compañía Tanabe Pharmaceutical ha comercializado una lipasa que cataliza la resolución del éster metílico correspondiente del ácido (+)-(*2S,3R*)-*trans*-3-(4-metoxifenil)-glicídico (MPGM) (**2*S*,3*R*)-35** (Esquema 16), un precursor clave para el diltiazem **36** (57-60). El proceso Tanabe utiliza una lipasa secretada por *Serratia marcescens* Sr41 8000. En este caso la lipasa cataliza la hidrólisis del racémico **rac-35** para "limpiar" el enantiómero deseado (**2*S*,3*R*)-36** del ácido producto de la hidrólisis enzimática (**2*R*,3*S*)-37**, el cual se descompone espontáneamente al aldehído **40**.



Esquema 16. Proceso Tanabe para la preparación del sintón quiral (*2S, 3R*)-36 para la obtención del diltiazem 39.

En el proceso Tanabe Pharmaceutical, en un reactor de membrana se combina la hidrólisis, separación y cristalización del (**2*S*,3*R*)-36**. En este sentido, el tolueno disuelve el sustrato racémico en el cristalizador y lo lleva hasta la membrana que contiene la lipasa inmovilizada. La lipasa cataliza la hidrólisis del enantiómero no deseado originando el ácido (**2*R*,3*S*)-37**, el cual pasa a través de la membrana en la fase acuosa. La espontánea descarboxilación del ácido, da el correspondiente aldehído que reacciona con el bisulfito en la fase acuosa. En ausencia de bisulfito, este aldehído desactivaría la lipasa. El enantiómero deseado (**2*S*,3*R*)-36** permanece en la fase tolueno y se lleva hasta el cristalizador. La actividad de la lipasa baja significativamente después de ocho ciclos y la membrana puede ser recargada con lipasa adicional. Con este proceso, el rendimiento del producto cristalizado (**2*S*,3*R*)-36** fue mayor del 43 % con el 100 % de pureza enantiomérica.

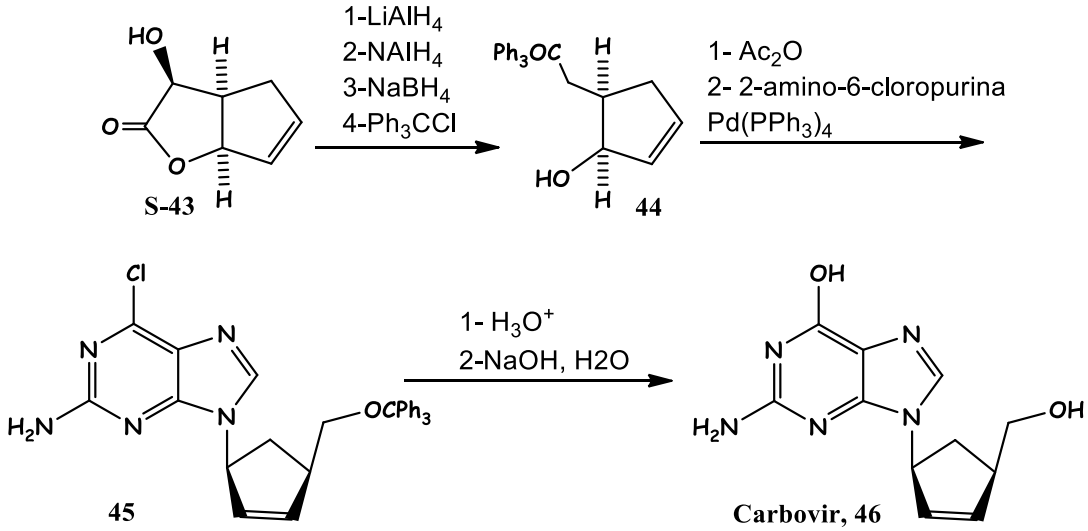
2.1.6. Lipasa de *Pseudomonas fluorescens*

La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* también ha sido muy utilizada en la resolución de compuestos quirales. Se conoce su estructura tridimensional y presenta un peso molecular de 33 kDa (61). Una importante aplicación industrial de esta lipasa es su utilización a nivel industrial para la preparación de un sintón quiral para la obtención del Carbovir, un fármaco utilizado frente al SIDA.

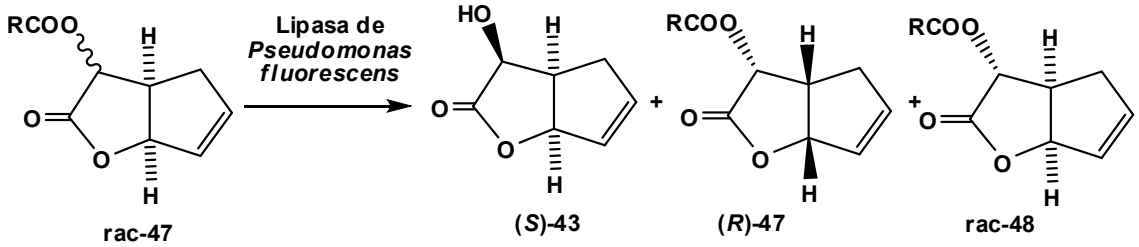
Las infecciones de origen vírico, constituyen una de las causas más importantes de mortalidad en todo el mundo. Desde finales del siglo XIX, la inmunoterapia representada por la vacunación, ha constituido la primera respuesta terapéutica eficaz contra la patogénesis viral. Sin embargo, la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), producido por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (62), un retrovirus humano del grupo de los lentivirus, orientó el tratamiento hacia otras formas terapéuticas, ya que la posibilidad de encontrar una vacuna eficaz en este caso se halla dificultada por la particular problemática que plantea el virus. Por estas razones, la terapia antivírica se basa en un conocimiento detallado del ciclo de replicación del virus y su interferencia. Por el momento, se han encontrado que los agentes antivíricos de mayor éxito actúan en la etapa de formación del provirus de ADN. Concretamente mediante la inhibición de la transcriptasa inversa, sintetizada por la célula huésped según las informaciones del ARN vírico, y que efectúa la transcripción inversa del ARN vírico en un ADN complementario, y mediante la inhibición de la proteasa. Entre los inhibidores de la

transcriptasa inversa destaca el Carbovir (63), que es un análogo de nucleósidos modificados (*C*-nucleósidos) que es estable, tanto a los medios ácidos como a la acción de las desaminasas, de manera que sin dejar de ser reconocidos por las quinasas celulares, y tras ser fosforilados, se enlazan a la transcriptasa inversa. La síntesis de Carbovir requiere la preparación del sintón quiral ***S*-43** (Esquema 17).

La compañía inglesa Celltech Group ha puesto a punto la hidrólisis enantioselectiva del compuesto **rac-47** con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en un reactor de tanque agitado, obteniendo el compuesto **(*S*)-43** con un 22 % de exceso enantiomérico. Mediante una simple extracción se consigue separar con heptano el alcohol ***S*-42** que permanece en la fase acuosa y el éster en la fase orgánica (Esquema 18) (64).



Esquema 17.- Síntesis del Carbovir (46) a partir del sintón quiral S-43 Proceso Tanabe para la preparación.



Esquema 18.- Hidrólisis enantioselectiva de rac-47 utilizando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* para obtener el sintón quiral *S*-43.

2.2. Proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. Son por tanto enzimas degradativas que hidrolizan las proteínas. Estas enzimas también son altamente estéreo- y regioselectivas; normalmente actúan en condiciones suaves de reacción con un pH óptimo entre 6 y 8 en todos los casos, son fáciles de manejar, no requieren cofactores, son bastante estables y, en general, relativamente simples en su arquitectura molecular. Las proteasas representan también un grupo importante de enzimas industriales (65).

De acuerdo a la clasificación EC, las proteasas pertenecen al subgrupo 4 dentro del grupo 3 (hidrolasas). Actualmente, estas enzimas se clasifican en base a tres criterios: i) tipo de reacción que catalizan, ii) naturaleza química del centro activo y iii) relaciones evolutivas en referencia al sustrato (66). En función de los grupos funcionales del centro activo tenemos serina proteasas, aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas.

Las serina proteasas son las más utilizadas en el campo de las biotransformaciones y como su nombre indica se caracterizan por la presencia de una serina en el centro activo que incluye una triada catalítica de tres aminoácidos: serina (nucleófilo), aspártico (electrófilo) e histidina (base), lo cual enseguida nos recuerda a una lipasa (Esquema 2).

Las proteasas tienen una larga tradición de aplicación en la industria alimentaria (fabricación del queso, mejora de la calidad del pan, preparación de hidrolizados de proteínas de soja, reducción del amargor de hidrolizados de proteínas, síntesis del edulcorante aspartamo) y como aditivos en detergentes (65). Su aplicación en el curtido de pieles sustituyendo a los reactivos químicos tóxicos tradicionales es relativamente reciente y les ha conferido mayor importancia si cabe en la industria biotecnológica. Al igual que las lipasas las proteasas se han aplicado con éxito en la síntesis química debido, a que al igual que las lipasas, presentan una alta estereoselectividad, incluso sobres sustratos no naturales y a su capacidad para catalizar la reacción inversa a la hidrólisis en medios no acuosos. Actualmente las proteasas son un reactivo más en el laboratorio de química orgánica. Entre sus aplicaciones en este campo, destacamos la síntesis de péptidos, la catálisis de reacciones de esterificación/transesterificación y la resolución de mezclas racémicas.

Salvo la primera, el resto de aplicaciones también las comparten las lipasas. De hecho, ambas clases de enzimas se complementan en numerosos procesos de síntesis (por ejemplo al presentar regioselectividades diferentes frente al mismo sustrato).

A continuación mostraremos algunos ejemplos de la aplicación de las proteasas para la obtención de compuestos de interés farmacológico.

2.2.1. Tripsina

La tripsina es una enzima muy utilizada en la digestión de muchas proteínas, en el caso de las aplicaciones dentro de la industria farmacéutica citaremos la obtención de la insulina por métodos biocatalíticos.

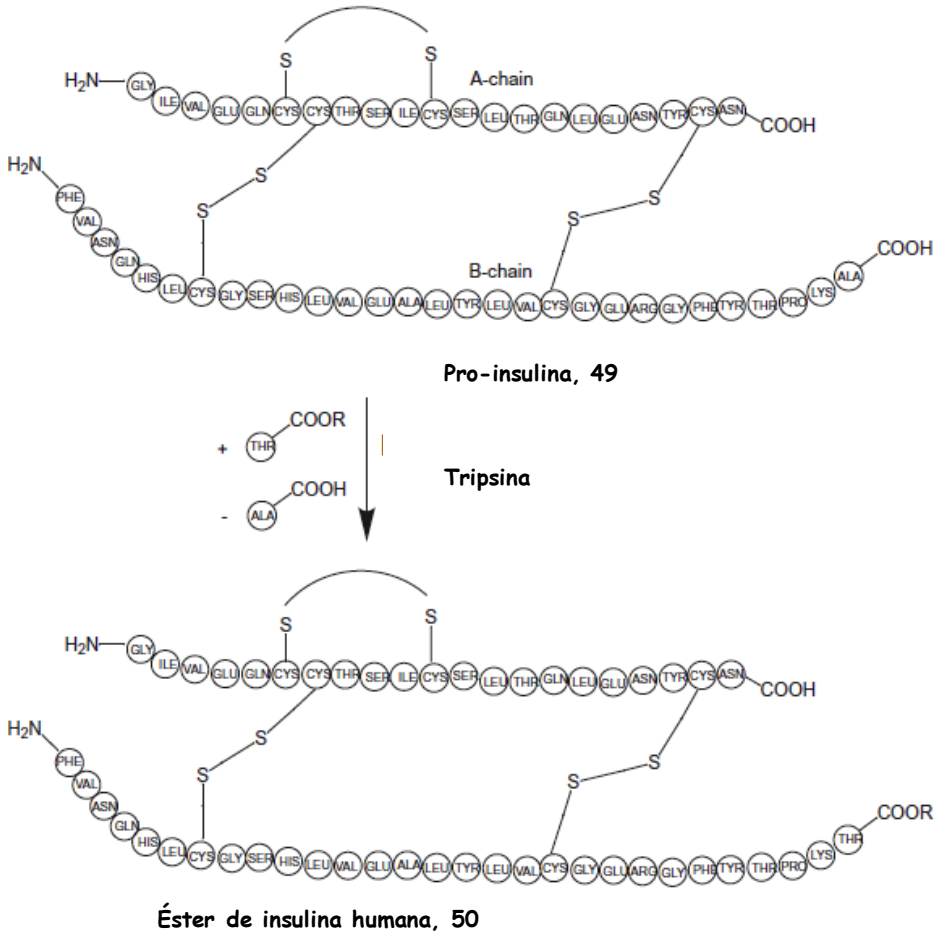
La insulina fue aislada por primera vez en 1921 a partir de páncreas de perro y su secuencia fue identificada por Sanger en 1955. La insulina es una hormona polipeptídica que se encarga de regular los niveles de azúcar en sangre y es usada para el tratamiento de la diabetes mellitus (aprox. 5% de la población occidental). La insulina está formada por dos secuencias de aminoácidos. La cadena A tiene 21 aminoácidos, y la cadena B tiene 30 aminoácidos. Las cadenas están unidas entre sí a través de los átomos de azufre de la cisteína (Cys). Las hormonas peptídicas por lo general son diferentes para cada especie, pero pueden tener similitudes. La insulina humana es idéntica a la insulina de cerdo, excepto que el último aminoácido de la cadena B del cerdo es alanina (Ala) en vez de treonina (Thr). Al ser una proteína, no puede suministrarse oralmente (proteolisis). Hoy día, existen 4 rutas para la obtención de insulina: 1) extracción de páncreas humano; 2) síntesis a partir de los aminoácidos individuales; 3) conversión de insulina porcina en humana; 4) fermentación a partir de microorganismos modificados genéticamente. En este último caso existen a su vez diferentes posibilidades para obtener insulina:

- Producción de pro-insulina, transformada en insulina por traspeptidación.
- Producción de pro-insulina usando células de *E. coli* modificadas genéticamente y posteriores pasos de síntesis y purificación.

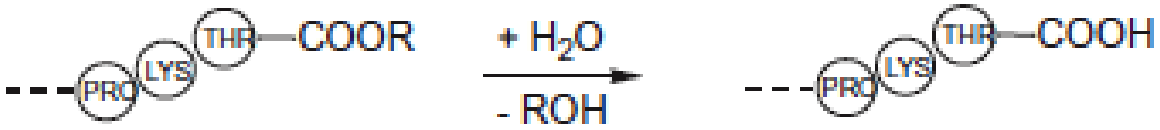
En todos estos métodos se utiliza un precursor de la insulina que es proteolíticamente estable.

PRODUCCIÓN DE PRO-INSULINA, TRANSFORMADA EN INSULINA POR TRANSPEPTIDACIÓN

En este caso, la compañía danesa Novo Nordisk ha puesto a punto la obtención de pro-insulina a través de fermentación de células de *S. cerevisiae* modificadas genéticamente (**49**) y posteriormente tratada con tripsina de páncreas porcino, que hidroliza el aminoácido alanina (Ala) del extremo C-terminal de la cadena B, e incorpora por traspeptidación el aminoácido treonina (Thr) en forma de éster (**50**) (Esquema 19). De esta forma obtenemos la insulina humana esterificada que posteriormente es hidrolizada para dar lugar a la insulina humana (67) (Esquema 20). Este proceso es llevado a cabo en un reactor de tanque agitado con una conversión del 99,9 % y un rendimiento y selectividad superiores al 97 %.



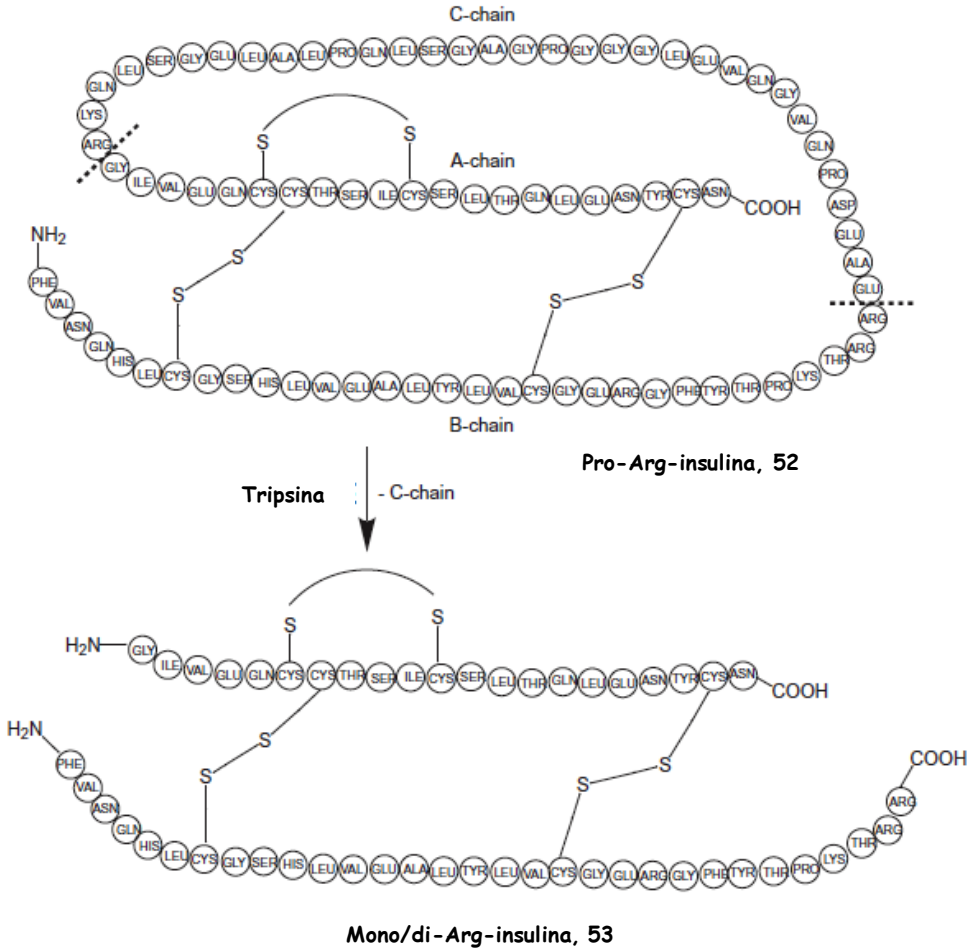
Esquema 19.- Producción de pro-insulina, transformada en insulina por transpeptidación.



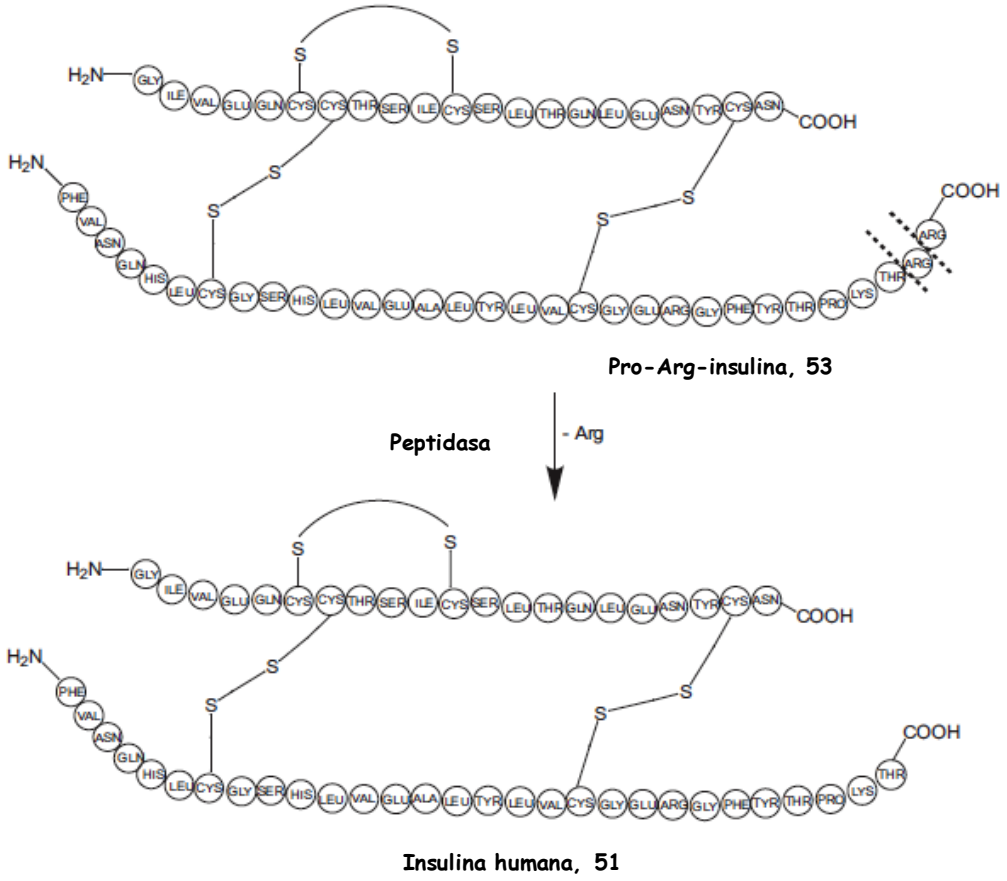
Esquema 20.- Hidrólisis enzimática de la insulina humana.

PRODUCCIÓN DE PRO-INSULINA USANDO CÉLULAS DE E. COLI MODIFICADAS GENÉTICAMENTE Y POSTERIORES PASOS DE SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN

En este caso, la compañía americana Eli Lilly ha puesto a punto la obtención de una pro-insulina (Pro-Arg-insulina, **52**) directamente por fermentación a partir de células de *E. coli* recombinante y que tras un primer tratamiento con tripsina de páncreas porcino, se obtiene un segundo precursor de la insulina (Mono/di-Arg-insulina, **53**) con un rendimiento del 70 % en un reactor de tanque agitado (Esquema 21). Posteriormente, esta mono/di-Arg-insulina **53**, sufre una segunda hidrólisis enzimática, utilizando para ello una peptidasa de páncreas porcino, que hidroliza los dos restos de arginina (Arg) presentes en el extremo C-terminal de la cadena B, con una conversión superior al 99%, un rendimiento del 95 % y una selectividad superior al 99 % (Esquema 22).



Esquema 21.- Producción de Mono/di-Arg-insulina, 53 a partir de Pro-Arg-insulina, 52 por tratamiento con tripsina.



Esquema 22.- Produción de insulina humana (51) a partir de Mono/di-Arg-insulina (53) por tratamiento peptidasa específica de Arg.

2.2.2. Proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (Subtilisina Carlsberg)

La proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, también conocida como subtilisina Carlsberg o subtilisina A (EC 3.4.21.62), fue descubierta en 1947 por Linderstrom-Lang y Ottesen en los laboratorios Carlsberg, de ahí su nombre. Es una endopeptidasa con un peso molecular de 27,5 KDa, una temperatura óptima de trabajo de 60ºC y un pH óptimo de 10. Presenta una amplia especificidad de sustrato, lo que le confiere una gran utilidad sintética. La triada catalítica la componen los residuos Ser221, His64 y Asp22. Un catión de calcio está presente en su estructura, pero no es necesario para su actividad.

Al igual que las lipasas, la subtilisina de Carlsberg se emplea en las resoluciónes cinéticas de compuestos de interés industrial; como ejemplo citaremos la

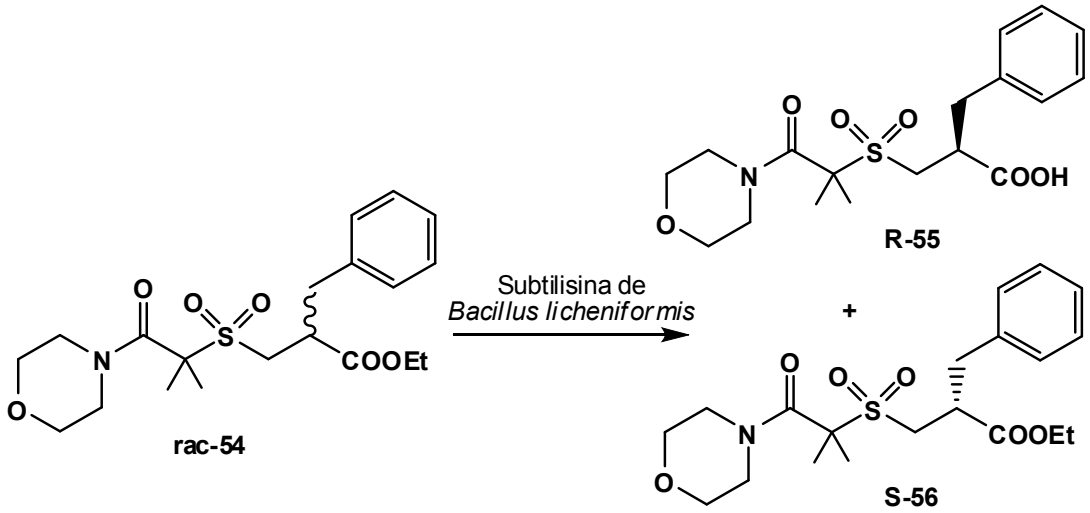
utilización de esta proteasa por la compañía suiza Hoffmann La-Roche para la obtención de un sintón quiral útil en la síntesis de inhibidores de la renina.

La renina es la enzima que limita la síntesis de angiotensina II y la activación del sistema renina-angiotensina (SRA), por lo que desde hace más de 50 años se han intentado desarrollar fármacos activos por vía oral capaces de inhibir directamente la renina. Recientemente, se ha demostrado que la prorrenina y renina son moléculas activas que interactúan con un receptor específico y que su estimulación activa diversas vías de señalización independientes de las activadas por la angiotensina II. El hallazgo de que la renina es la enzima que limita la activación del sistema SRA y de que en ausencia de renina no se sintetizan A-I o A-II, ha estimulado en los últimos 50 años la síntesis de fármacos inhibidores directos de la renina (IDR) (68-70).

A finales de los años ochenta, se desarrollaron nuevos IDR con estructura peptídica: **remikiren** y **ciprokiren** (70-72).

Finalmente, la identificación de la estructura del sitio activo de la renina mediante cristalografía de rayos X y las nuevas técnicas de modelado molecular nos han permitido diseñar una nueva familia de IDR no peptídicos y de bajo peso molecular que han superado todos estos inconvenientes, de los que el **aliskiren** es el primer representante (73). En la actualidad, se encuentran en fase clínica nuevos IDR, desarrollados por Actelion-Merck & Co., Pfizer, GlaxoSmithKline y Speedel (familias SPP600, SP800 y SPP1100).

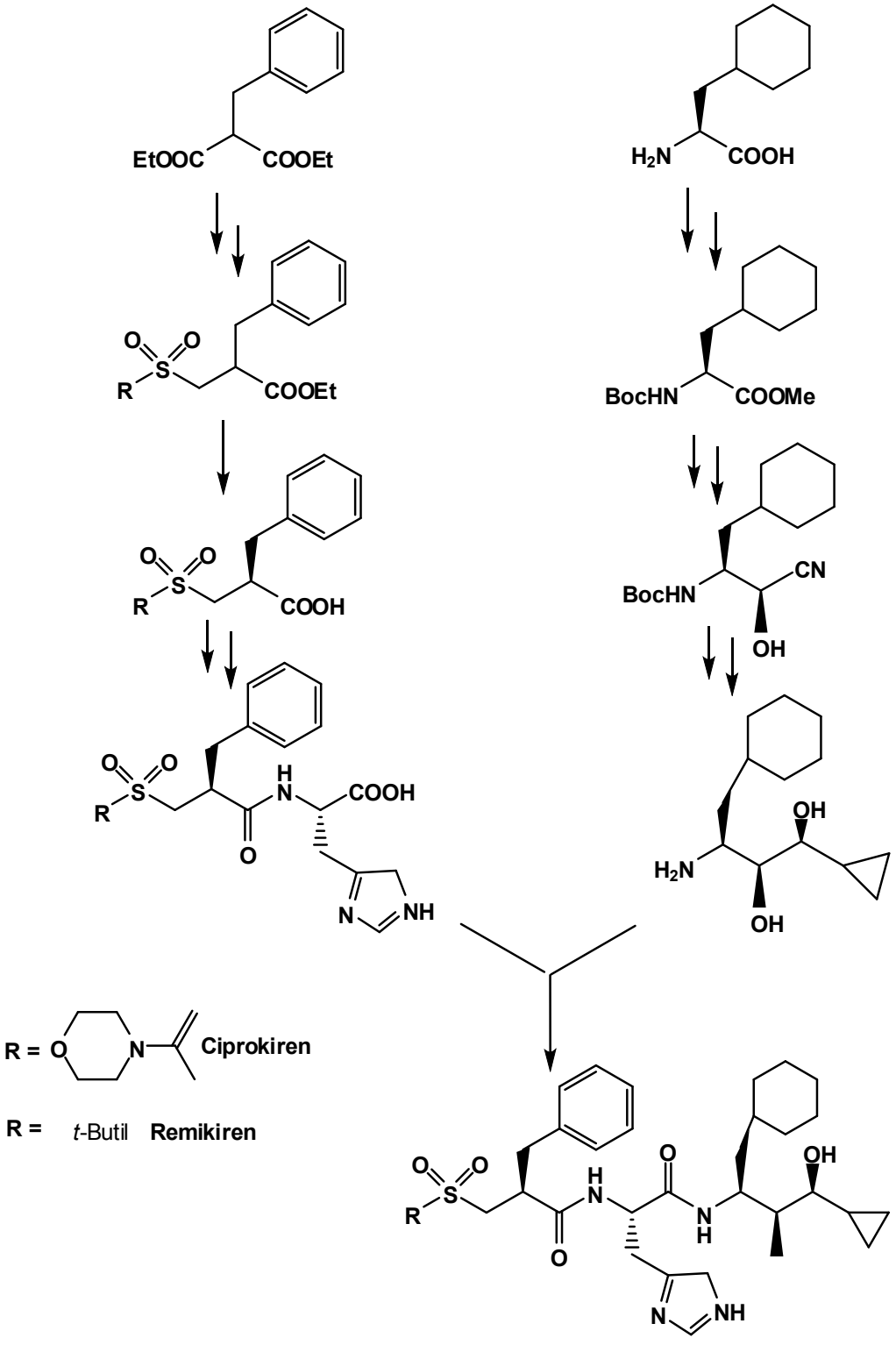
El proceso desarrollado por la compañía Hoffmann La-Roche está basado en la hidrólisis enantioselectiva del éster étílico del ácido (*R,S*) 2-bencil-3-[[1-metil-1-((morfolin-4-il)carbonil)etil]sulfonil] propiónico (**54**) para la producción del sintón quiral ácido (2*R*) 2-bencil-3-[[1-metil-1-((morfolin-4-il)carbonil)etil]sulfonil] propiónico (**55**) (Esquema 23).



Esquema 23.- Hidrólisis enantioselectiva del éster racémico ra-54 para la obtención del sintón quiral *R*-55 utilizando la subtilisina de *Bacillus licheniformis*.

En este proceso, se utiliza como biocatalizador un preparado comercializado por la compañía Novo Nordisk de subtilisna Carlsberg, usado en la formulación de los detergentes (Optimase M 440 o Proteasa L 660), el cual es suspendido en un sistema bifásico (agua/disolvente orgánico en una proporción 1:1). La conversión obtenida en este proceso fue del 50 % y un exceso enantiomérico del 99 % (74).

Este síntón quiral *R*-35 es crucial como intermedio quiral en la síntesis de **remikiren** y **ciprokiren**, inhibidores directos de la renina (Esquema 24).

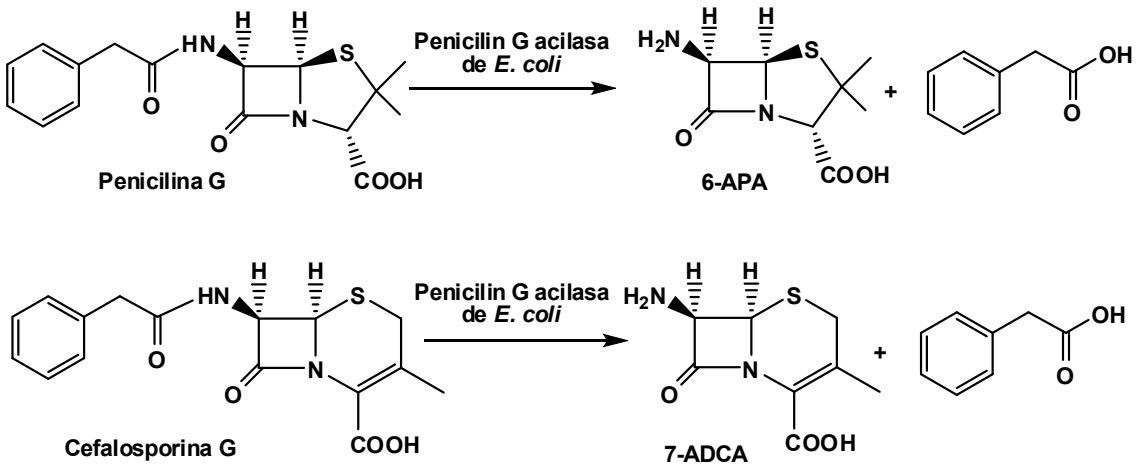


Esquema 24.- Ruta sintética para la obtención de los inhibidores de renina Ciprokiren y Remiquiren.

3. PENICILIN G ACILASAS

Los antibióticos β-lactámicos, constituyen una de las familias más importantes del arsenal terapéutico actual. Los primeros antibióticos de este grupo fueron las penicilinas, descubiertas accidentalmente por Fleming en 1928, al observar la inhibición de la proliferación bacteriana en cultivos contaminados por el hongo *Penicillium notatum*. Sin embargo, no fue hasta 1940 cuando se puedo aislar el principio activo, la penicilina G y un poco más tarde, en 1945, pudo dilucidarse su estructura química, lo que impulsó el desarrollo de los métodos fermentativos y de síntesis parcial de análogos con mejores propiedades. También a mediados de los años cuarenta se descubrieron las cefalosporinas, un grupo de antibióticos β-lactámicos procedentes de hongos del género *Cephalosporum*.

La mayoría de las limitaciones químicas y farmacológicas de los antibióticos lactámicos, así como la obtención de los mismos en las cantidades requeridas para satisfacer su demanda, se han resuelto con éxito mediante el desarrollo de métodos de síntesis parcial. Sin embargo, el desarrollo de estos métodos no fue posible sin la previa optimización de determinados procesos de fermentación que permitirán la producción a gran escala de alguno de estos antibióticos para su empleo como precursores sintéticos de análogos con propiedades más interesantes (penicilina G y cefalosporina G, Esquema 25). Para ello, se requiere la puesta a punto de métodos eficaces para la obtención del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y del ácido 7-amino-3-desacetoxicefalosporánico (7-ADCA), así como su acilación posterior con precursores adecuados de la cadena lateral. Para la obtención del 6-APA, del 7-ACA ó 7-ADCA, se han descrito diversos procedimientos, entre los que destacan los basados en la hidrólisis enzimática de la cadena lateral de algunas penicilinas fácilmente accesibles por fermentación, como la penicilina G y cefalosporina G.



Esquema 25.- Obtención del 6-APA y 7-ADCA por hidrólisis enzimática de la penicilina G y cefalosporina G respectivamente.

La penicilina G acilasa (PGA) (EC. 3.5.1.11) se encuentra en la naturaleza en gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos, levaduras, hongos) (75). Es una de las enzimas más importantes en la biocatalísis, tanto por su uso industrial como por la cantidad de estudios académicos en los que se ha utilizado. Su actividad por excelencia es la hidrólisis de Penicilina G para formar 6-APA (importante precursor en la síntesis de antibióticos semi-sintéticos). Este proceso fue uno de los primeros en ser catalizados por un enzima (75). La PGA usada industrialmente y más estudiada es la proveniente de *E.coli*, (76). Su función natural no esta muy definida, existiendo muchas dudas sobre el papel que juega en el metabolismo bacteriano, se ha sugerido que puede participar en la hidrólisis de compuestos fenialcetilados para generar ácido fenilacético, el cual sería utilizado como fuente de carbono (77).

Diferentes compañías llevan a cabo la hidrólisis enantioselectiva de estas bencilpenicilinas o bencilcefalosporinas, obteniéndose intermedios sintéticos (6-APA o 7-ADCA) a gran escala. Para la obtención del 6-APA, podemos citar a la compañía Dr. Vig Medicaments (India), que lleva a cabo la obtención de este intermedio mediante la penicilin G acilasa de *E. coli* o de *Arthrobacter viscosus* inmovilizada en medio acuoso a pH=8 y 37ºC. Este proceso, se lleva a cabo en un reactor de tanque agitado de 2.000 L de capacidad, obteniéndose un 99 % de conversión, 93 % de rendimiento y un 94 % de selectividad. Este mismo proceso, es llevado a cabo por

otras compañías como Unifar o Asahi Kasei Chemicals Corporation; en este caso también se utiliza la penicilin G acilasa de *E. coli* ó *Bacillus megatarium* inmovilizada en Eupergit C, un polímero funcionalizado por grupos epóxidos. Tras 800 ciclos de reutilización del biocatalizador el tiempo de la reacción se incrementa de 60 minutos a 120 (78).

Para la obtención del anillo de las cefalosporinas (7-ADCA) también se utiliza la misma estrategia, a partir de la cefalosporina G y mediante la utilización de la penicilin G- acilasa de E. coli o Arthrobacter viscosus inmovilizada se obtiene el 7-ADCA con unos rendimientos del 93 %.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Beck, G. Synthesis of chiral drug substances, *Synlett* **2002**, *6*, 837-850.

2. Suami, T.; Hough, L. Molecular mechanisms of sweet taste 3: aspartame and its non-sweet isomers, *Food Chem.* **1993**, *46*, 235-238.

3. Koeller, K. M.; Wong, C. H. Enzymes for chemical synthesis, *Nature* **2001**, *409*, 232-240.

4. (a) Müller, M. Chemical diversity through biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 591-598; (b) Challis, G. L.; Hopwood, D. A. Chemical biotechnology: bioactive small molecules.targets and discovery technologies, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 475.

5. (a) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolt, M.; Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **2001**, *409*, 258-268; (b) Sandford, V.; Breuer, M.; Hauer, B.; Rogers, P.; Rosche, B. (*R*)-phenylacetylcarbinol production in aqueous/organic two-phase systems using partially purified pyruvate decarboxylase from *Candida utilis*, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *91*, 190-198; (c) Schmid, A.; Hollmann, F.; Park, J. B.; Bühler, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 359-366; (d) Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. Biocatalysis in Industrial Synthesis, *Science* **2003**, *299*, 1694-1697.

6. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry* Springer-Verlag; Heidelberg, **2004**.

7. (a) Griengl, H.; Schwab, H.; Fechter, M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 252-256; (b) Effenberger, F.; Forster, S.; Wajant, H. Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 532-539; (c) Domínguez de María, P.; Stillger, T.; Pohl, M.; Wallert, S.; Drauz, K.; Gröger, H.; Trauthwein, H.; Liese, A. Preparative enantioselective synthesis of benzoins and (*R*)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2006**, *38*, 43-47.

8. (a) Faber, K.; Patel, R. Chemical biotechnology. A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 517-519; (b) Loughlin, W. A. Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology* **2000**, *74*, 49-62.

9. Alcalde, M.; Ferrer, M.; Plou, F. J.; Ballesteros, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends Biotechnol*. **2006**, *24*, 281-287.

10. (a) Lee, M. Y.; Dordick, J. S. Enzyme activation for nonaqueous media, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 376-384; (b) Gupta, M. N.; Roy, I. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2575-2583.

11. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451-1463.

12. (a) Bornscheuer, U. T.; Pohl, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137-142; (b) Berglund, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis, *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 13-22; (c) Bornscheuer, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543-547; (d) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; Vogel, A. Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7745-7751; (e) Taglieber, A.; Höbenreich, H.; Carballeira, J. D.; Mondière, R. J. G.; Reetz, M. T. Alternate-site enzyme promiscuity, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8597-8600.

13. Schmid, R. D.; Verger, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633.

14. Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lpases: Useful biocatalysts for the preparation pharmaceuticals, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.

15. Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K. Molecular Basis for the enantiopreference of lipases toward secondary alcohols, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186.

16. Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klibanov, A. M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic media, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076.

17. (a) Kitaguchi, H.; Fitzpatrick, P. A.; Huber, J. E.; Klibanov, A. M. Enzymic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent, J*. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094-3095 (b) González-Sabin, J.; Lavandera, I.; Rebolledo, F.; Gotor, V. Redesigning the mechanism of the lipase-catalysed aminolysis of esters.*Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1264-1274.

18. (a) Alfonso, I.; Gotor. V. Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 201-209.

(b) Gotor, V. Non-Conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197

19. Björling, F; Godtfredsen, S.E. The future-impact of industrial lipases, *Trends Biotechnol,* **1991**, 9, 360-636.

20. Gotor, V.; Astorga, C.; Rebolledo, F. An improved method for the preparation of acylhydrazines: the 1st example of an enzymatic hydrazinolysis reaction, *Synlett* **1990**, 387-388

21. Silver, M. S. Hydrolysis of conformationally homogeneous substrates by α-chymotrypsin. consequences of enzymatic specificity, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4247-4253.

22. (a) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways, *Angew. Chem.* **2004**, *43*, 6032-6040; (b) O´Brien, P. J, Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 720-752; (c) Yoshikuni, Y.; Ferrin, T. E.; Keasling, J. D. Designed divergent evolution of enzyme function, *Nature* **2006**, *440*, 1078-1082.

23. Hult, K.; Berglund, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications, *Trends Biotechnol*. **2007**, *25*, 231-238.

24. Magnusson, A. O.; Takwa, M.; Hamberg, A.; Hult, K. An S-selective lipase was created by rational redesign and the enantioselectivity increased with temperature, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4582-4585.

25. Reetz, M. T.; Bocola, M.; Carballeira, J. D.; Zha, D.; Vogel, A. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192-4196.

26. Reetz, M. T.; Plus, M.; Carballeira, J. D.; Vogel, A.; Jaeger, K. E.; Eggert, T.; Thiel, W.; Bocola, M.; Otte, N. Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106-112.

27. Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V. Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile, *Chem. Commun.* **2004**, *15*, 1724-1725.

28. Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875.

29. Taglieber, A.; Höbenreich, H.; Carballeira, J. D.; Mondière, R. J. G.; Reetz, M. T. Alternate-site enzyme promiscuity, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8597-8600.

30. Domínguez de María, P.; Sanchéz-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V.; Alcantara, A.R. Understanding Candida rugosa lipases: an overview, *Biotechnol. Adv*. **2006**, 24, 180-196.

31.Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B.; Cygler, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *candida-rugosa* lipase, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 12843-12849.

32. Abramowicz, D.A.; Keese, C.R. Enzymatic transesterifications of carbonates in water-restricted environments, *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, 22, 149-155.

33. Hoshino, O.; Itoh, K.; Umezawa, B.; Akita, H.; Oishi, T. Immobilized lipase catalyzed-hydrolysis of labile acetate: enantioselective hydrolysis of (+/-)-4-acetoxy-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-methylisoquinoline, *Tetrahedron Lett.* **1988,** 29, 567-570.

34.Samuelsson, B.; Goldyme, M.; Granstrom, E.; Hamberg, M.; Hammarstrom, S.; Malmsten, C. Prostaglandins and thromboxanes, *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 997-1020.

35. Roszkows, A.P.;, Rooks, W.H.; Tomoloni, A.J.;, Miller L-M. Anti-inflammatory and analgetic properties of D-2-(6'-methoxy-2'-naphthyl)-propionic acid (naproxen), *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **1971**, 179:114.

36. Adams, S. S.; Bresloff, P.; Mason, G.G. Pharmacological differences between optical isomers of ibuprofen - evidence for metabolic inversion of (-)-isomer, *J. Pharm. Pharmaco.l* , **1976**, 28, 256.

37. Caldwell, J.; Hutt, A.J.; Fournelgigleux, S. The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 105.

38. Brune, K.; Beck, W.S.; Geisslinger, G.; Menzelsoglowek, S.; Peskar, B.M.; Peskar, B.A. Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition, *Experientia* **1991**, 47, 257.

39. Alcántara, A.R., J.M. Sánchez Montero and J.V. Sinisterra. Chemoenzymatic preparation of enantiomerically pure S(+) 2-arylpropionic acids with anti-inflammatory activity in *Stereoselective Biocatalysis.* (Patel, R. N., ed), 659, **2000**.

40. (a) Cesti, P., Piccardi, P. Process for the biotechnological preparation of optically active arylalkanoic acids, **1986**, Montedison S.p.A., Italy, EP 195717 A2; (b) Lopez, J.L., Wald, S.A., Matson, S.L., Quinn, J.A. Multiphase membrane reactors for separating stereoisomers, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1990**, 613, 155–166; (c) McConville, F.X., Lopez, J.L., Wald, S.A. Enzymatic resolution of ibuprofen in a multiphase membrane reactor, **1990** in: Biocatalysis (Abramowicz, D.A., ed.) pp.167–177, van Nostrand Reinhold, New York; (d) Sheldon, R.A. **1993**, Chirotechnology, Marcel Dekker Inc., New York; (e) Sih, C. J. **1987**, Process for preparing (S)-methylarylacetic acids, Wisconsin Alumni Research Foundation, USA, EP 227078 A.

41. Patkar, S.A.; Bjorkling, F.; yndel, M.; Schulein, M.; Svendsen, A.; Heldt-Hansen, H.P.; Gormsen, E. Purification of 2 lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors, *Indian J. Chem.* **1993**, 32B, 76-80.

42. Anderson, E.M.; Larssen, K.M.; Kirk, O. One biocatalyst - Many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis, *Biocatal. Biotransform.* **1998**, 16, 181-204.

43. Uppenberg, J.; Hansen M,T.; Patker, S.; Jones, T.A. Sequence, crystal-structure determination and refinement of 2 crystal forms of lipase-B from *Candida Antarctica*, *Structure,* **1994**, 2, 293-308.

44. Arroyo, M.; Sánchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media, *Enzyme Microbiol. Technol.* **1999**, 24, 3-12.

45. (a) Morgan, B., Dodds, D.R., Zaks, A., Andrews, D.R., Klesse, R. Enzymatic desymmetrization of prochiral 2-substituted-1,3-propanediols: A practical chemoenzymatic synthesis of a key precursor of SCH51048, a broad-spectrum orally active antifungal agent, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7736–7743; (b) Morgan, B., Stockwell, B.R., Dodds, D.R., Andrews, D.R., Sudhakar, A.R., Nielsen, C.M., Mergelsberg, I., Zumbach, A. Chemoenzymatic approaches to SCH 56592, a new azole antifungal, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, 74, 1361–1370; (c) Pantaleone, D.P. **1999**, Biotransformations: "Green" processes for the synthesis of chiral fine chemicals, in: Handbook of Chiral Chemicals (Ager, D.J., ed.) pp. 245–286, Marcel Dekker Inc., New York; (d) Saksena, A.K., Girijavallabhan, V.M., Pike, R.E., Wang, H., Lovey, R.G., Liu, Y.-T., Ganguly, A.K., Morgan, W.B., Zaks, A. **1995**, Process for preparing intermediates for the synthesis of antifungal agents, Schering Corporation, US 5,403,937; (e) Saksena, A.K., Girijavallabhan, V.M.,Wang, H., Liu, Y.-I., Pike, R.R., Ganguly, A.K. Concise asymmetric routes to 2,2,4-trisubstituted tetrahydrofurans via chiral titanium imide enolates: Key intermediates towards synthesis of highly active azole antifungals SCH 51048 and SCH 56592, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5657–5660; (f) Zaks, A., Dodds, D.R. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals, *Drug Discovery Toda,* **1997**, 2 (6), 513–531.

46. Saksena,A.K.; Girijavallabhan, V.M.; Lovey, R.G.; Desai, J.A.; Pike, R.E.; Jao, E.; Wang, H.; Ganguly, A.K.; Loebenberg, D.; Hare, R.S.; Cacciapuoti, A.; Parmegiani, R.M. Sch 51048, a novel broad-spectrum orally active antifungal agent: Synthesis and preliminary structure-activity profile, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 127-132.

47. Samanen, J. M.; Ali, F. A.; Barton, L. S.; Bondinell, W. E.; Burgree, J. L.; Callahan, J. F.; Calvo, P. R.; Chen, W.; Chen, L.; Erhard, K.; Feuerstein, G.; Heys, R.; Hwang, S.-M.; Jakas, D. R.; Keenan, R. M.; Ku, T. W. Kwon, C.; Lee, C.-P.; Miller, W. H.; Newlander, K. A.; Nichols, A.; Parker, M.; Peishoff, C. E.; Rhodes, G.; Ross, S.; Shu, A.; Simpson, R.; Takata, D.; Yellin, T.-O.; Uzsinskas, I.; Veslavsky, J. W.; Yuan, C.-K.; Huffman, W. F. Potent, selective, orally active 3-oxo-1,4-benzodiazepine GPIIb/IIIa integrin antagonists, *J. Med. Chem*. **1996**, *39*, 4867.

48. Walsgrove, T.C., Powell, L., Wells, A. Lotrafiban, [(2S)-7-(4,4′-bipiperidinylcarbonyl)-2,3,4,5,-tetrahydro-4-methyl-4-oxo-1H-1,4-benzodiazepine-2-acetic acid] utilising an enzymatic resolution as the final step, *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, 6, 488–491.

49. Stead, P., Marley, H., Mahmoudian, M., Webb, G., Noble, D., Ip, Y.T., Piga, E., Rossi, T., Roberts, S., Dawson, M.J. Efficient procedures for the large-scale preparation of (1*S*,2*S*)-*trans*-2 methoxycyclohexanol, a key chiral intermediate in the synthesis of tricyclic β lactam antibiotics, *Tetrahedron: Asymmetry,* **1996**, 7 (8), 2247–2250.

50. Kim, K.K; Song, H.R.; Shin, D.H.; Hwang, K.Y.; Suh, S.E. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from Pseudomonas cepacia reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor, *Structure,* **1997**, 5, 173-183.

51. Holton, R.; Biediger, R.J.; Boatman, P.D., Semisynthesis of taxol and taxotere, in Taxol: Science and Application, Suffness, M., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 97–121, **1995**.

52. Baldini. E. et al, Multicenter randomized phase III trial of Epirubicin plus Paclitaxel vs. Epirubicin followed by Paclitaxel in metastatic breast cancer patients: focus on cardiac safety, British *J. Cancer.*, **2004**, 91, 45-49.

53. Patel, R.N.; Banerjee, A.; Ko R.Y.; Howell, J.M.; Li, W.S.; Comezoglu, F.T.; Partyka, R.A.; Szarka, L.E. *Biotech. Appl. Biochem*., **1994,** 20, 23-33.

54. Patel R.N. Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis, *Ann. Rev. Microbiol*., **1995**, 98, 361-395.

55. De Caro, J.; Boudouard, M.; Bonicel, J.; Guidoni, A.; Desnuelle, P.; Rovery, M. Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 671, 129-138.

56. (a) Sheldon, R.A. 1993, Chirotechnology, Marcel Dekker Inc., New York; (b) Elferink, V.H.M. **1995**, Chiral USA 96, 11th International Spring Innovations Chirality Symposium, pp. 79–80, Boston.

57. Hulshof, L.A.and Roskam, J.H. Phenylglycidate stereoisomers, conversion products thereof with e.g. 2-nitrophenol and preparation of diltiazem. European Patent EP0343714. (Chem. Abstr. 113, 76603) **1989**.

58. Matsumae, H.; Furui, M.; Shibatani, T. Lipase catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride, *J. Ferm. Bioeng*. **1993**, 75, 93-98.

59. Matsumae, H.; Furui, M.; Shibatani, T.; Tosa, T. Production of optically-active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from serratia-marcescens on a hollow-fiber membrane reactor, *J. Ferment. Bioeng*. **1994**, 78, 59-63.

60. Furui, M.; Furutani, T.; Shibatani, T.; Nakamoto, Y.; Mori, T. A membrane bioreator combined with cristallizer for production of optically active (2*R*,3*S*)-3-(4-metoxifenil) glycidic acid methyl ester *J. Ferm. Bioeng*, **1996**, 81, 21-25.

61. (a) Arpigny, J. L.; Jaeger, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.* **1999**, 343, 177–183; (b) Rosenau, F.; Jaeger, K. E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion, *Biochimie*, **2000**, 82, 1023–1032.

62. Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; Rey, F.; Nugeyre,M.T.; Chamaret, S.; Gruest, T.; Dauguet, C.; Alex-Blin, C.; Bezinet-Brun, F.; Rouxioux, C.; Rozenbaum, W.; Montaigner L. Isolation of a t-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune-deficiency syndrome (AIDS), *Science* **1983**, *220*, 868-871 b) Gallo, R.C.; Salahuddin, S.Z.; Popovic, M.; Shearer, G.M.; Kaplan, G.M.; Haynes, B.F.; Palker, T.J.; Redfield, R.; Oleska, J.; Safai, B.; White, G.; Foster, P.; Markhan P. D. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (htlv-iii) from patients with aids and at risk for aids, *Science* **1984**, *224*, 500-503. c) Furman, P.A.; Fyle, J. A.; St. M.H.; Clair, K. Wein, K.; Rideout, J.I.; Freeman, G.A.; Lehrman, S.N.; Bolognesi, D.P.; Broder, S.; Mitsuya, H.;Barry D.W. phosphorylation of 3'-azido-3'-Deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human-immunodeficiency-virus reverse-transcriptase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986,** *83*, 8333-8337.

63. Williamson, C.; Jones, M.F.; Mo, C.L.; Myers, P.L.; Paternoster, I.L.; Storer, R. Presentación en el "Internacional Symposium on Chemotherapy", Porto Cervo, Cerdeña, Italia, Octubre 1-15, **1989**. b) R. Vince, H. Hua *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 17.

64. (a) Evans, C.T.; Roberts, S.M.; Shoberu, K.A.; Sutherland, A.G. Potential use of carbocylic nucleosides for the treatment of AIDS: Chemo-enzymatic syntheses of the enantiomers of carbovir, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, 1, 589–592; (b) MacKeith, R.A.; McCague, R.; Olivo, H.F.; Palmer, C.F.; Roberts, S.M. Conversion of (–)-4-hydroxy-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one into the anti-HIV agent Carbovir, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, 1**,** 313–314; (c) MacKeith, R.A., McCague, R., Olivo, H.F., Roberts, S.M., Taylor, S.J.C., Xiong, H. Enzyme-catalysed kinetic resolution of 4-endo-hydroxy-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one and employment of the pure enantiomers for the synthesis of anti-viral and hypocholesteremic agents, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 387–394; (d) Taylor, S.J.C.; McCague, R. Resolution of a versatile hydroxylactone synthon 4-endohydroxy- 2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one by lipase deesterification in: Chirality In Industry II (Collins, A. N., Sheldrake, G. N. and Crosby, J., eds.), *1997*, pp. 190–193, John Wiley & Sons, New York.

65. Rao, M.B.; Tanskale, A.P.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V.; Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **1998**, 62, 597-635.

66. Rawlings, N.D.; Barrett, A. J. Proteolytic enzymes: aspartic and metallo peptidases, *Methods Enzymol.* **1995**, 248, 183-228.

67. (a) Frank, B.H.; Chance, R.E. Two routes for producing human insulin utilizing recombinant DNA technology, *Münch. Med. Wschr.* **1983**, 125, 14–20; (b) Ladisch, M.R.; Kohlmann, K.L. Recombinant human insulin, *Biotechnol. Prog.* **1992**, 8, 469–478.

68. Rongen GA, Lenders JWM, Smiths P, Thien T. Clinical pharmacokinetics and efficacy of renin inhibitors, *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, 29, 6-14.

69.. Lin C, Frishman WH. Renin inhibition: a novel therapy for cardiovascular disease, *Am. Heart J.* **1996**, 131, 1024-34.

70. Staessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors, *Lancet,* **2006**, 368, 1449-56.

71. Himmelmann, A.; Bergbrant, A.; Svensson, A.; Hansson, L.; Aurell, M. Remikiren (Ro 42-5892) an orally active renin inhibitor in essential hypertension. Effects on blood pressure and the reninangiotensin aldosterone system, *Am. J. Hypertens.* **1996**, 9, 517-22.

72. Rahuel, J.; Rasetti, V.; Maibaum, J.; Rüeger, H.; Göschke, R.; Cohen, N.C. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human rennin. *Chem Biol.* **2000**, 7, 493-50.

73. Wood, J.M.; Maibaum, J.; Rahuel, J.; Grütter, M.G.; Cohen, N.C.; Rasetti, V. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 308, 698-705.

74. (a) Doswald, S.; Estermann, H.; Kupfer, E.; Stadler, H.; Walther, W.; Weisbrod, T.; Wirz, B.; Wostl, W. Large scale preparation of chiral building blocks for the P3 site of renin inhibitors,.*Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 403–410; (b) Wirz, B.; Weisbrod, T.; Estermann, H. Enzymatic reaction in process research: the importance of parameter optimization and workup, *Chimica Oggi*. **1995**, 14, 37–41.

75. (a) Sudhakaran, V. K.; Deshpande, B.S.; Ambedkar, S.S.; Shewale, J.G. Molecular aspects of penicillin and cephalosporin acylases, *Process Biochem.* **1992**, 27, 131-143; (b) Verhaert, R. M.; Riemens, A. M.; van der Laan, J. M.; van Duin, J.; Quax, W. J. . Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from Alcaligenes faecalis, *Appl. Environ. Microbiol*. **1997**, 63, 3412-8; (c) Parmar, A.; Kumar, H.; Marwaha, S.S.; Kennedy, J. F. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA), *Biotechnol Adv*. **2000,** 18, 289-301.

76. Trasvascio, P.; Zito, E.; Portaccio, M.; Diano, V.; Di Martino, S.; Bertolini, T.; Rossi, S.; Mita, D.G. Enzyme reaction engineering: effect of metanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized Penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions, *Biotechnol. Prog.* **2002**, 18, 975-985.

77. (a) Valle, F.; Balbas, P.; Merino, E.; Bolivar, F. The role of penicillin amidases in nature and in industRY, *Trends Biochem. Sci*. **1991**, 16, 36-40; (b) Duggleby, H. J.; Tolley, S. P.; Hill, C. P.; Dodson, E. J.; Dodson, G.; Moody, P. C. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center, *Nature*, **1995**, 373, 264-8; (c) Prieto, M. A.; Diaz, E.; Garcia, J. L. *J.* Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: Engineering a mobile aromatic degradative cluster, *Bacteriol*. **1996**, 178, 111-20; (d) Done, S. H.; Brannigan, J. A.; Moody, P. C.; Hubbard, R. E. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase, *J. Mol. Biol*. **1998**, 284, 463-75; (e) Arroyo, M.; de la Mata, I.; Acebal, C.; Castillon, M. P. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2003**, 60, 507-14.

78. (a) Cheetham, P. (**1995**) The application of enzymes in industry, in: Handbook of Enzyme Biotechnology (Wiseman, A. ed.), pp. 493–498, Ellis Horwood, London; (b) Matsumoto, K. (**1993**) in: Industrial Application of Immobilized Biocatalysts (Tanaka, A., Tosa, T., Kobayashi, T. eds.) pp. 67–88, Marcel Dekker Inc., New York; (c) Tramper, J. Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts*, Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 52, 290–295.

CAPÍTULO VII

BIOCATÁLISIS APLICADA A LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS (II) ENZIMAS REDOX

Andrés Rafael Alcántara León

RESUMEN

El empleo de enzimas redox para la obtención de sintones quirales permite al químico farmacéutico disponer de una poderosa herramienta a la hora de diseñar síntesis de fármacos más sostenibles y productivas. En este capítulo se abordará esta metodología, muy común dentro del ámbito de las Biotransformaciones, tanto para procesos de oxidación como de reducción, comentando las dos opciones disponibles (células enteras versus enzimas aisladas), en sus respectivas variantes. Finalmente, se presentarán y comentarán varios ejemplos industriales donde estas metodologías han sido implantadas.

Palabras clave: Biocatálisis; Fármacos; Oxidorreductasas; Enzimas aisladas; Regeneración de cofactores; Células enteras.

ABSTRACT

Biocatalysis applied to the synthesis of drugs (II) redox enzymes

The use of redox enzymes for the production of chiral building blocks is a powerful tool for helping chemists to design more sustainable and productive synthesis of drugs. This chapter will address this approach, very common in the field of Biotransformations, both for oxidation and reduction processes, commenting on the two options available (whole cells versus isolated enzymes) in their respective variants. Finally, we will present and discuss

several industrial examples where these methodologies have been implemented.

Keywords: Biocatalysis; Drugs; Redox enzymes; Isolated enzymes; Cofactor regeneration; Whole cells.

1. INTRODUCCIÓN

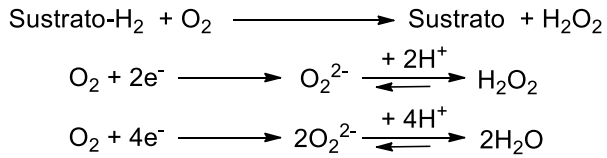
La Síntesis Asimétrica es una disciplina esencial en la obtención de productos de alto valor añadido, y muy especialmente en la síntesis de fármacos, pues más de la mitad de las moléculas necesarias para la producción de los mismos presentan al menos un centro estereogénico (1). Para sintetizar estas moléculas en condiciones respetuosas con el medio ambiente, los catalizadores juegan un papel esencial, siendo necesario el desarrollo de los mismos, tanto químicos como biológicos, debido a su complementariedad. Hoy día se estima que más de un 10% de los procesos industriales de obtención de fármacos precisa de biocatalizadores (2). Aunque probablemente sean las enzimas hidrolíticas las más utilizadas en Biotransformaciones (Ver Capítulo Anterior), no obstante existen otros muchos procesos que conducen a la síntesis de fármacos (o de sintones quirales intermedios), mediados por biocatalizadores de tipo no hidrolítico, que serán objeto de revisión en este capítulo.

2. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR OXIDORREDUCTASAS

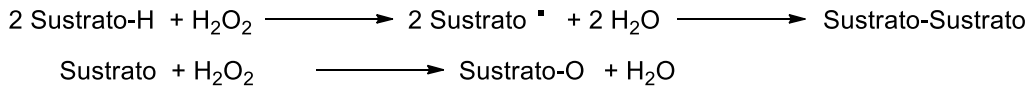
Uno de los retos sin duda más importantes de la Biocatálisis, en su afán de servir como una herramienta destacada dentro de la Química Sostenible (traducción del término “Green Chemistry” (3) y que puede definirse como el diseño de productos y procesos químicos que eliminen o reduzcan el uso y/o la generación de sustancias contaminantes), el desarrollo de oxidaciones y reducciones altamente regio y estereoselectivas, empleando para ello condiciones suaves, compatibles con los conocidos como 12 postulados de la Química Sostenible, definidos originalmente por Anastas y Warner (4). Por tanto, el empleo de oxidorreductasas constituye una alternativa muy atractiva desde el punto de vista medioambiental frente al empleo de catalizadores químicos, que generalmente contienen metales de transición (5). En este sentido, señalaremos que aproximadamente un 25% de las enzimas conocidas

a día de hoy pertenecen a la familia de las oxidorreductasas (6), y el número de las mismas que se encuentran disponibles comercialmente está en continuo incremento (7).

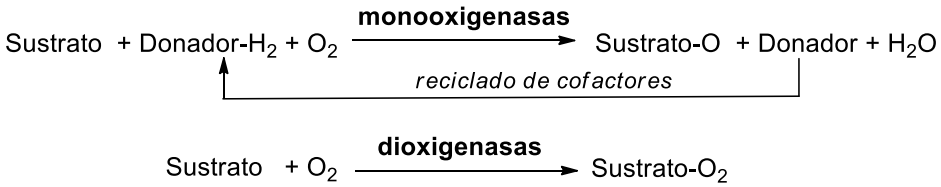
OXIDASAS



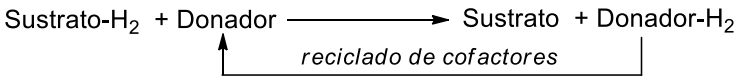
PEROXIDASAS



OXIGENASAS



DESHIDROGENASAS



Esquema 1.- Tipos de Oxidorreductasas.

Estas enzimas redox, catalizan un amplio espectro de reacciones de oxidación y de reducción, y han sido objeto de múltiples revisiones en la bibliografía actual (8); por otra parte, pueden ser divididas en dos grandes grupos, tal y como se refleja en el Esquema 1:

1. oxidasas y peroxidasas, que emplean oxígeno molecular como agente oxidante,
2. oxigenasas (mono y dioxigenasas) y deshidrogenasas, que requieren además el uso de coenzimas solubles complejas.

El principal inconveniente para el empleo industrial de estas últimas, sin duda las más atractivas, radica en el hecho de que precisan cofactores (bien libres, como los dinucleótidos de adenina y nicotinamida $(NAD(P)^+/ NAD(P)H)$, o bien unidos a la

enzima, como el dinucleótido de adenina y flavina (FAD), el mononucleótido de flavina (FMN) o la pirroloquinolinaquinona (PQQ)) para su actividad. Estos cofactores se consumen de manera equimolecular con el sustrato, por lo que, debido a su elevado precio, requieren el diseño de sistemas que permitan su reciclado (9). Debido a este hecho, se suelen utilizar en forma de células enteras(8d,10), puesto que de esta forma el propio metabolismo celular se encarga de la regeneración de los cofactores; el proceso resulta, por tanto, mucho más ventajoso desde el punto de vista económico, no sólo por este hecho, sino también porque se reducen los costes implicados en el aislamiento y purificación de la enzima.

No obstante, desde el punto de vista de la Química Sostenible, el empleo de células enteras presenta una serie de limitaciones, entre las que podemos señalar las siguientes (11):

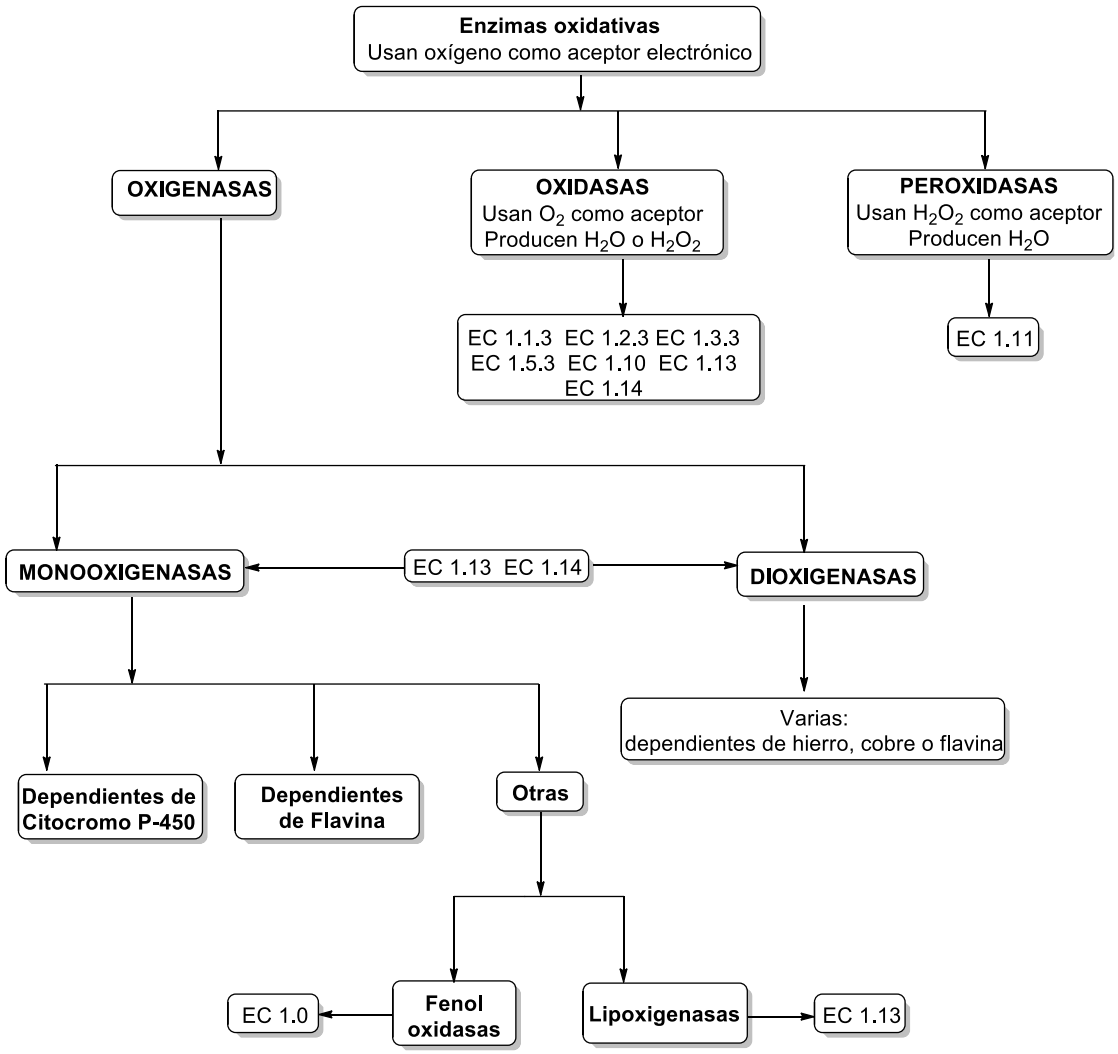
- Baja productividad global, debido al hecho de que los sustratos no naturales que deben transformarse suelen ser tóxicos para las células, y de manera general se toleran solamente en concentraciones bajas, entre el 0,1 y el 0,3 %.
- Bajos rendimientos globales, debido a la gran cantidad de biomasa presente en el medio de reacción, por lo que los procesos de purificación del producto final se hacen complicados. En este sentido, los valores del Factor Medioambiental E (12), un índice quimiométrico que cuantifica la masa de residuos producidos en relación a la masa final de productos, suelen ser bastantes elevados
- Transformaciones incompletas, debido al hecho de que existen diferentes enzimas dentro del sistema celular que pueden trabajar en sentidos opuestos, lo que se traduce en bajas conversiones y/o estereoselectividades. No obstante, el uso de técnicas recombinantes permite expresar solamente la enzima deseada, por lo que estos problemas pueden ser solventados (13).

A continuación, comentaremos una serie de ejemplos de procesos redox (tanto oxidaciones como reducciones) mediados por biocatalizadores tanto en forma de células enteras como de enzimas aisladas que conducen bien a la preparación de

fármacos, o más habitualmente, a sintones para la ulterior preparación de los mismos.

2.1. Oxidaciones catalizadas por oxidorreductasas

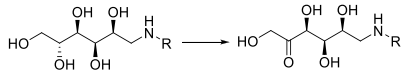
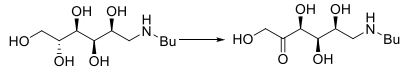
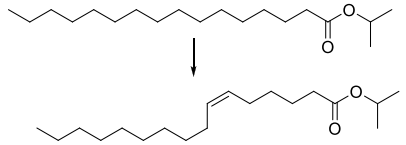
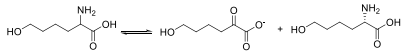
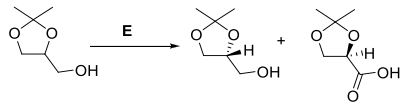
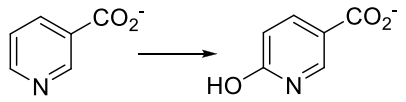
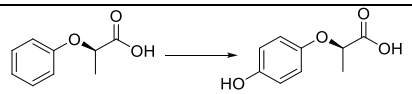
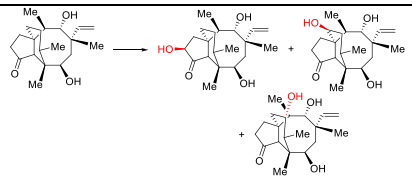
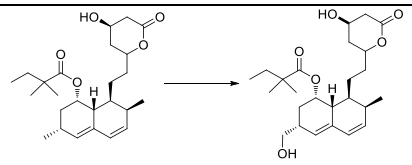
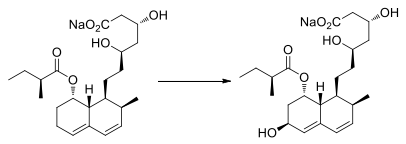
Las biooxidaciones constituyen hoy día una alternativa muy atractiva a los procesos químicos, puesto que permiten solventar problemas de falta de control y de predictibilidad inherentes a estos últimos (8b). La efectividad de los biocatalizadores oxidativos puede atribuirse parcialmente a sus altos potenciales redox, lo que les permite catalizar reacciones sobre sustratos estables, resistentes a oxidantes químicos, para la obtención de productos oxigenados de interés industrial (14), con altas regio y estereoselectividad. Los hidroxi- y oxo- compuestos así obtenidos son esenciales para la obtención de productos de alto valor añadido, por lo que las biooxidaciones proporcionan alternativas viables frente a los procesos químicos, de manera que las rutas biocatalíticas suelen ser mucho más sostenibles (15). En los seres vivos, las enzimas oxidativas pueden estar involucradas en procesos metabólicos primarios o secundarios, aunque requieren cofactores que sí son productos metabólicos primarios. En el Esquema 2, aparece la clasificación de las enzimas oxidativas atendiendo a la naturaleza del agente oxidante (el aceptor electrónico) y a los productos de reacción.

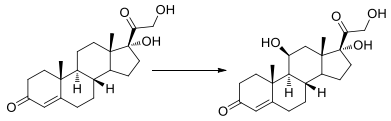
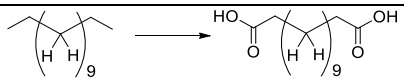
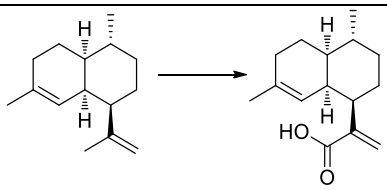
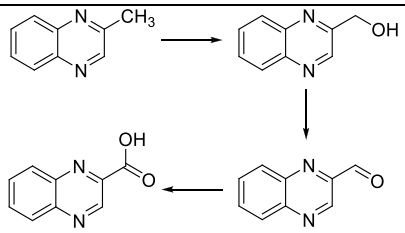
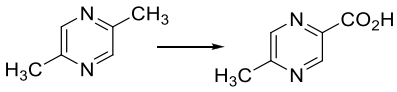
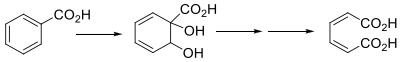
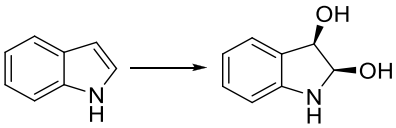
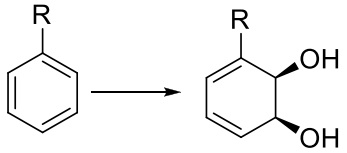
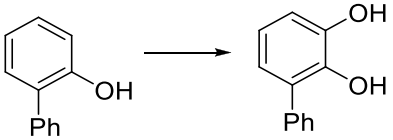
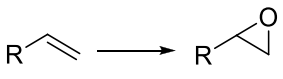


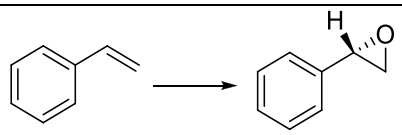
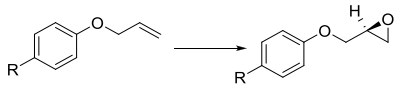
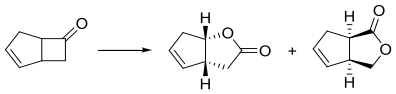
Esquema 2. Enzimas oxidativas

Algunos ejemplos industriales de aplicación de enzimas redox en proceso de oxidación aparecen reflejados en la Tabla I.

Tabla I. Biooxidaciones industriales, clasificadas en función del tipo de enzima.

Entr.	BIO-OXIDATION	RENDIMIENTO	BIOCATALIZADO[a]	COMPAÑÍA
DESHIDROGENASAS				
1		90%	*Gluconobacter oxidans,* EC 1.1.99.21	Bayer AG[16]
2		58% (700 kg en 48 h)	*Gluconobacter oxidans ATCC 621,* EC 1.1.99.21	Pharmacia[17]
3		97%	*Rhodococcus* sp. KSM-B-MT66 (mutante)	Kao Corporation[18]
OXIDASAS				
4		50%	*Trigonopsis variabilis ATCC 10679*, EC 1.4.3.3	Bristol-Myers Squibb[19]
5		50% (98 % ee alcohol, 90% ee ácido)	*Rhodococcus erythropolis.*	International BioSynthetics, Inc.[20]
6		> 90%	*Achromobacter xylosoxidans*, EC 1.17.1.5	Lonza AG[21]
7		>99.5%	*Beauveria bassiana LU 700*	BASF AG[22]
OXIGENASAS				
8		77.9%	Células enteras vivas de *Streptomyces sp.* SC 1754 EC 1.14.13.XX	Bristol-Myers Squibb[23]
9		24%	*Nocardia autotropica*	Merck Sharp & Dohme[24]
10		> 70%	*Streptomyces sp.* Y-110	Sankyo Company/ Bristol-Myers Squibb[25]

11			*Curvularia lunata*	Pfizer Inc/Bayer Schering Pharma[26]
12			*Candida tropicalis*	Cognis Inc[27]
13			*Saccharomyces cervisiae*	Amyris Biotechnologi-es Inc[28]
14		86%	*Pseudomonas putida ATCC 33015*	Pfizer Inc[29].
15		> 99.5%	*Pseudomonas putida ATCC 33.015* EC 1.14.13.X	Lonza Ag[30]
16		> 99%	*Arthrobacter*, EC 1.13.11.1	Mitsubishi Chemical Corporation[31]
17		n.r.	*Pseudomonas putida*, EC 1.13.11.11	Genencor International, Inc.[32]
18		n.r.	*Pseudomonas putida*, EC 1.14.12.20	ICI[33]
19		97%	*Escherichia coli JM101*, EC 1.14.13.44	Sigma Aldrich[34]
20			*Nocardia coralline* EC 1.14.14.1	Nippon Mining Holdings, Inc[35].

21		92.7% (ee > 99%)	*Escherichia coli JM 101* EC 1.14.13.69	DSM[36]
22		> 90%	*Pseudomonas oleovorans ATCC 29347* EC 1.14.X.X	DSM[37]
23		92%	*Acinetobacter calcoaceticus*, EC 1.14.13.22	Sigma Aldrich[38]

[a] Células en reposo excepto si se indica lo contrario.

Las **deshidrogenasas** catalizan reacciones de reducción de cetonas, aminaciones reductoras, reducciones de alquenos, y oxidación de alcoholes y aldehidos (39); aunque pueden emplearse en ambos sentidos del proceso redox, generalmente se emplean principalmente en el sentido de reducción de enlaces C=O o C=C, como se verá más adelante, puesto que este proceso implica la creación de la menos un estereocentro en el producto de reacción. Cuando se utilizan en el sentido de oxidación, se suele buscar un proceso regioselectivo de oxidación de una función determinada sin alterar otras similares. Como ejemplos industriales, las oxidaciones regioselectivas del 1-amino-*D*-sorbitol *N*-protegido (entrada 1) y de la *N*-butilglucamina (entrada 2) catalizadas por células enteras de *Gluconobacter oxydans* ilustran perfectamente la exquisita regioselectividad en la oxidación del grupo OH en la posición *C*5; los productos de reacción (derivados de sorbosa) son intermedios en la síntesis de inhibidores de la α-glucosidasa por vía oral, activos para el tratamiento de problemas metabólicos asociados con los carbohidratos (16) o contra infecciones retrovirales (17). Otro ejemplo de deshidrogenación regioselectiva es el proceso desarrollado por Kao Corporation (entrada 3) para la deshidrogenación del palmitato de isopropilo y otros ésteres de ácidos grasos empleando una desaturasa modificada por ingeniería genética, para la obtención de alquenos *cis* con un doble enlace ubicado a 9 átomos de carbono de distancia respecto al metilo terminal (18); los *cis*-alquenos obtenidos se usan posteriormente para la preparación de fármacos de aplicación dermatológica.

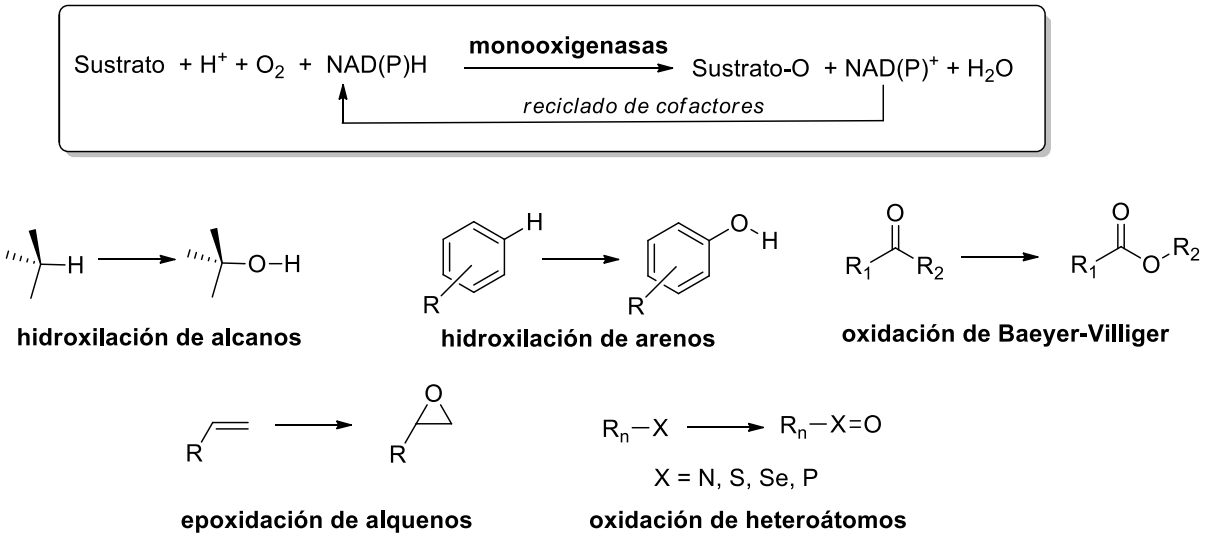
Por otra parte, las **oxidasas** pueden catalizar una gran variedad de reacciones de oxidación, tales como la oxidación de aminas (oxidasas de aminoácidos), la oxidación de alcoholes (por ejemplo, en hidratos de carbono), el

cierre del anillo oxidativo, descarboxilación oxidativa, y las reacciones de hidroxilación. Sin embargo, este último proceso no es típico de oxidasas, ya que el O_2 sólo sirve como receptor de electrones y no como donante de oxígeno. Algunos ejemplos industrialmente relevantes de la utilización de las oxidasas se muestran en la Tabla 1. La resolución cinética de la 6 hidroxinorleucina racémica (entrada 4) se lleva a cabo a través de la oxidación enantioselectiva (actividad *D*-aminoácido-oxidasa) del enantiómero R, y conduce al enantiómero *S*, el cual es un intermedio quiral en la síntesis de inhibidores de vasopeptidasa y de inhibidores de metaloproteasas, con acción antihipertensiva (19). Una oxidación de alcoholes catalizada por células enteras se ejemplifica con otra resolución cinética, en este caso del isopropilidenglicerol (entrada 5), permitiendo la obtención de dos compuestos (*R*-isopropilidenglicerol y ácido *R*-isopropilidenglicérico), muy útiles como materiales de partida para la síntesis de diferentes productos biológicamente activos (20). Por otra parte, la hidroxilación de niacina a 6 hidroxinicotinato (entrada 6), precursor de diversos insecticidas (21), o la para-hidroxilación del ácido *R*-2-fenoxipropiónico (POPS, entrada 7)) para la obtención del HOPS (precursor de diferentes herbicidas) (22), son otros ejemplos de hidroxilaciones mediadas por oxidasas.

Las **oxigenasas** son, sin lugar a dudas, los biocatalizadores de oxidación más interesantes. Estas enzimas catalizan la introducción específica de uno o dos átomos de oxígeno en el sustrato a partir de O_2, en condiciones de reacción muy suaves. Estos procesos transcurren de forma muy específica, y suponen una estrategia sintética de oxifuncionalización muy interesante, puesto que por norma general no existe una alternativa por vía química (40). La gran variedad de oxigenasas existente, y su alta capacidad para introducir específicamente átomos de oxígeno directamente a partir de O_2, así como la no necesidad de utilizar peróxidos como sustratos (reactivos altamente desestabilizadores de las enzimas), ha hecho que su empleo a nivel industrial se haya extendido (41). Tal y como comentamos con anterioridad (ver Esquema 1), las monooxigenasas y dioxigenasas introducen uno o dos átomos de oxígeno en el sustrato, obteniéndose un equivalente de agua como co-producto en el caso de las monooxigenasas. Estas enzimas son activas sobre una gran variedad de sustratos, debido a la diferente naturaleza de los tipos de compuestos que deben detoxificar y degradar; es por ello por lo que no es de

extrañar que estén descritos en la bibliografía numerosos ejemplos de empleo de estas enzimas en Biotransformaciones (41a, 42).

Como se indica en el Esquema 3, las **monoxigenasas** catalizan la introducción de un átomo de oxígeno en una molécula de sustrato, generalmente usando NADH o NADPH como cofactor para lograr el potencial reductor que aporte los electrones al sustrato. Estos sistemas pueden ser dependientes de grupos hemo, flavina o metales, siendo sin duda los sistemas dependientes de citocromo P-450 los mejor caracterizados, y permiten llevar a cabo los procesos indicados en el Esquema 3.



Esquema 3.- Reacciones catalizadas por monooxigenasas.

Algunas aplicaciones industriales de oxigenasas se muestran en la Tabla I. Como ejemplos de hidroxilación en sistemas C(sp^3)-H, citaremos la monohidroxilación de la mutilina (entrada 8) para producir (2*S*)-, (8*S*)- y (7*S*)-hidroximutilina, que son análogos del antibiótico tiamulina (23), la 6β-Monohidroxilación de la simvastatina (entrada 9) para producir un metabolito con mayor actividad anticolesterolémica (24), o la biotransformación de la compactina para la obtención de la pravastina (25) (entrada 10), también con propiedades anticolesterolémicas. La hidroxilación de esteroides es un campo muy tradicional en las biotransformaciones (8d,43); en este sentido, un ejemplo clásico es la transformación del 11-desoxicortisol (sustancia S de Reichstein, 17α, 21

dihidroxiprogesterona) en hidrocortisona, descrita por Pfizer en 1965 utilizando células *Curvularia lunata* (entrada 11) (26) .

Por lo que respecta a las hidroxilaciones de sistemas C(sp^3)-H alílicos y bencílicos, estos procesos normalmente no se detienen en el paso de inserción del OH-, sino que suelen conducir a ácidos carboxílicos. Como ejemplo de oxidación alílica citaremos la producción del medicamento antipalúdico artemisinina (entrada 13) a partir de sustratos baratos y renovables. En este sentido, la *S. cerevisiae* ha sido modificada para trabajar sobre un terpenóide endógeno en dos etapas, catalizadas por una amorfadieno sintasa y una monooxigenasa (CYP71AV1), de manera que se produce una hidroxilación en tres pasos (28). Otros ejemplos de oxidaciones bencílicas son la oxidación de la 2-methilquinoxalina al ácido quinoxalina 2-carboxílico, que se utiliza en la síntesis de una variedad de compuestos biológicamente activos (entrada 14) (29), o la producción del ácido 5-metilpirazina-2-carboxílico, precursor del antilipolítico acipimox y del hipoglucemiante glipicide (entrada 15) (30). Por otro lado, la oxidación de un grupo metilo hasta CO_2H también es posible en simples carbonos alquílicos, como se demuestra en la biooxidación del *n*-tridecano hasta ácido α,ω-tridecanóico (entrada 12) (27), donde el empleo de una estrategia de control optimizado del pH durante el cultivo de una cepa mutante de *Candida tropicalis* en condiciones *fed-batch* ha permitido la producción de ácidos dicarboxílicos a partir de alcanos en concentraciones que pueden llegar hasta 166 g 1^{-1}.

En otro orden de cosas, las hidroxilaciones aromáticas constituyen unos procedimientos muy útiles para obtener algunos productos muy interesantes. Así, la producción de ácido *cis, cis*-mucónico (entrada 16, intermedio en la síntesis de distintos fármacos y productos agroquímicos (31)), de 2,3-dihidro-1*H*-indol-2 ,3-diol (entrada 17, precursor del colorante azul índigo (32)), o del 1,2-deshidrocatecol (33) (precursor de fármacos antivirales de tipo β-lactámico) son buenos ejemplos de un proceso (hidroxilación con rotura de la estructura aromática) muy difícil de obtener por métodos puramente químicos: sin embargo, también es posible obtener catecoles, como lo demuestra el proceso indicado en la entrada 19, ilustrativo de cómo se pueden obtener catecoles con un sustituyente en la posición 3, precursores de distintos fármacos (34).

Por último, otros procesos muy atractivos mediados por monooxigenasas son las epoxidaciones de alquenos (entradas 20-22) y las oxidaciones Baeyer-Villiger (entrada 23). De hecho, los epóxidos son materias primas muy valiosas para la producción de muchos compuestos útiles, especialmente cuando la biooxidación conduce a oxiranos quirales, tales como los procedimientos aplicados por DSM y que se especifican en las entradas 21 y 22. Por su parte, la oxidación de Baeyer-Villiger es una excelente manera de producir ésteres o lactonas a partir de cetonas; una vez más, las monoxigenasas son los biocatalizadores que son capaces de mediar en esta reacción (44), y Sigma Aldrich (entrada 23) ha demostrado que esta biotransformación puede ser escalada hasta producción industrial (38).

2.2. Reducciones catalizadas por oxidorreductasas

A lo largo de los últimos años, la demanda de compuestos enantiopuros ha crecido de forma sustancial, principalmente dentro del ámbito de las industrias de aromas y agroquímica, y de forma aún más destacada en la industria farmacéutica (45). De forma general, los compuestos enantiopuros obtenidos a nivel industrial deben cumplir una serie de requisitos (46):

1. Los compuestos deben ser moléculas polifuncionales, sintones intermedios en procesos posteriores de síntesis orgánica.
2. La producción se lleva a cabo en escalas relativamente pequeñas (entre 1-1000 toneladas al año para productos farmacéuticos).
3. Los procesos de producción deben llevar a compuestos con alta pureza (>99%).
4. Los compuestos obtenidos deben tener un alto valor añadido.

En este sentido, la reducción estereoselectiva de un carbonilo proquiral (C=O) en un alcohol que posee un centro estereogénico (*CH-OH) es un proceso de gran importancia dentro del ámbito de la Síntesis Asimétrica, puesto que supone un proceso directo que transcurre con gran economía atómica (47) para la obtención de alcoholes enantioméricamente puros. En 2002, la producción de alcoholes quirales supuso unas ventas de 7 billones de dólares, estimándose un aumento de hasta 14,9 billones para el 2009 (48). Debido a la enorme importancia de este tipo de compuestos en la síntesis de fármacos y moléculas bioactivas, la reducción estereoselectiva de cetonas ha adquirido un enorme interés industrial, y a este

efecto se han descrito numerosas rutas catalíticas; así, la hidrogenación asimétrica de cetonas catalizada por metales (49) o el empleo de boranos (50) constituyen procesos que han sido descritos de manera eficiente a escala industrial. No obstante, se suelen precisar condiciones poco compatibles con la Química Sostenible (3,4-51) tales como temperaturas elevadas y el empleo de disolventes y/o reactivos tóxicos.

De forma complementaria a estos procesos quimiocatalíticos, la reducción estereoselectiva de cetonas empleando biocatalizadores (biorreducción (48)) constituye una alternativa muy eficiente y atractiva, que opera en condiciones de pH y temperatura mucho más suaves. En efecto, esta tecnología ha conseguido salir del ámbito puramente académico (52) hasta convertirse en una plataforma tecnológica perfectamente viable a nivel industrial (53). Así, la excelente eficacia catalítica, unida a la alta estereoselectividad que se puede obtener, son los grandes avales de los procesos de biorreducción a nivel industrial, por lo que no es de extrañar que su aplicabilidad industrial, en particular para la producción de alcoholes enantioméricamente puros como intermedios de fármacos, haya sido claramente demostrada a través de un amplio abanico de aplicaciones tecnológicas en las industrias química y farmacéutica (54).

Las enzimas que catalizan los procesos de biorreducción son oxidorreductasas, clasificadas como E.C.1, según el NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biotechnology and Molecular Biology) (55). Una posterior clasificación de las mismas las distingue en función del sustrato que reducen (u oxidan, dada la reversibilidad de la reacción). De manera paralela, las oxidorreductasas han sido organizadas en superfamilias, según la similitud de su secuencia primaria y el tipo de plegamiento de su estructura secundaria, por lo que estas superfamilias se solapan entre sí al considerar el tipo de sustrato sobre el que actúan. Las superfamilias descritas para la biorreducción de compuestos carbonílicos son:

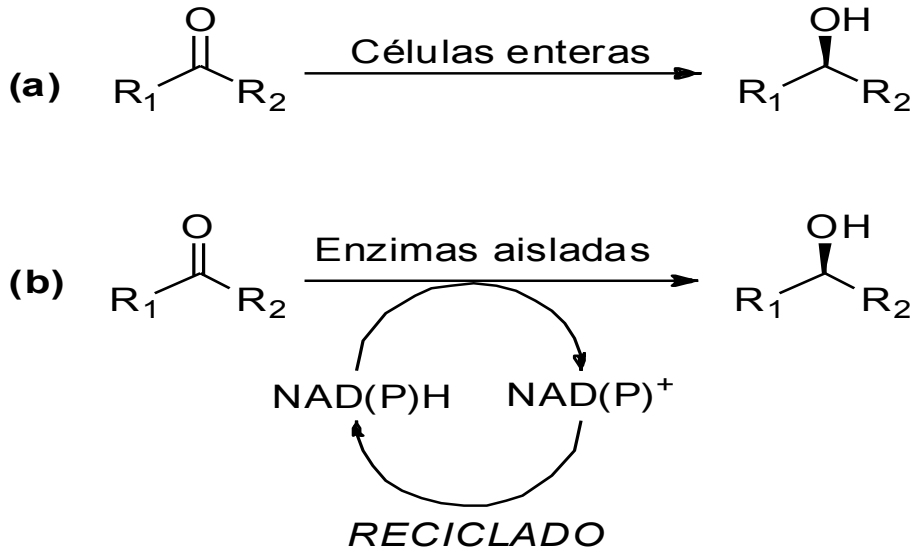
Deshidrogenasas/Reductasas de cadena corta (**SDRs**, *short-chain dehydrogenases/reductases*). Son enzimas monoméricas pequeñas, de aproximadamente 250 residuos aminoacídicos, que divergen mucho en su secuencia primaria, presentando entre sí una similitud de entre un 15-30% (56). No

obstante, todas se caracterizan por tener un plegamiento de Rossmann (57) (un motivo estructural clásico de proteínas de unión a nucleótidos, particularmente el cofactor NAD, compuesto por tres o más láminas beta paralelas unidas por dos hélices alfa en el orden topológico de beta-alfa-beta-alfa-beta), y un centro activo compuesto por una tétrada altamente conservada formada por Asn, Ser, Tyr y Lys (58). Su preferencia por el cofactor depende de su origen: en levaduras, las SDRs dependen de NADPH, mientras que para humanos, plantas o ratones la distribución entre las que dependen de NADPH y las que lo hacen de NADH es bastante más equilibrada (59). Estas enzimas pueden reducir aldehídos, cetonas, dicetonas y oxoésteres.

Deshidrogenasas/Reductasas de cadena media (**MDRs**, *medium-chain dehydrogenases/reductases*). Son muy divergentes en su secuencia primaria (59c, 60) (aunque su estructura tridimensional es similar, con un requerimiento general de una tirosina en el centro activo), por lo que estudios filogenéticos las dividen en subfamilias, familias y macrofamilias (61). Todas ellas usan NADH o NADPH, y el centro activo de algunas posee un átomo de zinc, que está involucrado en la transferencia de electrones hasta la molécula aceptora. Al igual que las SDRs, pueden reducir aldehídos, cetonas, dicetonas y oxoésteres.

Aldo-ceto reductasas (*Aldo-Keto Reductases*, **AKRs**). Esta superfamilia se caracteriza por una tétrada conservada (His, Tyr, Asp, Lys) de residuos en el centro activo (62). Son enzimas monoméricas, de entre 34 y 37 KDa, dependientes de NADPH o NADH (algunas AKRs pueden aceptar ambos, aunque con diferente constante de afinidad (63). Existe una página web (64) dedicada a esta superfamilia, donde se presentan diferentes miembros de la misma, caracterizados por una estructura tridimensional tipo $(\alpha\beta)_8$, llamada barril TIM (65), motivo estructural de proteínas muy conservado que consiste en ocho hélices alfa y ocho láminas beta paralelas que se alternan en el esqueleto de la proteína. Al igual que las SDRs y las MDRs, pueden reducir aldehídos, cetonas, dicetonas y oxoésteres.

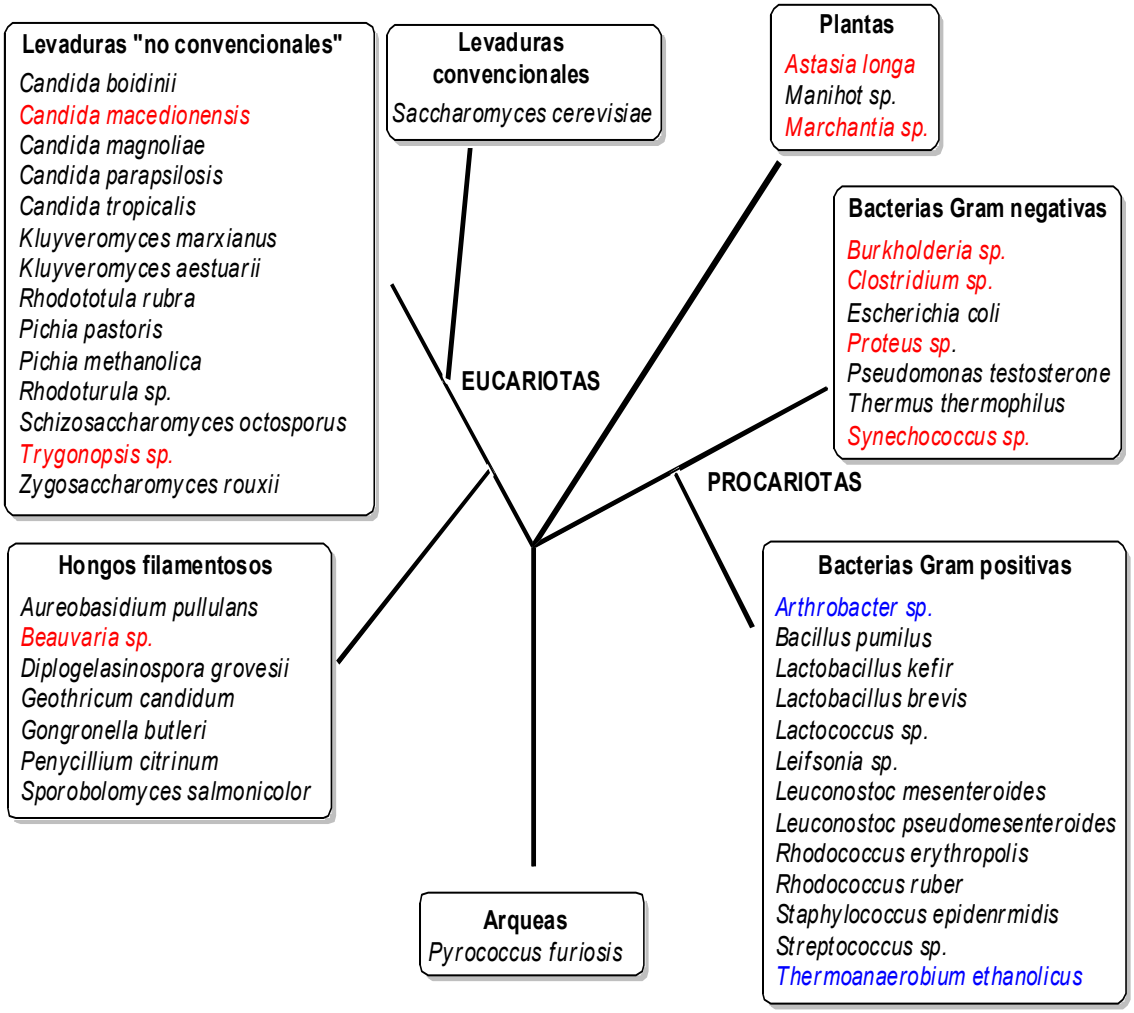
Superfamilia de reductasas dependientes de mononucleótido de flavina (FMN). Estas enzimas se conocen como las **"viejas enzimas amarillas**" (**OYE**, *old yellow enzymes*), debido a su color asociado al cofactor de flavina. Son enoato reductasas (EC 1.3 o EC 1.6), que son capaces de reducir dobles enlaces C=C (66)



Esquema 4.- Procesos de Biorreducción de compuestos carbonílicos.

La biorreducción de compuestos carbonílicos puede ser catalizada bien por células enteras **(a)** o enzimas aisladas **(b)**, como se indica en el Esquema 4. Puesto que, tal y como indicamos anteriormente, tanto las SDRs como las MDRs y las AKRs pueden catalizar la reducción de compuestos carbonílicos, utilizaremos el término genérico de **Carbonil Reductasas** (***CRs***) (48) para referirnos a ellas.

En la bibliografía, se han descrito una gran variedad de enzimas y de microorganismos de múltiples géneros, desde arqueas hasta plantas capaces de catalizar reacciones de reducción (54b, 67); en el Esquema 5 se recogen diferentes microorganismos usados para procesos redox, mientras que la Tabla II presenta las CRs habitualmente usadas como enzimas aisladas. En una excelente revisión recientemente publicada (48), se recogen las principales CRs disponibles, siguiendo como criterios los siguientes: que permitan obtener algún producto con un exceso enantiomérico mayor de 98%, que hayan sido descritas en reacciones con volúmenes al menos de 10 mL y que la enzima responsable de la reducción asimétrica haya sido caracterizada.



Esquema 5.- Origen de las principales oxidorreductasas descritas para la reducción estereoselectiva de compuestos carbonílicos (negro), alquenos (rojo) y aminación reductiva de oxoácidos (azul).

El uso de enzimas aisladas a escala preparativa y a nivel industrial ha sido objeto de recientes revisiones (68). De forma general, las enzimas que se emplean en las industrias alimentarias, farmacéutica, agroquímica, son catalizadores que permiten alcanzar unos incrementos en las velocidades de reacción de hasta 10^7 veces comparados con los catalizadores químicos, y trabajando a condiciones mucho más suaves de presión y temperatura (69), y de hecho están consideradas como los biocatalizadores más selectivos de los que se dispone (70). Actualmente, existen en el mercado diferentes "kits" de CRs, donde se comercializan distintas enzimas que pueden ser chequeadas para la reducción de un determinado compuesto carbonílico (por ejemplo, de evocatal GmbH, http://www.biocatal.com/upload/file/12-adh-kit-1-1-100.pdf, o de Daicel, http://www.daicelchiral.com/en/contents/chiralscreen/).

Tabla II. Principales Carbonil Reductasas (CRs) habitualmente usadas.

Carbonil Reductasa	Especificidad*	Cofactor	Referencias
ADH de levadura	Prelog	NADH	[71]
ADH de hígado de caballo	Prelog	NADH	[72]
ADH de *Thermoanaerobium brockii*	Prelog	NADPH	[73]
Hidroxiesteroides DH	Prelog	NADH	[74]
ADH de *Candida parapsilosis*	Prelog	NADH	[75]
ADH de *Rhodococcus erythropolis*	Prelog	NADH	[76]
ADH de *Lactobacillus kefir*	Anti-Prelog	NADPH	[77]
ADH de *Pseudomonas sp.*	Anti-Prelog	NADH	[78]

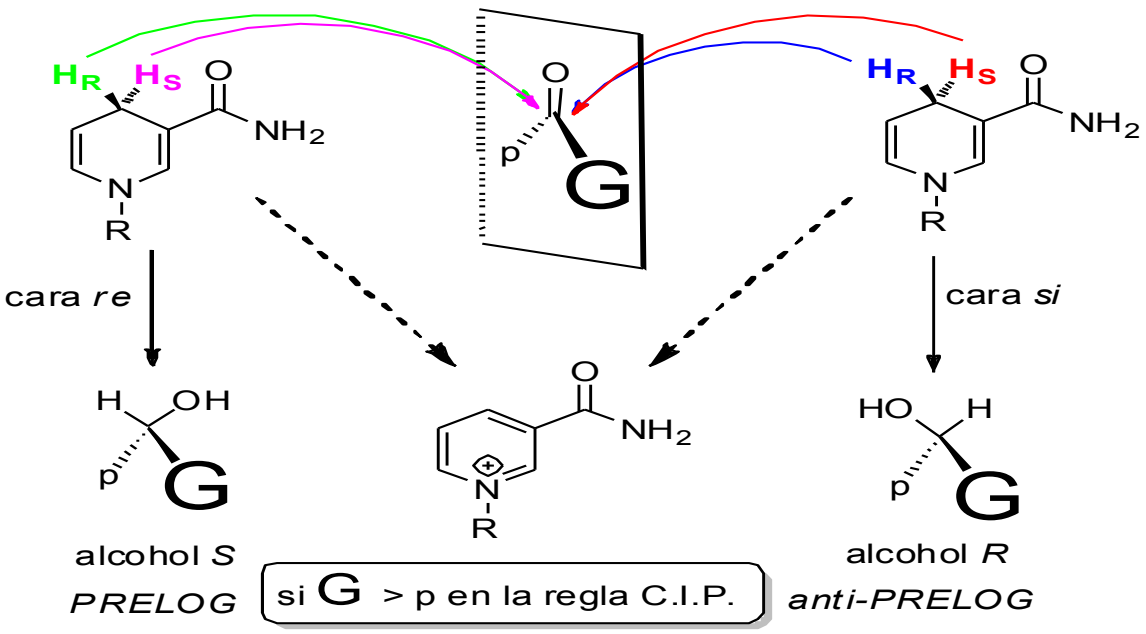
*Ver Esquema 6.

El uso de enzimas aisladas a escala preparativa y a nivel industrial ha sido objeto de recientes revisiones (68). De forma general, las enzimas que se emplean en las industrias alimentarias, farmacéutica, agroquímica, son catalizadores que permiten alcanzar unos incrementos en las velocidades de reacción de hasta 10^7 veces comparados con los catalizadores químicos, y trabajando a condiciones mucho más suaves de presión y temperatura (69), y de hecho están consideradas como los biocatalizadores más selectivos de los que se dispone (70). Actualmente, existen en el mercado diferentes "kits" de CRs, donde se comercializan distintas enzimas que pueden ser chequeadas para la reducción de un determinado compuesto carbonílico (por ejemplo, de evocatal GmbH, http://www.biocatal.com/upload/file/12-adh-kit-1-1-100.pdf, o de Daicel, http://www.daicelchiral.com/en/contents/chiralscreen/).

En sistemas donde se emplean células enteras (8D), la estereoselectividad de la reacción viene marcada por la que determine la reductasa que predomine dentro

del microorganismo, puesto que pueden existir más de una enzima que presente dicha capacidad (71b). De hecho, ésta suele ser la causa de que a veces la estereoselectividad obtenida con células enteras sea baja, pues esas enzimas pueden tener estereopreferencias opuestas (79). No obstante, el hecho de que existan muchas colecciones de microorganismos comercialmente disponibles (ATCC, NCTC, DSMZ o CCUG (69)) constituye una gran ventaja respecto al empleo de enzimas aisladas, puesto que el número de las mismas al cual se puede acceder comercialmente es mucho más limitad (48,68a). Por otra parte, citaremos que las células enteras pueden ser utilizadas en procesos de biorreducción en diferentes estados (80): en reposo (81), en crecimiento (82), permeabilizadas (83) o liofilizadas (84), aunque generalmente suele ser el primer tipo el más frecuente. Aunque, como hemos señalado anteriormente, la mayoría de los procesos industriales se llevan a cabo empleando células enteras, desde el punto de vista de la Química Sostenible, el uso de enzimas aisladas (o células enteras muertas) es preferible, porque esto permite que no se genere mucha biomasa derivada del crecimiento celular (85) En efecto, una característica habitual de los procesos catalizados por células enteras es su baja productividad, debido a que los sustratos que se desea reducir suelen ser tóxicos para el microorganismo, siendo tolerados de manera general a concentraciones entre el 0,1 y el 0,3% (11). Por ello, la existencia de una gran cantidad de biomasa en el medio de reacción conduciría a bajos rendimientos globales y dificultaría la purificación del sustrato. En este sentido, el parámetro quimiométrico Factor E (cociente (en masa) de productos de desecho respecto a producto final en un esquema sintético) (12b,c, 47) es muy alto para estos procesos

En cualquier caso, las oxidorreductasas responsables de estos procesos, ya sean en forma de enzimas aisladas o células enteras, precisan de cofactores tipo NAD(P)H para suministrar el equivalente de hidruro necesario para la biorreducción, tal y como se indica en el Esquema 6.



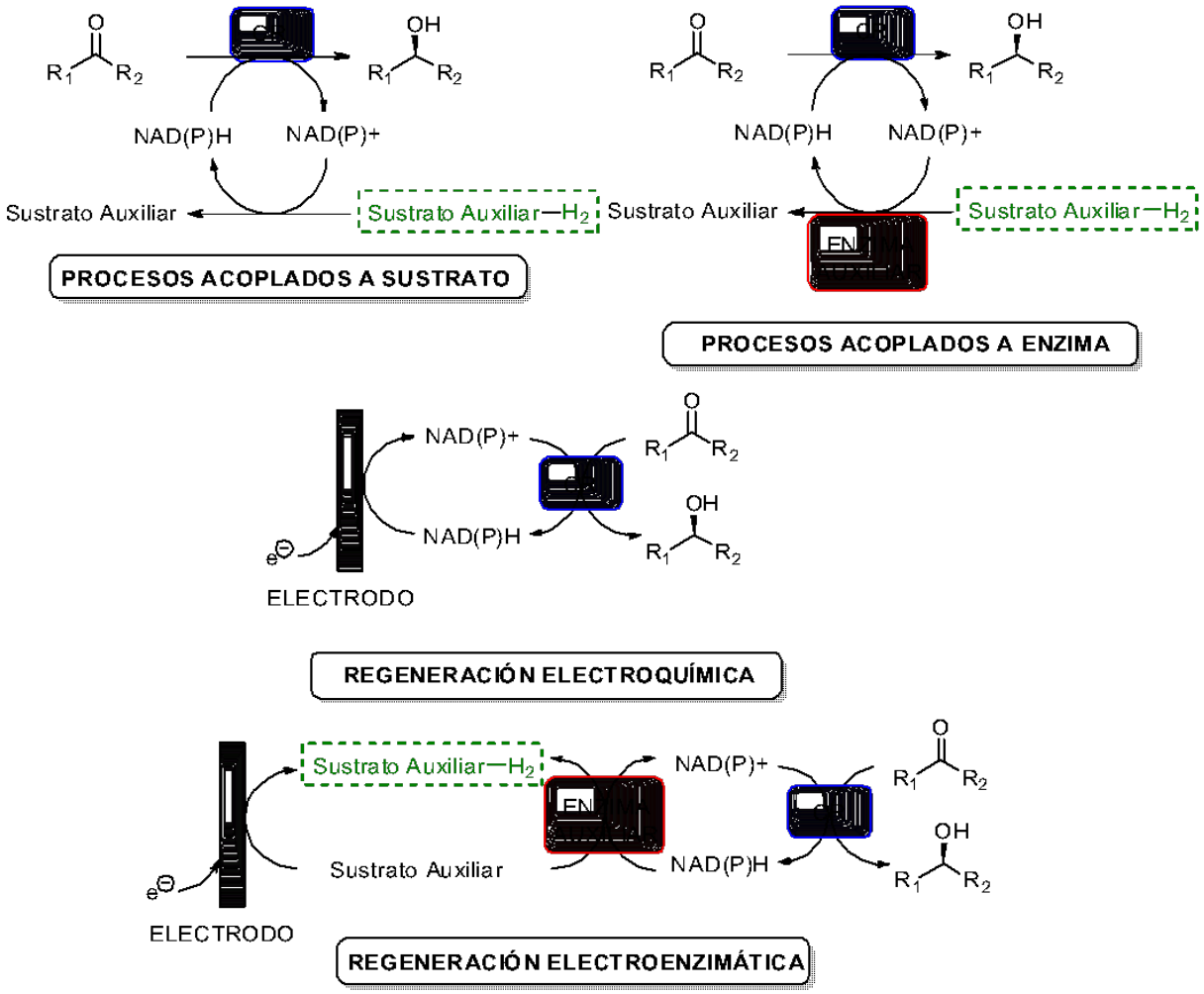
Esquema 6.- Especificidad en la biorreducción de cetonas por CRs.

Durante el curso de la reacción, dicho equivalente se transfiere a través de la cara *re* o la cara *si* de la cetona para originar bien el alcohol *S* o el alcohol *R*. Para la mayoría de los casos, el curso estereoquímico de la reacción puede preverse atendiendo al tamaño relativo de los sustituyentes (*p*, pequeño; *G*, grande) del carbono sp^2 de la cetona, en lo que se conoce como la regla de Prelog (86). En este sentido, y siempre que el tamaño de los sustituyentes se corresponda con la prioridad asignada por las reglas C.I.P. de secuencia, aquellos biocatalizadores que ceden el hidruro por la cara *re* para originar el alcohol *S* reciben el nombre de "*Prelog*", mientras que cuando la transferencia de hidruro se realiza por la cara *si* (para originar el alcohol *R*) se habla de CRs "*anti-Prelog*". En la Tabla 2 se recoge las preferencias estereoquímicas de las principales CRs comercialmente disponibles.

Por otra parte, hay que considerar que en la reacción de reducción de un compuesto carbonílico hasta el correspondiente alcohol (Esquema 6) se consume un equivalente de cofactor (NAD(P)H) por cada equivalente de sustrato convertido, generando un equivalente de cofactor oxidado ($NAD(P)^+$). Debido a este hecho, cuando se emplean enzimas aisladas es necesario desarrollar un sistema de regeneración de cofactor, pues de otra manera el proceso sería económicamente muy desfavorable. Por ello, no es de extrañar que aproximadamente un 75% de los

procesos de biorreducciones industriales empleen células enteras (87), pues en estos casos el microorganismo posee la maquinaria metabólica requerida para la regeneración del cofactor. Existen diferentes formas para llevar a cabo esta regeneración (9b, 88), recogidos en el Esquema 7; los procesos más habituales son aquellos que implican un sustrato auxiliar (procesos acoplados a sustrato), un sustrato auxiliar y una enzima auxiliar (procesos acoplados a enzima), o bien procesos electroquímicos y/o electroenzimáticos, usados a nivel de laboratorio, pero que aún no han encontrado aplicación industrial (88a). De todos ellos, son los acoplados a enzima y/o sustrato los más empleados a nivel industrial (9b,54b,88a).

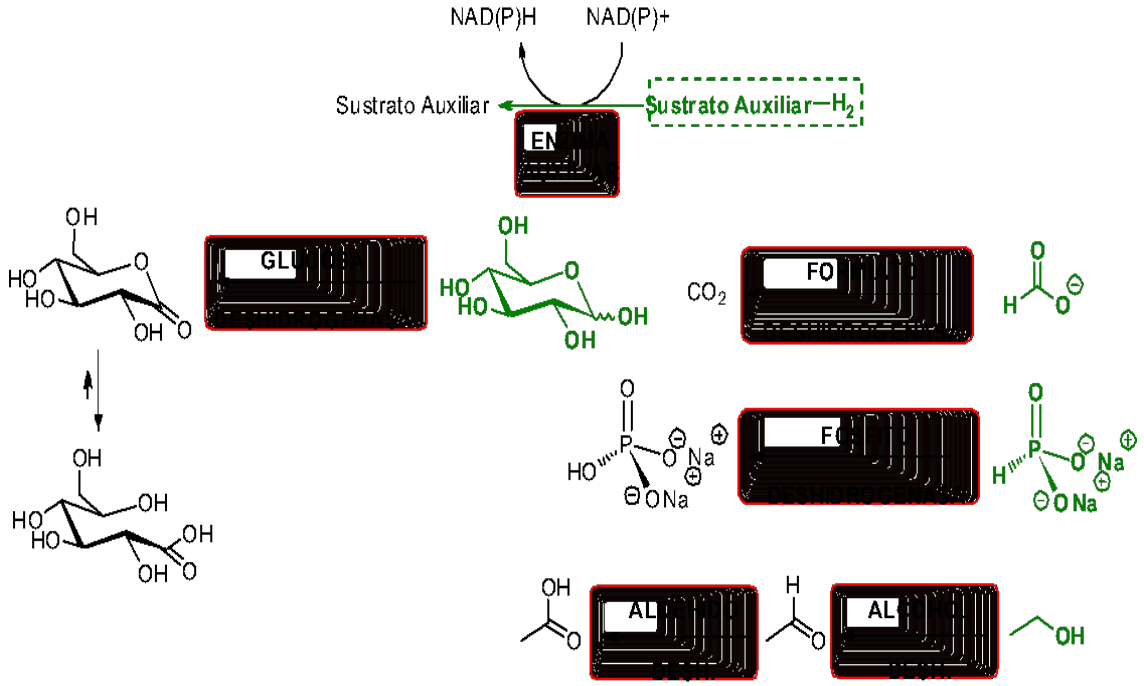
Entre ellos, el segundo método implica que una sola enzima debe encargarse de los dos procesos, la reducción del sustrato de interés y la oxidación del sustrato auxiliar. En la mayoría de los casos (68a), este sustrato auxiliar es *iso*propanol, el cual tiene la doble misión de actuar como sustrato auxiliar por un lado, y por el otro ayudar a solubilizar el sustrato principal. Como desventaja, citaremos principalmente dos: por un lado, el hecho de que la misma enzima tenga que ocuparse de los dos procesos reduce la actividad específica del biocatalizador; por otra parte, ninguna de las dos reacciones acopladas es irreversible, de manera que la máxima conversión obtenida vendría dictada por la concentración alcanzada en equilibrio.



Esquema 7.- Procesos de regeneración de cofactor.

Por tanto, se precisa actuar sobre la reacción de oxidación de *iso*propanol, bien añadiendo un exceso del mismo o bien eliminando la acetona a medida que se va formando, para poder tener un proceso que conduzca a altas conversiones. Asimismo, aunque como hemos comentado anteriormente el empleo de células enteras hace innecesaria la regeneración del cofactor, en muchos casos (89) se emplea esta estrategia de usar el *iso*propanol cuando se trabaja con este tipo de biocatalizadores, tanto por temas de solubilidad de sustrato como para ayudar a la reacción principal de reducción.

En los llamados procesos acoplados a enzima, tal y como se ha comentado anteriormente, se precisan dos enzimas y dos sustratos. Los procesos más habituales aparecen representados en el Esquema 8.



Esquema 8.- Principales sistemas de enzimas y sustratos auxiliares empleadas en biorreducciones.

Cuando se emplea formiato como sustrato auxiliar, la enzima auxiliar empleada es la formiato deshidrogenasa (FDH), que transforma dicho sustrato en dióxido de carbono. Puesto que este paso es irreversible en las condiciones habituales de reacción, debido a la naturaleza gaseosa del dióxido de carbono, el equilibrio del proceso de reducción de la cetona deseada (Esquema 8) está completamente desplazado hacia el producto final, lo que supone una gran ventaja y permite obtener conversiones elevadas (en torno al 99-100%). Asimismo, el formiato es un co-sustrato bastante barato, por lo que este sistema es sin duda uno de los más empleados, a pesar de la baja estabilidad de la FDH, lo que obliga a aplicar procesos de inmovilización-estabilización (una descripción detallada de este proceso, así como de todos los demás sistemas empleados, se puede encontrar en la reciente revisión publicada por Berenguer-Murcia y Fernández-Lafuente (88a)). Señalaremos que, a nivel industrial, el empleo de FDH de *Candida boidinii* es el único descrito hasta ahora, siendo empleado por la compañía Degussa para la obtención de *L-terc*leucina a nivel de multi-toneladas año (54b, 90). La desventaja de que esta enzima sólo funcione con el NAD^+ se ha solventado recientemente gracias

a las técnicas de ingeniería genética (91), lo que ha permitido obtener una enzima capaz de regenerar igualmente el $NADP^+$.

El otro sistema clásico de regeneración es el empleo de glucosa y glucosa deshidrogenasa (GDH), enzima que cataliza su oxidación hasta *D*-gluconolactona. La irreversibilidad de este proceso viene marcada por la apertura espontánea de la misma hasta ácido *D*-glucónico, el cual es subsecuentemente neutralizado mediante la adición de una base para originar la correspondiente sal. Al igual que sucede con el *iso*propanol, también está descrito el uso de glucosa como sustrato auxiliar cuando se emplean células enteras(81d,92). Alternativamente, se ha descrito el uso de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) empleando como sustrato auxiliar glucosa 6-fosfato(68a), aunque el alto precio del sustrato auxiliar hace necesario el empleo de técnicas de mutación de la enzima para permitir el uso de glucosa como sustrato(9b). Por otra parte, el uso de etanol (como sustrato auxiliar) y alcohol deshidrogenasa como enzima auxiliar presenta como desventaja el bajo potencial redox del sistema, así como la necesidad de emplear otra enzima (aldehído deshidrogenasa) para llegar hasta el ácido y lograr la deseada irreversibilidad.(11)

Una alternativa reciente es el uso del sistema de fosfito y fosfito deshidrogenasa (PTDH) (93), interesante desde el punto de vista del bajo precio del sustrato auxiliar, del nulo efecto de toxicidad del fosfito y el fosfato sobre las enzimas, y del alto grado de irreversibilidad obtenido. No obstante, aún no existen aplicaciones a nivel comercial.

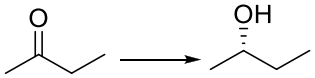
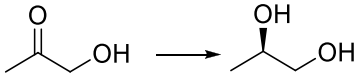
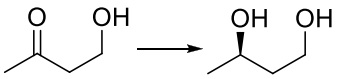
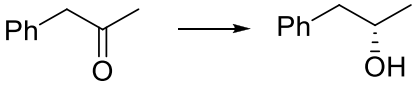
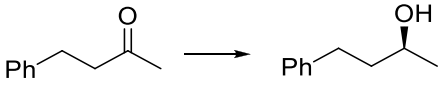
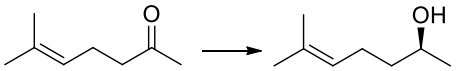
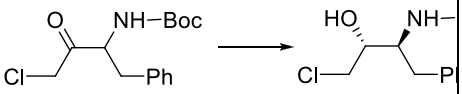
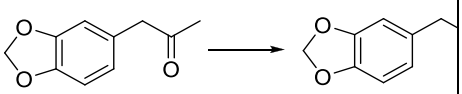
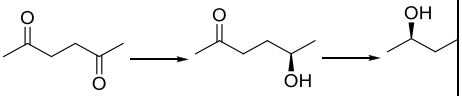
En cualquier caso, para medir la efectividad del proceso de biorreducción con enzimas aisladas y reciclado de cofactor, se suele emplear el llamado Número Total de Recambio (*Total Turnover Number*, TTN), que cuantifica el número de moles de sustrato convertidos por unidad de tiempo y por mol de cofactor (94). Así, para reacciones a escala de laboratorio, valores de TTN entre 10^3 y 10^5 son adecuados, mientras que para procesos a nivel industrial se requieren valores superiores (11).

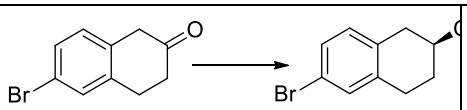
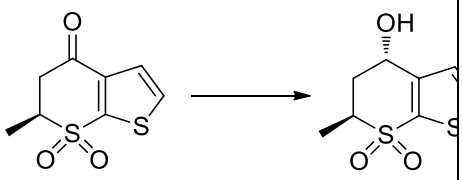
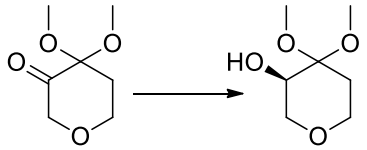
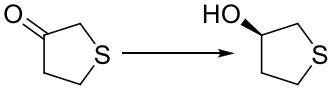
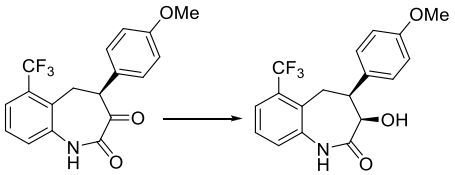
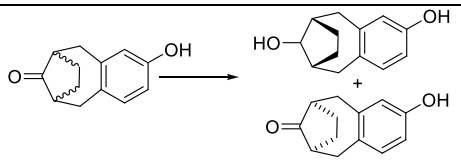
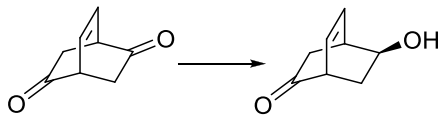
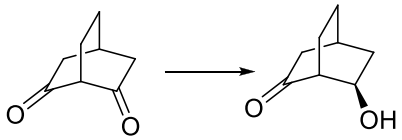
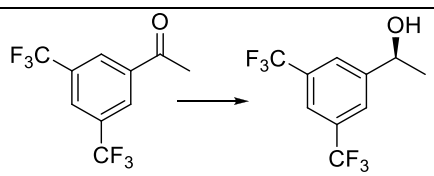
Finalmente, indicaremos que existen descritos en la bibliografía cientos de ejemplos de biorreducciones a nivel de laboratorio, recogidos en diferentes revisiones que se han citado a lo largo de este capítulo (7-8,8d,48,52,53b,c,54a,67-68,70,87,92c,95). Sería, pues, de todo punto imposible comentar todos y cada uno de los ejemplos ahí mencionados. Solamente nos limitaremos a citar aquellos casos

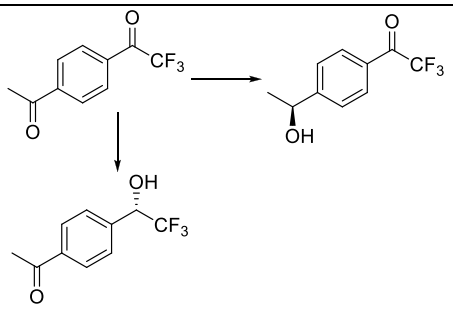
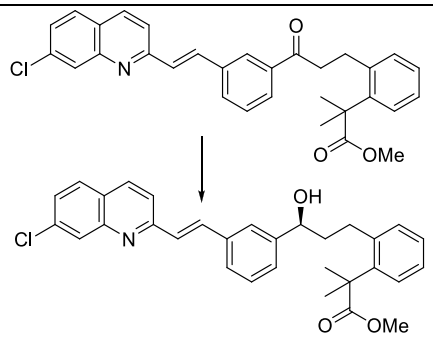
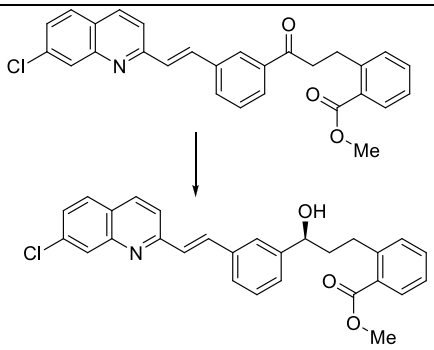
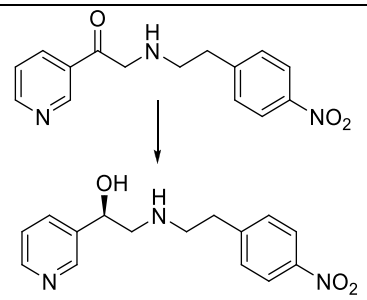
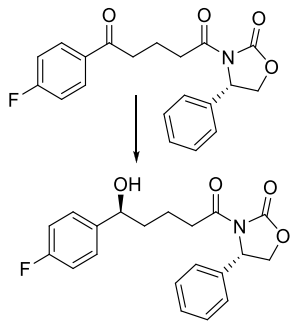
en los cuales la biorreducción se ha escalado a nivel industrial, los cuales están recogidos en la Tabla III.

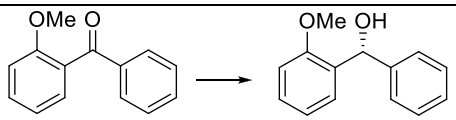
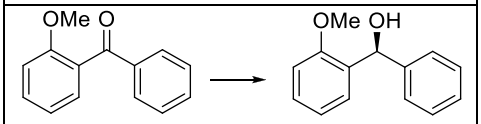
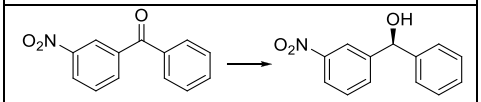
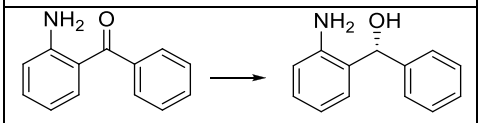
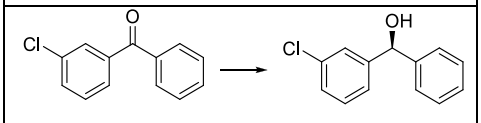
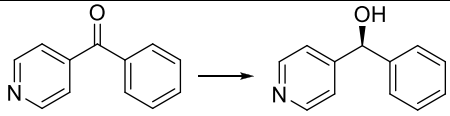
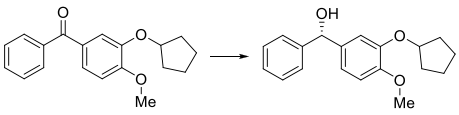
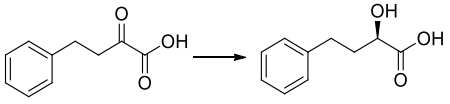
Como puede verse de la Tabla III, la producción a nivel industrial de alcoholes se ha llevado a cabo en compañías tales como Merck & Co. Inc. Rahway, Bristol–Myers Squibb, Kaneka, Lonza, Astra Zeneca, y otras, en escalas que oscilan entre gramos y toneladas, con buenas purezas ópticas (97–99%).

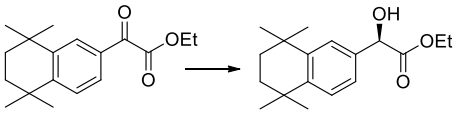
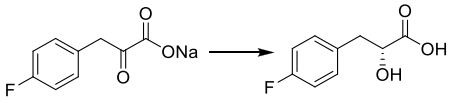
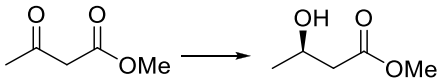
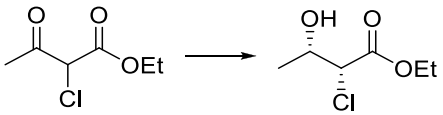
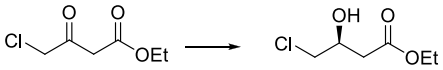
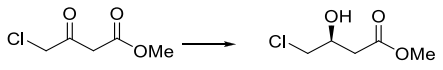
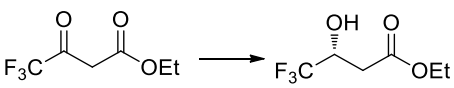
Tabla III. Biorreducciones a escala preparativa o industrial, clasificadas según el tipo de sustrato.

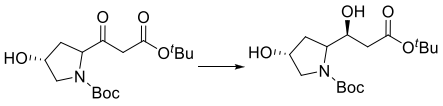
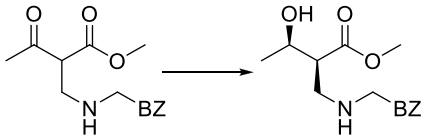
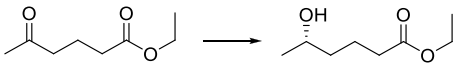
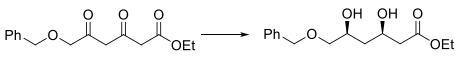
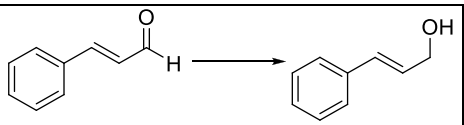
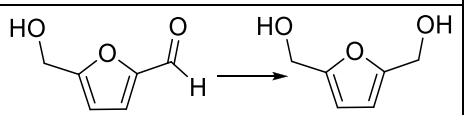
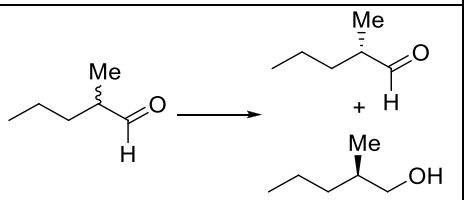
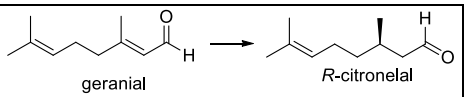
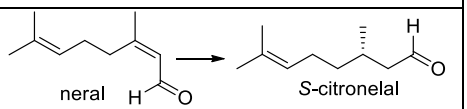
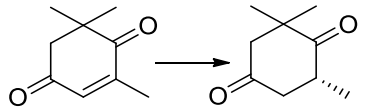
Prod.	BIORREDUCCIÓN	COMENTARIOS	ESCALA	PUREZA ÓPTICA	BIOCATALIZADOR	COMPAÑÍA REF.
CETONAS ALIFÁTICAS LINEALES						
(*S*)-2-butanol		Sintones quirales de gran utilidad en múltiples procesos	10 kg	98.4% ee	Cetorreductasa de *Candida parapsilosis*	IEP GmbH[96]
(*R*)-1,2-propanodiol			400 g	98,2% ee	Células enteras de *S. cerevisiae.*	Kometani *y cols.*[97]
(*R*)-1,3-butanodiol			250 g	99% ee	ADH de *Leifsonia* sobreexpresada en células de *E. coli*,	Itoh *y cols.*[98]
(*S*)-1-fenil-2-propanol		Intermedio en la síntesis de anfetaminas	N.R.	> 99 % ee	Enzima soluble de *Rhodococcus erythropolis*/ FDH de C. boidinii/ Formiato	Forschungszentrum Julich GmbH[54b]
(*S*)-4-fenil-2-butanol-ol		Precursor de fármacos anitihipertensivos (labetalol, bufeniode) o espamolíticos (bromuro de emepronio)	N.R.	> 99 % ee	Enzima soluble de *Rhodococcus erythropolis*/ FDH de C. boidinii/ Formiato	Forschungszentrum Julich GmbH[54b]
(*S*)-6-metil-5-hepten-2-ol		(S)-(+)-Sulcatol, feromona del escarabajo de ambrosía *Gnathotrichus sulcatus* / *Gnathotrichus retusus*	N.R.	> 99 % ee	Enzima soluble de *Rhodococcus erythropolis*/ FDH de C. boidinii/ Formiato	Forschungszentrum Julich GmbH[54b]
(2*S*,3*R*)-4-cloro-3-hidroxi-1-fenil-2-butil carbamato de *terc*butilo		Intermedio en la síntesis del Atazanavir (inhibidor de la proteasa del VIH)	N.R.	99.4 % ee	Células enteras de *Rhodococcus erythropolis*	Bristol-Myers Squibb[99]
(*S*)-1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-2 propanol		Intermedio en la síntesis de benzodiazepinas	Escala de kg	>99.9 % ee	Células enteras de *Zygosaccharomyces rouxii*	Eli Lilly and Company [54b, 100]
DICETONAS ALIFÁTICAS LINEALES						
(2*R*,5*R*)-hexanodiol		Auxiliares quirales, intermedios para la síntesis de ligandos quirales	N.R.	99.5 % ee	Células enteras de *Lactobacillus kefir*.	Jülich Chiral Solutions [101]

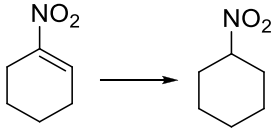
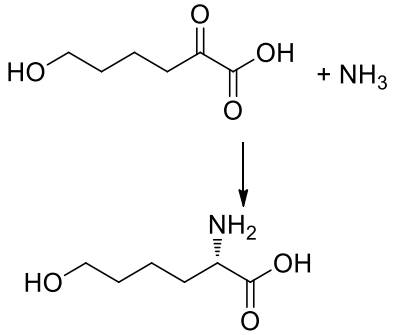
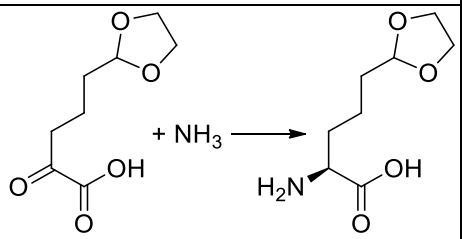
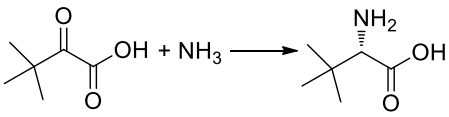
CETONAS ALIFÁTICAS CÍCLICAS						
(*S*)-bromo-β-tetralol		Precursor en la síntesis de bloqueantes de canales de calcio	N.R.	>99 % ee	Células enteras de *Trichosporon capitatum*	Merck & Co. Inc.[102]
(4*S*, 6*S*)-5,6-dihidro-4-hidroxi-6-metil-4*H*-tieno[2,3-*b*] tiopiran-7,7-dioxido		Intermedio en la síntesis del Trusopt® (antiglaucoma)	Multi toneladas	>99 % ee	Células enteras de *Neurospora crasa*	Astra Zeneca[54b, 103]
(*R*)-4,4-dimetoxitetrahidro-2*H*-piran-3-ol		Intermedio quiral para la síntesis de un inhibidor de receptores de quimiocina	80 kg	>99 % ee	Cetorreductasa recombinante	Merck & Co. Inc [104]
(*R*)-tetrahidrotiofen-3-ol		Intermedio quiral para la síntesis del antibacteriano Sulopenem.	100 kg	>99 % ee	Cetorreductasa recombinante de *Lactobacillus kefir*.	Codexis, Inc.[105]
(3*R*,4*S*)-3-hidroxi-4-(4-metoxifenil)-6-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1*H*-benzo[*b*]azepin-2(3*H*)-ona		Intermedio en la síntesis de bloqueantes de canales de calcio	N.R.	99.8 % ee	Células enteras de *Nocardia salmonicolor*	Bristol-Myers Squibb[54b, 106]
CETONAS ALIFÁTICAS BICÍCLICAS						
(6*S*,9*R*)-11-oxo-5,6,7,8,9,10-hexahidro-6,9-metanobenzociclooocteno		Intermedio en la síntesis de fármacos	1 kg	>99 % ee	Cetoreductasa comercial, Glucosa y GDH para recicaldo del cofactor	Merck & Co. Inc.[107]
DICETONAS ALIFÁTICAS CÍCLICAS						
(1*S*,4*S*,5*S*)-5-hidroxibiciclo[2.2.2]7-octen-2-one			5 g	>99 % ee	Células enteras de *Sacahromyces cerevisiae*	Friberg *y cols.* [108]
(1*R*,4*S*,6*R*)-6-hidroxibiciclo[2.2.2]2-octanona			100g	97 % de, > 99 % ee	Células enteras de *Sacahromyces cerevisiae*	Johanson *y cols.* [109]
ARIL ALQUIL CETONAS						
(*S*)-3,5-bistrifluorometil feniletanol		Intermedio en la síntesis de antagonistas del receptor NK1 (antidepresivos, ansiolíticos, antieméticos)	25 kg	98% % ee	Enzima purificada de *Rhodococcus erythropolis*	Merck & Co. Inc.[53a, 102]

(*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(4-(1-hydroxietil) fenil) etanona + (*S*)-1-(4-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil) fenil) etanona		Sintones quirales	100 mg	> 98% % ee	Cetorreductasas recombinantes	Merck & Co. Inc.[110]
(*S*,*E*)- 2-metil 2-(2-(3-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il) vinil fenil)-3-hidroxipropil) fenil)-propionato de metilo		Intermedio en la síntesis del antiasmático Montelukast	gramos	>99 % ee	Células enteras de *Microbacterium campoquemadoensis*	Merck & Co. Inc [111]
(*S*,*E*)-2-(3-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)fenil)-3-hidroxipropil) benzoato de metilo		Intermedio en la síntesis del antiasmático Montelukast	>200 kg	>99.9 % ee	Alcohol deshidrogenasas modificadas genéticamente	Codexis[112]
(*R*)-2-(4-nitrofenetilamino)-1-(piridin-3-il)etanol		Intermedio en la síntesis de antagonistas B-3	Multi kilogramos	>99.9 % ee	Células enteras de *Candida sorbophila*	Merck & Co. Inc[113]
(*S*)-3-((*S*)-5-(4-fluorofenil)-5-hidroxipentanoil)-4-feniloxazolidin-2-ona		Precursor en la síntesis de Ezetimiba (anticolesterolémico)	gramos	100 % ed.	Células enteras de *Schizosaccharomyces octosporus*	Schering Co.[114]

DIARILCETONAS						
(*S*)-diaril metanoles		Sintones quirales para la obtención de diferentes fármacos	1 g	98 % ee	Cetorreductasa comercial, glucosa como sustrato auxiliar	Merck & Co, Inc.[115]
				95% ee		
				> 99% ee		
				91 % ee		
				>99 % ee		
				>99 % ee	Alcohol deshidrogenasa de *L. kéfir.*	
(*S*)-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)(fenil) metanol		Sintón quiral para la obtención de un fármaco antiasma inhibidor de la fosfodiesterasa A	16 g	>96 % ee	Células enteras de *Rhodotorula pilimanae*	Merck & Co, Inc.[116]
α-OXO ÁCIDOS						
Ácido 2R-2-hidroxi-4-fenilbutírico (2-HPBA)		Precursor de fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)	6.3 gramos	99,9 % ee	Lactato deshidrogenasa de *Staphylococcus epidermis*	Ciba Spezialitäten-chemie AG[117]
			82 g	99,9% ee	Células inmovilizadas de *Proteus vulgaris*	

α-OXO ESTERES						
(2*R*)-hidroxi-2-(1',2',3',4'-tetrahidro-1',1',4',4'-tetrametil-6'-naftalenil) acetato de etilo		Intermedio en la síntesis de receptores del ácido retinóico	N.R.	97%	Células enteras de *Aureobasidium pullulans*	Bristol-Myers Squibb[54b, 118]
Ácido (*R*)-3-(4-fluorofenil)-2-hidroxipropanóico		Intermedio en la síntesis del Rupintrivir, inhibidor irreversible de la proteasa 3C del rinovirus humano (HRV)	N.R.	> 99.9%	D-lactato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*	Bristol-Myers Squibb[54b, 101c, 119]
β-OXO ESTERES						
(*S*)-3-hidroxibutanoato de etilo		Sintones quirales para la obtención de diferentes fármacos, pesticidas y fragancias.	50 g.	> 98 %	Alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* expresada en células de *E.coli*	Walton *y cols.*[120]
			600 g.	99.3%	Células enteras de *S. cerevisiae*.	Kometani y cols.[97a]
(*R*)-3-hidroxibutanoato de etilo			35 toneladas	99.8%	Enzima soluble de *Lactobacillus brevis*	Jülich Chiral Solutions. Wacker Chemie[54b, 101c]
(*R*)-3-hidroxibutanoato de metilo			700 g L^{-1} d^{-1}	> 99 %	Cetorreductasa de *Lactobacillus brevis* expresada en células de *E.coli*	Forschungszentrum Julich GmbH[121]
(2*R*, 3*S*)-2-cloro-3-hidroxibutanoato de etilo		Sintón quiral	4 g	98% ee	ADH de *P.finlandica* expresada en células de *E.coli*	Kaneka Co.[122]
(*S*) 4-cloro-3-hidroxibutanoato de etilo		Sintón quiral para la obtención de fármacos anticolesterolémicos (atorvastatina)	N.R.	99%	Células enteras de *E.coli*	Kaneka Co.[123]
			232.61 g	> 99.5%	Enzima aislada recombinante, glucosa y GDH para reciclar NADH	Codexis Inc.[124]
(*S*) 4-cloro-3-hidroxibutanoato de metilo			Multi kg.	9 % ee	Células enteras de *Geotrichum candidum* SC 5469	Bristol-Myers Squibb[125]
(*R*)-4,4,4-trifluoro-3-hidroxibutanoato de etilo		Sintón quiral para la obtención de beflotaxona, antidepresivo.	N.R	99% ee	Cetorreductasa de *Sporobolomyces salmonicolor* y GDH de *B. megaterium* expresadas en células de *E. coli.*	Lonza[126]

(*S*)-3-hidroxi-3[(*R*)-1-*terc*butoxicarbonil-4-hidroxipirrolidin-2-il] propanoato de *terc*butilo		Intermedio en la síntesis de antibióticos tipo carbapenenm	12.5 kg	98%	Células enteras de *Mortierella alpina*	Merck & Co, Inc. Rahway[127]
(2*S*,3*R*)-3-hidroxi-2-((2-oxo-2-fenetilamino)metil) butanoato de metilo		Intermedio en la síntesis de antibióticos tipo carbapenem.	25 gramos	> 60%	KREDs recombinantes	Codexis Inc[128]
OTROS OXO ESTERES						
(*S*)-5-hydroxihexanoato de etilo		Sintón quiral	Preparativa	> 99.5%	Células enteras de *Pichia methanolica*	Bristol-Myers Squibb[129]
(3*R*,5*S*)- 6-(benciloxi)-3,5-dihidroxihexanoato de etilo		Intermedio quiral para la síntesis de fármacos anticolesterolémicos	1 L	99%	Enzima soluble de *Acinetobacter calcoaceticus*.	Bristol-Myers Squibb[130]
ALDEHIDOS						
Alcohol cinámico		Para la producción de fragancias	miligramos	-----	Extracto celular de *Manihot sp*.	Machado y cols.[131]
2,5-dihidroximetil furano		Detoxificación de hidrolizados lignocelulósicos	gramos	-------	Células enteras de *Saccharomyces cerevisiae*	Petterson y cols.[132]
(*R*)-2-metilpentanol		Intermedio en la producción de fármacos y de cristales líquidos	342 g	98,5% ee	Cetrorreductasa de *E. coli* mejoradas por evolución dirigida	Pfizer[133]
ALQUENOS						
R-citronelal		Sintones quirales	Escala de gramos	98% ee	Enoato reductasa de *Pichia stipitis* OYE 2.6	Bougiouk ou y cols[134]
S-citronelal				> 99 %	Enoato reductasa de *E. coli* NemA	
(6*R*)-levodiona		Intermedio en la producción de zeoxantina, protector de la retina	5 g	NR	Células enteras recombinantes de *Escherichia coli* donde se sobreexpresa la enzima de *Candida macedoniensis*	Hoffmann - LaRoche.[135]

Nitrociclohexano			miligramos	-------	Enzima purificada de *S. cervisiae*.	Meah y Massey[136]
AMINACIÓN REDUCTIVA de OXOÁCIDOS						
L-6-hidroxi norleucina		Intermedio en la síntesis del antihipertensivo omapatrilato, y de azepinonas sustituidas en C-7	N.R.	99 % ee	Enzima purificada de hígado de ternera	Bristol-Myers Squibb[137]
Ácido (S)-2-amino-5-(1,3-dioxolan-2-il) pentanóico		Intermedio en una síntesis alternativa del antihipertensivo omapatrilato	197 kg	98% ee	Enzima de *Sporosarcina sp* expresada en células de *Escherichia coli*	Bristol-Myers Squibb[137b, 138]
L-terc-leucina		Para la síntesis de peptidomiméticos con actividad antitumoral o anti VIH.	1 tonelada	99,5 % ee	Enzima de *Thermoactinomices intermedius* expresada en células de *E. coli*	Degussa AG[106]

A continuación, comentaremos algunos ejemplos interesantes recogidos en dicha Tabla, en primer lugar usando enzimas aisladas.

a) Así, como primer caso, la síntesis de un intermedio de antagonistas de receptores K-1, el (*S*)-3,5-bistrifluorometilfenil etanol, ha sido puesta a punto a través de la reducción asimétrica de la 3,5-bistrifluorometil acetofenona (Tabla 3). El biocatalizador, una alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropolis*, fue seleccionado en un proceso de cribado, y se purificó previamente a su uso industrial, el cual se optimizó usando glucosa deshidrogenasa (GDH 103, de la casa Biocatalytics Inc.), como sistema auxiliar para regenerar el cofactor; esta enzima es más termoestable que la FDH inicialmente elegida. De esta forma, la biorreducción funciona con una conversión del 98%, y un exceso enantiomérico del 99%, en un proceso en planta piloto que se lleva a cabo en tanque agitado de 250 L con 25 kg (53ª, 101).

b) Por otra parte, el antiasmático Montelukast (Singulair) requiere como intermedio un alcohol enantioméricamente puro, el cual se obtiene en Merck a través de la biorreducción de una cetona precursora. De esta forma, tras un cribado inicial de 80 microorganismos, se detectó la actividad deseada en cepas de *Microbacterium campoquemadoensis* y *Mucor hiemalis*, obteniendo el alcohol intermedio deseado trabajando a una concentración de 500 mg/L, para obtener un e.e >95% tras 280 horas de reacción (111); no obstante, la baja solubilidad en agua de la cetona de partida limita la productividad volumétrica del proceso (<2 mg/L.hr), por lo que su aplicabilidad a nivel industrial se descartó, y se optó por una reducción química empleando un exceso (1,8 equivalentes) de (-)-DIP-Cl (β-clorodiisopinocanfenilborano) en THF at -25ºC. Recientemente, la compañía Codexis ha desarrollado recientemente un proceso alternativo, mucho más sencillo y sostenible, usando una cetorreductasa recombinante, con una conversión de >99%, y un excelente exceso enantiomérico de >99,9%. Este proceso se lleva a cabo a 45ºC, con una concentración inicial de sustrato de 100 g/L en una mezcla de isopropanol (que cumple también el papel de sustrato auxiliar para la regeneración del cofactor), agua y tolueno, lo que favorece la solubilidad de la cetona de partida y hace que el alcohol enantioméricamente puro así obtenido se purifique por una simple filtración (112). De esta forma, el proceso biocatalítico ha sido escalado hasta 200 kg (Arch Pharmlabs), lo que demuestra su gran potencialidad.

c) La obtención de moléculas quirales de pequeño tamaño suele ser más dificultosa que en aquellos otros casos donde la diferencia de tamaño de los sustituyentes en torno al carbonilo es mayor. Así, la obtención de (S)-2-butanol o (*R*)-tetrahidrotiofen-3-ol ejemplifican de manera excelente casos donde la obtención de una buena estereoselección es un reto para el biocatalizador. En este último caso (105), la enzima nativa permitía obtener solamente un 65% de exceso enantiomérico para el producto deseado; no obstante, el empleo de técnicas de evolución dirigida han permitido la obtención del alcohol con un valor de ee superior al 99%, a escala de multikilogramos

Tal y como se comentó con anterioridad, la mayoría de las biorreducciones industriales se llevan a cabo con células (aproximadamente 3 de cada 4 casos (87)). En la Tabla III aparecen reflejados varios ejemplos, alguno de los cuales comentaremos ahora.

a) La biorreducción del ácido (1*S*)-[3-cloro-2-oxol-(fenilmetil)propil] carbámico empleando células enteras de *R. erythropolis* SC13854 (99) permite la producción de un alcohol intermediario en la síntesis del Atazanavir, un inhibidor de la proteasa del VIH, con un rendimiento del 95% y una estereoselectividad del 99,4%.

b) Como ejemplo de biorreducción de dicetonas, citaremos el proceso de Jülich Chiral Solutions, donde la 2,5-hexadiona es reducida para obtener el (2*R*,5*R*)-hexanodiol, un sintón quiral de gran importancia, empleando células de *Lactobacillus kéfir* (101). Este proceso utiliza glucosa como cosustrato en un simple reactor tipo tanque agitado (el sistema más empleado industrialmente por su gran sencillez de manejo), a una escala de 0,25 toneladas al año, con un rendimiento del 90% y una estereoselectividad del 99,5%. Asimismo, este microorganismo es capaz de reducir eficientemente otras dicetonas como la 2,4-pentanodiona, 3,6-octanodiona, 2,7-dimetil-3,6-octanodiona y 2,6-heptanodiona (54b).

c) Ya indicamos con anterioridad que una característica habitual de los procesos catalizados por células enteras es su baja productividad, debido a que los sustratos que se desea reducir suelen ser tóxicos para el microorganismo, siendo tolerados de manera general a concentraciones entre el 0,1 y el 0,3% (11). Por ello, a escala industrial es necesario el desarrollo de diferentes metodologías para aumentar la productividad hasta valores aceptables; entre ellas, una alternativa interesante consiste en el empleo de biorreactores retroalimentados (*fed-batch*), donde se limita la concentración efectiva de sustrato en las inmediaciones de la célula. Como ejemplo, citaremos el proceso de AstraZeneca (54b,103) para la producción de un intermedio del Trusopt®, fármaco para el tratamiento del glaucoma. Otra posibilidad consiste en la inmovilización del sustrato en un soporte no tóxico, de manera que se vaya liberando de manera controlada al medio de reacción: es el caso del proceso desarrollado por Eli Lilly(54b,100) utilizando células de *Z. rouxii* para

la obtención de un intermedio en la síntesis de una benzodiazepina activa por vía oral. También pueden utilizarse sistemas bifásicos para minimizar la inhibición por sustrato; como ejemplos, citaremos la biorreducción de Kaneka (122) para la obtención de (2*R*, 3*S*)-2-cloro-3-hidroxibutanoato de etilo con células recombinantes de *Escherichia coli* con sobreexpresión de una cetorreductasa de *Pichia finlandica* y FDH de *Mycobacterium sp*. Otro ejemplo de esta metodología: el proceso desarrollado por Lonza para la obtención de (*R*)-4,4,4-trifluoro-3-hidroxibutanoato de etilo, empleando un sistema bifásico agua/acetato de butilo, y dos enzimas, una cetorreductasa de *Sporobolomyces salmonicolor* y glucosa deshidrogenasa de *B. megaterium* expresadas en células de *E. coli*.

d) En otros casos, el empleo de sistemas en continuo permite la obtención de excelentes resultados. Por ejemplo, Itoh y cols. (98) utilizaron un reactor de lecho empaquetado de 10 ml conteniendo 1 gramo de células de *E. coli* con ADH de *Leifsonia* sobreexpresada para producir en 500 horas 250 gramos de *(R)*-1,3-butanodiol con alta pureza óptica (99% ee), empleando 2-propanol para regenerar los cofactores. Asimismo, utilizando huéspedes distintos de *E.coli* (53c) se espera aumentar la productividad espaciotemporal hasta valores de 3,6 $g \cdot^{L\text{-}1} \cdot^{d\text{-}1}$. Por otra parte, la reducción de acetoacetato de metilo con células de *E. coli* donde se ha sobreexpresado una cetorreductasa de *L. brevis* condujo a la producción del correspondiente b-hidroxiester en altos rendimientos y pureza (700 $g \cdot^{L\text{-}1} \cdot^{d\text{-}1}$) usando un sistema de reactor en continuo con retención del biocatalizador mediante una membrana de ultrafiltración (121). Empleando un diseño similar, pero añadiendo un sistema de pervaporación para eliminar la acetona producida como consecuencia de la oxidación del *iso*propanol, Schoer y Lutz (139) han descrito muy altas productividades (> 170 $g \cdot^{L\text{-}1} \cdot^{d\text{-}1}$) en la obtención de (R,R)-2,5-hexanodiol por biorreducción de la correspondiente dicetona de partida.

3. CONCLUSIÓN Y PROGNOSIS

Dada la gran complejidad y variedad en las estructuras de los fármacos, el empleo de enzimas redox supone una alternativa más sostenible y ecoamigable frente a los tradicionales métodos químicos para la obtención de los pertinentes

sintones quirales que conduzcan a los diferentes principios activos. La necesidad de utilizar cofactores, que podría significar un escollo para su utilización a nivel industrial, ha sido solventada de forma eficiente mediante el empleo de sistemas adecuados para su reciclado, empleando sustratos auxiliares y/o enzimas auxiliares. Por otra parte, el uso de herramientas de ingeniería genética (mutagénesis dirigida o evolución dirigida) para mejorar la eficacia catalítica de las enzimas redox, así como un adecuado diseño del medio de reacción y del biorreactor, han permitido la implementación de numerosos procesos industriales con altas productividades.

Sin duda, pues, nos encontramos ante una estrategia que puede cobrar un inusitado auge en los próximos años. Así por ejemplo, el uso industrial de biocatalizadores provenientes de organismos extremófilos puede suponer un gran avance a la hora de diseñar procesos aún más eficaces, y que conducirán de manera segura a procesos industriales aún más eficientes.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T., Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org Biomol Chem* **2006,** *4* (12), 2337-2347.

2. Patel, R. N., Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord. Chem. Rev.* **2008,** *252* (5-7), 659-701.

3. (a) Tucker, J. L., Green Chemistry: Cresting a Summit toward Sustainability. *Org Process Res Dev* **2010,** *14* (2), 328-331; (b) Anastas, P.; Eghbali, N., Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010,** *39* (1), 301-312.

4. Anastas, P. T.; Warner, J. C., *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press: Oxford, 1998.

5. Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,: Weinheim, 2007.

6. Enzyme Nomenclature. Academic Press: New York, 1992.

7. Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K., Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009,** *20* (5), 513-557.

8. (a) Leonida, M. D., Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration. *Curr Med Chem* **2001,** *8* (4), 345-369; (b) Burton, S. G., Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends*

Biotechnol **2003,** *21* (12), 543-549; (c) Meyer, D.; Bu¨hler, B.; Schmid, A.; Allen I. Laskin, S. S.; Geoffrey, M. G., Process and Catalyst Design Objectives for Specific Redox Biocatalysis. In *Adv. Appl. Microbiol.*, Academic Press: 2006; Vol. Volume 59, pp 53-91; (d) Carballeira, J. D.; Quezada, M. A.; Hoyos, P.; Simeó, Y.; Hernaiz, M. J.; Alcantara, A. R.; Sinisterra, J. V., Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnology Advances* **2009,** *27*, 686-714.

9. (a) Lu, J.; Lazzaroni, M. J.; Hallett, J. P.; Bommarius, A. S.; Liotta, C. L.; Eckert, C. A., Tunable Solvents for Homogeneous Catalyst Recycle. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2004,** *43* (7), 1586-1590; (b) Liu, W. F.; Wang, P., Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnol Adv* **2007,** *25* (4), 369-384.

10. Carballeira, J. D.; Fernandez-Lucas, J.; Quezada, M. A.; Hernaiz, M. J.; Alcantara, A. R.; Simeó, Y.; Sinisterra, J. V., Biotransformations. In *Encyclopedia of Microbiology*, Moselio, S., Ed. Academic Press: Oxford, 2009; pp 212-251.

11. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry. A textbook*. 5th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2004; p 454.

12. (a) Sheldon, R. A., Organic Synthesis: Past, present and future. *Chem Ind-London* **1992,** (23), 903-906; (b) Sheldon, R. A., The E factor: fifteen years on. *Green Chem.* **2007,** *9* (12), 1273-1283; (c) Sheldon, R. A., E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. *Chem. Commun.* **2008,** (29), 3352-3365.

13. Kayser, M. M., 'Designer reagents' recombinant microorganisms: new and powerful tools for organic synthesis. *Tetrahedron* **2009,** *65* (5), 947-974.

14. Woodley, J. M., New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* **2008,** *26* (6), 321-327.

15. Molinari, F., Oxidations with Isolated and Cell-Bound Dehydrogenases and Oxidases. *Curr Org Chem* **2006,** *10* (11), 1247-1263.

16. Hughes, A. B.; Rudge, A. J., Deoxynojirimycin - synthesis and biological-activity. *Nat Prod Rep* **1994,** *11* (2), 135-162.

17. Landis, B. H.; McLaughlin, J. K.; Heeren, R.; Grabner, R. W.; Wang, P. T., Bioconversion of N-Butylglucamine to 6-Deoxy-6-butylamino Sorbose by Gluconobacter oxydans. *Org Process Res Dev* **2002,** *6* (4), 547-552.

18. Takeuchi, K.; Koike, K.; Ito, S., Production of cis-unsaturated hydrocarbons by a strain of Rhodococcus in repeated batch culture with a phase-inversion, hollow-fiber system. *J Biotechnol* **1990,** *14* (2), 179-186.

19. Patel, R. N., Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Adv Synth Catal* **2001,** *343* (6-7), 527-546.

20. Bertola, M. A. A.; Koger, H. S. G.; Phillips, G. T.; Marx, A. F.; Claassen, V. P.; Bertola, M. A.; Koger, H. S.; Philips, G. T. R-1,3-dioxolane-4-methanol prepn. - comprises contacting RS-mixt. with microorganism for stereoselective consumption of S-isomer. EP244912-A1; EP244912-A; AU8772538-A; NO8701903-A; ZA8703274-A; FI8702018-A; DK8702315-A; JP63094986-A; PT84830-A; EP244912-B; DE3763408-G; ES2019618-B; IL82416-A; US5190867-A; FI90092-B; CA1334082-C.

21. Glockler, R.; Roduit, J. P., Industrial bioprocesses for the production of substituted aromatic heterocycles. *Chimia* **1996,** *50* (9), 413-415.

22. Dingler, C.; Ladner, W.; Krei, G. A.; Cooper, B.; Hauer, B., Preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxy) propionic acid by biotransformation. *Pestic. Sci.* **1996,** *46* (1), 33-35.

23. (a) Springer, D. M.; Sorenson, M. E.; Huang, S.; Connolly, T. P.; Bronson, J. J.; Matson, J. A.; Hanson, R. L.; Brzozowski, D. B.; LaPorte, T. L.; Patel, R. N., Synthesis and activity of a C-8 keto pleuromutilin derivative. *Bioorg Med Chem Lett* **2003,** *13* (10), 1751-1753; (b) Hanson, R. L.; Matson, J. A.; Brzozowski, D. B.; LaPorte, T. L.; Springer, D. M.; Patel, R. N., Hydroxylation of mutilin by Streptomyces griseus and Cunninghamella echinulata. *Org Process Res Dev* **2002,** *6* (4), 482-487.

24. Gbewonyo, K.; Buckland, B. C.; Lilly, M. D., Development of a large-scale continuous substrate feed process for the biotransformation of simvastatin by *Nocardia sp. Biotechnol Bioeng* **1991,** *37* (11), 1101-1107.

25. Park, J. W.; Lee, J. K.; Kwon, T. J.; Yi, D. H.; Kim, Y. J.; Moon, S. H.; Suh, H. H.; Kang, S. M.; Park, Y. I., Bioconversion of compactin into pravastatin by Streptomyces sp. *Biotechnol Lett* **2003,** *25* (21), 1827-1831.

26. Zuidweg, M. H. J., Hydroxylation of Reichstein's compound S with cell-free preparations from *Curvularia lunata*. *Biochim. Biophys. Acta* **1968,** *152* (1), 144-&.

27. (a) Picataggio, S.; Rohrer, T.; Deanda, K.; Lanning, D.; Reynolds, R.; Mielenz, J.; Eirich, L. D., Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic-acids. *Bio-Technol* **1992,** *10* (8), 894-898; (b) Liu, S. C.; Li, C.; Fang, X. C.; Cao, Z. A., Optimal pH control strategy for high-level production of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic acid by Candida tropicalis. *Enzyme Microb Tech* **2004,** *34* (1), 73-77.

28. Ro, D. K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C. Y.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D., Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **2006,** *440* (7086), 940-943.

29. Wong, J. W.; Watson, H. A.; Bouressa, J. F.; Burns, M. P.; Cawley, J. J.; Doro, A. E.; Guzek, D. B.; Hintz, M. A.; McCormick, E. L.; Scully, D. A.; Siderewicz, J. M.; Taylor, W. J.; Truesdell, S. J.; Wax, R. G., Biocatalytic oxidation of 2-methylquinoxaline to 2-quinoxalinecarboxylic acid. *Org Process Res Dev* **2002,** *6* (4), 477-481.

30. (a) Petersen, M.; Kiener, A., Biocatalysis - Preparation and functionalization of N-heterocycles. *Green Chem* **1999,** *1* (2), 99-106; (b) Shaw, N. M.; Robins, K. T.; Kiener, A., Lonza: 20 years of biotransformations. *Adv Synth Catal* **2003,** *345* (4), 425-435.

31. Yoshikawa, N.; Ohta, K.; Mizuno, S.; Ohkishi, H., Production of cis,cis-muconic acid from benzoic acid. *Bioprocess Technol* **1993,** *16*, 131-47.

32. Murdock, D.; Ensley, B. D.; Serdar, C.; Thalen, M., Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Bio-Technol* **1993,** *11* (3), 381-386.

33. Taylor, S. C. Fermentative prodn. of 1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene cpds. using mutant strain of *Pseudomonas putida*. EP76606-B1; EP76606-A; EP76606-B, 1983.

34. Held, M.; Schmid, A.; Kohler, H. P. E.; Suske, W.; Witholt, B.; Wubbolts, M. G., An integrated process for the production of toxic catechols from toxic phenols based on a designer biocatalyst. *Biotechnol Bioeng* **1999,** *62* (6), 641-648.

35. (a) Furuhashi, K.; Takagi, M., Optimization of a medium for the production of 1,2-epoxytetradecane by *Nocardia corallina* B-276. *Appl Microbiol Biot* **1984,** *20* (1), 6-9; (b) Furuhashi, K.; Shintani, M.; Takagi, M., Effects of solvents on the production of epoxides by Nocardia Corallina B-276. *Appl Microbiol Biot* **1986,** *23* (3-4), 218-223.

36. (a) Panke, S.; Wubbolts, M. G.; Schmid, A.; Witholt, B., Production of enantiopure styrene oxide by recombinant Escherichia coli synthesizing a two-component styrene monooxygenase. *Biotechnol Bioeng* **2000,** *69* (1), 91-100; (b) Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. G.; Witholt, B.; Schmid, A., Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant Escherichia coli synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnol Bioeng* **2002,** *80* (1), 33-41; (c) Buhler, B.; Bollhalder, I.; Hauer, B.; Witholt, B.; Schmid, A., Chemical biotechnology for the specific oxyfunctionalization of hydrocarbons on a technical scale. *Biotechnol Bioeng* **2003,** *82* (7), 833-842; (d) Hollmann, F.; Lin, P. C.; Witholt, B.; Schmid, A., Stereospecific biocatalytic epoxidation: The first example of direct regeneration of a FAD-dependent monooxygenase for catalysis. *J Am Chem Soc* **2003,** *125* (27), 8209-8217; (e) Hofstetter, K.; Lutz, J.; Lang, I.; Witholt, B.; Schmid, A., Coupling of biocatalytic asymmetric epoxidation with NADH regeneration in organic-aqueous emulsions. *Angew Chem Int Edit* **2004,** *43* (16), 2163-2166; (f) Park, J. B.; Buehler, B.; Habicher, T.; Hauer, B.; Panke, S.; Witholt, B.; Schmid, A., The efficiency of recombinant Escherichia coli as biocatalyst for stereospecific epoxidation. *Biotechnol Bioeng* **2006,** *95* (3), 501-512.

37. Kieslich, K., Biotransformations of inustrial use. *Acta Biotechnol* **1991,** *11* (6), 559-570.

38. Baldwin, C. V. F.; Wohlgemuth, R.; Woodley, J. M., The First 200-L Scale Asymmetric Baeyer-Villiger Oxidation Using a Whole-Cell Biocatalyst. *Org Process Res Dev* **2008,** *12* (4), 660-665.

39. Blank, L. M.; Ebert, B. E.; Buehler, K.; Buhler, B., Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis. *Antioxid Redox Sign* **2010,** *13* (3), 349-394.

40. Bollinger Jr, J. M.; Broderick, J. B., Frontiers in enzymatic C-H-bond activation. *Curr Opin Chem Biol* **2009,** *13* (1), 51-57.

41. (a) Bühler, B.; Schmid, A., Process implementation aspects for biocatalytic hydrocarbon oxyfunctionalization. *J Biotechnol* **2004,** *113* (1-3), 183-210; (b) Julsing, M. K.; Cornelissen, S.; Bühler, B.; Schmid, A., Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr Opin Chem Biol* **2008,** *12* (2), 177-186.

42. (a) Urlacher, V. B.; Schmid, R. D., Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. *Curr Opin Chem Biol* **2006,** *10* (2), 156-161; (b) Park, J. B., Oxygenase-based whole-cell biocatalysis in organic synthesis. *J Microbiol Biotechn* **2007,** *17* (3), 379-392; (c) Leak, D. J.; Sheldon, R. A.; Woodley, J. M.; Adlercreutz, P., Biocatalysts for selective introduction of oxygen. *Biocatal. Biotransform.* **2009,** *27* (1), 1-26.

43. Pellissier, H. L.; Santelli, M., Chemical and biochemical hydroxylations of steroids. A review. *Org. Prep. Proced. Int.* **2001,** *33* (1), 1-58.

44. Mihovilovic, M. D., Enzyme Mediated Baeyer-Villiger Oxidations. *Curr Org Chem* **2006,** *10* (11), 1265-1287.

45. (a) Nuñez, M. C.; García-Rubiño, M. E.; Conejo-García, A.; Cruz-López, O.; Kimatrai, M.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M., Homochiral Drugs: A Demanding Tendency of the Pharmaceutical Industry. *Curr Med Chem* **2009,** *16* (16), 2064-2074; (b) Davies, I. W.; Welch, C. J., Looking Forward in Pharmaceutical Process Chemistry. *Science* **2009,** *325* (5941), 701-704.

46. Blaser, H.-U.; Pugin, B.; Spindler, F., Progress in enantioselective catalysis assessed from an industrial point of view. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2005,** *231* (1-2), 1-20.

47. Sheldon, R. A., Atom utilisation, E factors and the catalytic solution. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* **2000,** *3* (7), 541-551.

48. Hiroaki, Y., Carbonyl Reductase. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.*, Flickinger, M. C., Ed. John Wiley and sons, Inc.: 2010.

49. Noyori, R., Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture). *Angew Chem Int Edit* **2002,** *41* (12), 2008-2022.

50. (a) Ma, J.-A.; Cahard, D., Towards Perfect Catalytic Asymmetric Synthesis: Dual Activation of the Electrophile and the Nucleophile. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004,** *43* (35), 4566-4583; (b) Burkhardt, E. R.; Matos, K., Boron Reagents in Process Chemistry: Excellent Tools for Selective Reductions. *Chem Rev* **2006,** *106* (7), 2617-2650.

51. (a) Anastas, P. T., Green chemistry as applied to solvents. In *Clean Solvents - Alternative Media for Chemical Reactions and Processing*, Abraham, M. A.; Moens, L., Eds. 2002; Vol. 819, pp 1-9; (b)

Anastas, P. T., Perspective on Green Chemistry: The most challenging synthetic transformation. *Tetrahedron* **2010,** *66* (5), 1026-1027.

52. Nakamura, K.; Matsuda, T., Biocatalytic reduction of carbonyl groups. *Curr Org Chem* **2006,** *10* (11), 1217-1246.

53. (a) Pollard, D. J.; Woodley, J. M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol* **2007,** *25* (2), 66-73; (b) De Wildeman, S. M. A.; Sonke, T.; Schoemaker, H. E.; May, O., Biocatalytic reductions: From lab curiosity to "first choice". *Accounts Chem. Res.* **2007,** *40* (12), 1260-1266; (c) Huisman, G. W.; Liang, J.; Krebber, A., Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Curr Opin Chem Biol* **2010,** *14* (2), 122-129.

54. (a) Chartrain, M.; Greasham, R.; Moore, J.; Reider, P.; Robinson, D.; Buckland, B., Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001,** *11* (4-6), 503-512; (b) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*. 2nd ed.; John Wiley and sons, Inc. Verlag GmbH & Co, kGaA.: Weinheim, 2006.

55. Moss, G. NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biotechnology and Molecular Biology. http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/.

56. (a) Oppermann, U.; Filling, C.; Hult, M.; Shafqat, N.; Wu, X.; Lindh, M.; Shafqat, J.; Nordling, E.; Kallberg, Y.; Persson, B.; Jörnvall, H., Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem-Biol Interact* **2003,** *143-144*, 247-253; (b) Persson, B.; Kallberg, Y.; Bray, J. E.; Bruford, E.; Dellaporta, S. L.; Favia, A. D.; Duarte, R. G.; Jornvall, H.; Kavanagh, K. L.; Kedishvili, N.; Kisiela, M.; Maser, E.; Mindnich, R.; Orchard, S.; Penning, T. M.; Thornton, J. M.; Adamski, J.; Oppermann, U., The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact* **2009,** *178* (1-3), 94-8.

57. Rao, S. T.; Rossmann, M. G., Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol* **1973,** *76* (2), 241-250.

58. Gani, O. A. B. S. M.; Adekoya, O. A.; Giurato, L.; Spyrakis, F.; Cozzini, P.; Guccione, S.; Winberg, J.-O.; Sylte, I., Theoretical Calculations of the Catalytic Triad in Short-Chain Alcohol Dehydrogenases/Reductases. *Biophysical Journal* **2008,** *94* (4), 1412-1427.

59. (a) Kallberg, Y.; Oppermann, U.; Jornvall, H.; Persson, B., Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) - Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur. J. Biochem.* **2002,** *269* (18), 4409-4417; (b) Persson, B.; Kallberg, Y.; Oppermann, U.; Jörnvall, H., Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem-Biol Interact* **2003,** *143-144*, 271-278; (c) Persson, B.; Hedlund, J.; Jörnvall, H., Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* **2008,** *65* (24), 3879-3894.

60. (a) Jornvall, H.; Hoog, J. O.; Persson, B., SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett* **1999,** *445* (2-3), 261-4; (b) Jornvall, H.; Shafqat, J.; Persson, B., Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes - Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem-Biol Interact* **2001,** *130* (1-3), 491-498.

61. Riveros-Rosas, H.; Julian-Sanchez, A.; Villalobos-Molina, R.; Pardo, J. P.; Pina, E., Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Eur. J. Biochem.* **2003,** *270* (16), 3309-3334.

62. (a) Jez, J. M.; Flynn, T. G.; Penning, T. M., A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* **1997,** *54* (6), 639-47; (b) Jez, J. M.; Bennett, M. J.; Schlegel, B. P.; Lewis, M.; Penning, T. M., Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* **1997,** *326 (Pt 3)*, 625-36; (c) Penning, T. M.; Drury, J. E., Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys* **2007,** *464* (2), 241-250.

63. Verduyn, C.; Vankleef, R.; Frank, J.; Schreuder, H.; Vandijken, J. P.; Scheffers, W. A., Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem J* **1985,** *226* (3), 669-677.

64. Hyndman, D.; Penning, T. M.; Jin, Y.; Drury, J.; Mindnich, R.; Spitzer, S. H.; Peña, A. AKR Suprefamiliy. http://www.med.upenn.edu/akr/.

65. Wierenga, R. K., The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *Febs Lett* **2001,** *492* (3), 193-198.

66. Stuermer, R.; Hauer, B.; Hall, M.; Faber, K., Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Curr Opin Chem Biol* **2007,** *11* (2), 203-213.

67. Kataoka, M.; Kita, K.; Wada, M.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Shimizu, S., Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biot* **2003,** *62* (5), 437-445.

68. (a) Gröger, H.; Borchert, S.; Krauber, M.; Hummel, W., Enzyme-catalyzed asymmetric reduction of ketones. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.*, Flickinger, M. C., Ed. John Wiley and sons, Inc.: 2010; (b) Goldberg, K.; Schroer, K.; Lutz, S.; Liese, A., Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biot* **2007,** *76* (2), 237-248.

69. Drauz, K.; Waldmann, H., *Enzyme catalysis in organic synthesis*. 2nd ed.; Wiley-VCH: 2002.

70. Moore, J. C.; Pollard, D. J.; Kosjek, B.; Devine, P. N., Advances in the enzymatic reduction of ketones. *Accounts Chem. Res.* **2007,** *40* (12), 1412-1419.

71. (a) Klinman, J. P., Probes of mechanism and transition-state structure in the alcohol dehydrogenase reaction. *CRC Crit Rev Biochem* **1981,** *10* (1), 39-78; (b) Leskovac, V.; Trivic, S.; Pericin, D., The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res* **2002,** *2* (4), 481-94; (c) Smidt, O. d.; Preez, J. C. d.; Albertyn, J., The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *Fems Yeast Res* **2008,** *8* (7), 967-978.

72. (a) Ryzewski, C. N.; Pietruszko, R., Kinetic mechanism of horse liver alcohol dehydrogenase SS. *Biochemistry-Us* **1980,** *19* (21), 4843-8; (b) Eklund, H.; Plapp, B. V.; Samama, J. P.; Branden, C. I., Binding of substrate in a ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* **1982,** *257* (23), 14349-58; (c) Cedergren-Zeppezauer, E., Crystal-structure determination of reduced nicotinamide adenine dinucleotide complex with horse liver alcohol dehydrogenase maintained in its apo conformation by zinc-bound imidazole. *Biochemistry-Us* **1983,** *22* (25), 5761-72; (d) Dahl, K. H.; Eklund, H.; McKinley-McKee, J. S., Enantioselective affinity labelling of horse liver alcohol dehydrogenase. Correlation of inactivation kinetics with the three-dimensional structure of the enzyme. *Biochem J* **1983,** *211* (2), 391-6; (e) Eklund, H., Structural studies of horse liver alcohol dehydrogenase: coenzyme, substrate and inhibitor binding. *Pharmacol Biochem Behav* **1983,** *18 Suppl 1*, 73-81; (f) Foucaud, B.; Biellmann, J. F., Properties of horse liver alcohol dehydrogenase modified by the affinity label 3-chloroacetylpyridine-adenine dinucleotide. *Biochim Biophys Acta* **1983,** *748* (3), 362-6; (g) Jones, J. B., An illustrative example of a synthetically useful enzyme: horse liver alcohol dehydrogenase. *Ciba Found Symp* **1985,** *111*, 3-21; (h) Eklund, H., Coenzyme binding in alcohol dehydrogenase. *Biochem Soc Trans* **1989,** *17* (2), 293-6; (i) Plapp, B. V., Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* **2010,** *493* (1), 3-12; (j) Eklund, H.; Ramaswamy, S., Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* **2008,** *65* (24), 3907-3917.

73. (a) Olofsson, L.; Nicholls, I. A.; Wikman, S., TBADH activity in water-miscible organic solvents: correlations between enzyme performance, enantioselectivity and protein structure through spectroscopic studies. *Org Biomol Chem* **2005,** *3* (5), 750-755; (b) Jonsson, A.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B., Thermodynamic and kinetic aspects on water vs. organic solvent as reaction media in the enzyme-catalysed reduction of ketones. *Bba-Protein Struct M* **1999,** *1430* (2), 313-322; (c) Peretz, M.; Bogin, O.; TelOr, S.; Cohen, A.; Li, G. S.; Chen, J. S.; Burstein, Y., Molecular cloning, nucleotide sequencing, and expression of genes encoding alcohol dehydrogenases from the thermophile Thermoanaerobacter brockii and the mesophile Clostridium beijerinckii. *Anaerobe* **1997,** *3* (4), 259-270; (d) Ford, J. B.; Askins, K. J.; Taylor, K. B., Kinetic-Models for Synthesis by a Thermophilic Alcohol-Dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng* **1993,** *42* (3), 367-375; (e) Peretz, M.; Burstein, Y., Amino acid sequence of alcohol dehydrogenase from the thermophilic bacterium Thermoanaerobium brockii. *Biochemistry-Us* **1989,** *28* (16), 6549-55.

74. Hoffmann, F.; Maser, E., Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the shortchain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab. Rev.* **2007,** *39* (1), 87-144.

75. (a) Zhang, R. Z.; Xu, Y.; Sun, Y.; Zhang, W. C.; Xiao, R., Ser67Asp and His68Asp Substitutions in Candida parapsilosis Carbonyl Reductase Alter the Coenzyme Specificity and Enantioselectivity of Ketone Reduction. *Appl Environ Microb* **2009,** *75* (7), 2176-2183; (b) Zhang, R. Z.; Zhu, G. Y.; Zhang, W. C.; Cao, S.; Ou, X. J.; Li, X. M.; Bartlam, M.; Xu, Y.; Zhang, X. C.; Rao, Z. H., Crystal structure of a carbonyl reductase from Candida parapsilosis with anti-Prelog stereospecificity. *Protein Sci* **2008,** *17* (8), 1412-1423; (c) Nie, Y.; Xu, Y.; Mu, X. Q.; Wang, H. Y.; Yang, M.; Xiao, R., Purification, characterization, gene cloning, and expression of a novel alcohol dehydrogenase with anti-prelog stereospecificity from Candida parapsilosis. *Appl Environ Microb* **2007,** *73* (11), 3759-3764; (d) Yamamoto, H.; Kawada, K.; Matsuyama, A.; Kobayashi, Y., Cloning and expression in Escherichia coli of a gene coding for a secondary alcohol dehydrogenase from Candida parapsilosis. *Biosci Biotech Bioch* **1999,** *63* (6), 1051-1055; (e) Peters, J.; Minuth, T.; Kula, M. R., A Novel Nadh-Dependent Carbonyl Reductase with an Extremely Broad Substrate Range from Candida-Parapsilosis - Purification and Characterization. *Enzyme Microb Tech* **1993,** *15* (11), 950-958.

76. (a) Jaeger, E., Purification of coniferyl alcohol-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis Methods Enzymol.* **1988,** *161*, 301-306; (b) Ludwig, B.; Akundi, A.; Kendall, K., A long-chain secondary alcohol-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* ATCC-4277. *Appl Environ Microb* **1995,** *61* (10), 3729-3733; (c) Nagy, I.; De Mot, R., Sequence analysis of the oxidase/reductase genes upstream of the Rhodococcus erythropolis aldehyde dehydrogenase gene thcA reveals a gene organisation different from Mycobacterium tuberculosis. *DNA Sequence* **1999,** *10* (1), 61-66; (d) Schenkels, P.; Duine, J. A., Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from Rhodococcus erythropolis DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of a broad spectrum of alcohols and the interconversion of alcohols and aldehydes. *Microbiol-Sgm* **2000,** *146*, 775-785; (e) Abokitse, K.; Hummel, W., Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from Rhodococcus erythropolis DSM 43297. *Appl Microbiol Biot* **2003,** *62* (4), 380-386.

77. (a) Bradshaw, C. W.; Hummel, W.; Wong, C. H., *Lactobacillus kefir* alcohol-dehydrogenase - a useful catalyst for synthesis. *J Org Chem* **1992,** *57* (5), 1532-1536; (b) Bradshaw, C. W.; Wong, C. Hydride ion transfer to or from pro-R face of NADPH or NADP|is catalysed by Lactobacillus kefir alcohol dehydrogenase used to prepare labelled NADPH or alcohol. US5342767-A, 1994; (c) Chen, Q.; Hu, Y.; Zhao, W.; Zhu, C.; Zhu, B., Cloning, Expression, and Characterization of a Novel (S)-Specific Alcohol Dehydrogenase from Lactobacillus kefir. *Appl Biochem Biotech* **2010,** *160* (1), 19-29; (d) Weckbecker, A.; Hummel, W., Cloning, expression, and characterization of an (R)-specific alcohol dehydrogenase from Lactobacillus kefir. *Biocatal. Biotransform.* **2006,** *24* (5), 380-389.

78. (a) Riermeier, T.; Bornscheuer, U.; Altenbuchner, J.; Hildebrandt, P. Selective sec. S-alcohol prodn. from ketone. EP1241263-A; EP1241263-A1; JP2002306189-A; DE10112401-A1; US2003171544-A1, 2003; (b) Prodn. of NAD plus dependent alcohol dehydrogenase|by culturing Pseudomonas sp. microorganisms, used in prodn. of aldehyde(s). JP7313153-A, 1996; (c) Britt, A. J.; Bruce, N. C.; Lowe, C. R., Purification and characterisation of an NAD(+)-dependent secondary

alcohol dehydrogenase from Pseudomonas maltophilia MB11L. *FEMS Microbiol Lett* **1992,** *72* (1), 49-55.

79. (a) Besse, P.; Bolte, J.; Fauve, A.; Veschambre, H., Bakers-Yeast Reduction of Alpha-Diketones - Investigation and Control of the Enzymatic Pathway. *Bioorg Chem* **1993,** *21* (3), 342-353; (b) Matsuda, T.; Harada, T.; Nakajima, N.; Nakamura, K., Mechanism for improving stereoselectivity for asymmetric reduction using acetone powder of microorganism. *Tetrahedron Lett* **2000,** *41* (21), 4135-4138; (c) Matsuda, T.; Harada, T.; Nakajima, N.; Itoh, T.; Nakamura, K., Two classes of enzymes of opposite stereochemistry in an organism: One for fluorinated and another for nonfluorinated substrates. *J Org Chem* **2000,** *65* (1), 157-163.

80. Presecki, A. V.; Findrik, Z.; Zelic, B., Modeling of the biotransformation processes. *Chem Biochem Eng Q* **2006,** *20* (3), 227-241.

81. (a) Martinez, F.; Del Campo, C.; Sinisterra, J. V.; Llama, E. F., Preparation of halohydrin beta-blocker precursors using yeast-catalysed reduction. *Tetrahedron-Asymmetr* **2000,** *11* (23), 4651-4660; (b) Soni, P.; Banerjee, U. C., Biotransformations for the production of the chiral drug (S)-Duloxetine catalyzed by a novel isolate of Candida tropicalis. *Appl Microbiol Biot* **2005,** *67* (6), 771-777; (c) Ernst, M.; Kaup, B.; Muller, M.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H., Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. *Appl Microbiol Biot* **2005,** *66* (6), 629-634; (d) Heuser, F.; Schroer, K.; Lutz, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H., Enhancement of the NAD(P)(H) pool in Escherichia coli for biotransformation. *Eng Life Sci* **2007,** *7* (4), 343-353; (e) Marques, M. P. C.; Carvalho, F.; Magalhaes, S.; Cabral, J. M. S.; Fernandes, P., Screening for suitable solvents as substrate carriers for the microbial side-chain cleavage of sitosterol using microtitre plates. *Process Biochem* **2009,** *44* (5), 556-561; (f) Nie, Y.; Xu, Y.; Hu, Q. S.; Xiao, R., A New Strategy to Improve the Efficiency and Sustainability of Candida parapsilosis Catalyzing Deracemization of (R,S)-1-Phenyl-1,2-Ethanediol Under Non-Growing Conditions: Increase of NADPH Availability. *J Microbiol Biotechnol* **2009,** *19* (1), 65-71.

82. (a) Barbieri, C.; Caruso, E.; D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S., Chemo-enzymatic synthesis of (R)- and (S)-3,4-dichlorophenylbutanolide intermediate in the synthesis of sertraline. *Tetrahedron-Asymmetr* **1999,** *10* (20), 3931-3937; (b) Kaluzna, I.; Andrew, A. A.; Bonilla, M.; Martzen, M. R.; Stewart, J. D., Enantioselective reductions of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate by Saccharomyces cerevisiae dehydrogenases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002,** *17* (2), 101-105; (c) Rodriguez, J. D. C.; Garcia-Burgos, C.; Alvarez, M. A. Q.; Ruiz, E. A.; Gago, J. V. S., Willippsis californica, Willippsis saturnus, and Pachysolen tannophilus: Novel microorganisms for stereoselective oxidation of secondary alcohols. *Biotechnol Bioeng* **2004,** *87* (5), 632-640.

83. Zhang, W.; O'Connor, K.; Wang, D. I. C.; Li, Z., Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **2009,** *75* (3), 687-94.

84. Hoyos, P.; Sansottera, G.; Fernández, M.; Molinari, F.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R., Enantioselective monoreduction of different 1,2-diaryl-1,2-diketones catalysed by lyophilised whole cells from *Pichia glucozyma*. *Tetrahedron* **2008,** *64* (34), 7929-7936.

85. Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U., Catalytic reductions. In *Green Chemistry and Catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2007; pp 91-131.

86. (a) Prelog, V., Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure Appl Chem* **1964,** *9* (1), 119-130; (b) Prelog, V., Chirality in chemistry - Nobel Lecture (Reprinted from Croatica Chemica Acta, 1975). *Croat Chem Acta* **2006,** *79* (3), XLIX-LVII.

87. Parachin, N. S.; Carlquist, M.; Gorwa-Grauslund, M. F., Bioreduction. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.*, Flickinger, M. C., Ed. John Wiley and sons, Inc.: 2010.

88. (a) Berenguer-Murcia, A.; Fernandez-Lafuente, R., New Trends in the Recycling of NAD(P)H for the Design of Sustainable Asymmetric Reductions Catalyzed by Dehydrogenases. *Curr Org Chem* **2010,** *14*, 1000-1021; (b) Hussain, W.; Pollard, D. J.; Truppo, M.; Lye, G. J., Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents. *J Mol Catal B-Enzym* **2008,** *55* (1-2), 19-29; (c) Wichmann, R.; Vasic-Racki, D., Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv Biochem Eng Biot* **2005,** *92*, 225-260; (d) Adlercreutz, P., Cofactor regeneration in biocatalysis in organic media. *Biocatal. Biotransform.* **1996,** *14* (1), 1-30.

89. (a) Goldberg, K.; Edegger, K.; Kroutil, W.; Liese, A., Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnol Bioeng* **2006,** *95* (1), 192-198; (b) Schroer, K.; Tacha, E.; Lutz, S., Process intensification for substrate-coupled whole cell ketone reduction by in situ acetone removal. *Org Process Res Dev* **2007,** *11* (5), 836-841; (c) Lavandera, I.; Holler, B.; Kern, A.; Ellmer, U.; Glieder, A.; de Wildeman, S.; Kroutil, W., Asymmetric anti-Prelog reduction of ketones catalysed by Paracoccus pantotrophus and Comamonas sp cells via hydrogen transfer. *Tetrahedron-Asymmetr* **2008,** *19* (16), 1954-1958; (d) Lavandera, I.; Kern, A.; Ferreira-Silva, B.; Glieder, A.; de Wildeman, S.; Kroutil, W., Stereoselective bioreduction of bulky-bulky ketones by a novel ADH from *Ralstonia sp*. *J Org Chem* **2008,** *73* (15), 6003-6005; (e) Wallner, S. R.; Lavandera, I.; Mayer, S. F.; Öhrlein, R.; Hafner, A.; Edegger, K.; Faber, K.; Kroutil, W., Stereoselective anti-Prelog reduction of ketones by whole cells of *Comamonas testosteroni* in a `substrate-coupled' approach. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2008,** *55* (3-4), 126-129.

90. Wandrey, C., Biochemical reaction engineering for redox reactions. *Chem Rec* **2004,** *4* (4), 254-265.

91. Tishkov, V. I.; Popov, V. O., Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol. Eng* **2006,** *23* (2-3), 89-110.

92. (a) Blank, L. M.; Ebert, B. E.; Buhler, B.; Schmid, A., Metabolic capacity estimation of Escherichia coli as a platform for redox biocatalysis: Constraint-based modeling and experimental verification.

Biotechnol Bioeng **2008,** *100* (6), 1050-1065; (b) Schroer, K.; Mackfeld, U.; Tana, I. A. W.; Wandrey, C.; Heuser, F.; Bringer-Meyer, S.; Weckbecker, A.; Hummel, W.; Daussmann, T.; Pfaller, R.; Liese, A.; Lutz, S., Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant Escherichia coli. *J Biotechnol* **2007,** *132* (4), 438-444; (c) Goldberg, K.; Schroer, K.; Lutz, S.; Liese, A., Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part II: whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biot* **2007,** *76* (2), 249-255.

93. (a) Vrtis, J. M.; White, A. K.; Metcalf, W. W.; Donk, W. A. v. d., Phosphite Dehydrogenase: A Versatile Cofactor-Regeneration Enzyme. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002,** *41* (17), 3257-3259; (b) Relyea, H. A.; van der Donk, W. A., Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase. *Bioorg Chem* **2005,** *33* (3), 171-189; (c) Johannes, T. W.; Woodyer, R. D.; Zhao, H., Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng* **2007,** *96* (1), 18-26.

94. Wong, C. H.; Whitesides, G. M., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. Pergamon: Trowbridge, 1994.

95. Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T., Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003,** *14* (18), 2659-2681.

96. Gupta, A. K.; Tschentscher, A.; Bobkova, M. 2-butanol production method. US7371903, 2008.

97. (a) Kometani, T.; Yoshii, H.; Kitatsuji, E.; Nishimura, H.; Matsuno, R., Large-scale preparation of (*S*)-ethyl 3-hydroxybutanoate with a high enantiomeric excess through bakers yeast-mediated bioreduction *J Ferment Bioeng* **1993,** *76* (1), 33-37; (b) Kometani, T.; Yoshii, H.; Matsuno, R., Large-scale production of chiral alcohols with bakers' yeast. *J Mol Catal B-Enzym* **1996,** *1* (2), 45-52.

98. Itoh, N.; Nakamura, M.; Inoue, K.; Makino, Y., Continuous production of chiral 1,3-butanediol using immobilized biocatalysts in a packed bed reactor: promising biocatalysis method with an asymmetric hydrogen-transfer bioreduction. *Appl Microbiol Biot* **2007,** *75* (6), 1249-1256.

99. Patel, R. N.; Chu, L.; Mueller, R., Diastereoselective microbial reduction of (S)-[3-chloro-2-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]carbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003,** *14* (20), 3105-3109.

100. Anderson, B. A.; Hansen, M. M.; Harkness, A. R.; Henry, C. L.; Vicenzi, J. T.; Zmijewski, M. J., Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5h-2,3-Benzodiazepine Ly300164. *J Am Chem Soc* **1995,** *117* (49), 12358-12359.

101. (a) Haberland, J. r.; Hummel, W.; Daussmann, T.; Liese, A., New Continuous Production Process for Enantiopure (2R,5R)-Hexanediol. *Org Process Res Dev* **2002,** *6* (4), 458-462; (b) Haberland, J.; Kriegesmann, A.; Wolfram, E.; Hummel, W.; Liese, A., Diastereoselective synthesis of optically active (2R,5R)-hexanediol. *Appl Microbiol Biot* **2002,** *58* (5), 595-599; (c) Hilterhaus, L.; Liese, A., Building blocks. In *White Biotechnology*, 2007; Vol. 105, pp 133-173; (d) Tan, A. W. I.; Fischbach, M.; Huebner, H.; Buchholz, R.; Hummel, W.; Daussmann, T.; Wandrey, C.; Liese, A., Synthesis of enantiopure (5

R)-hydroxyhexane-2-one with immobilised whole cells of Lactobacillus kefiri. *Applied Microbiology & Biotechnology* **2006,** *71* (3), 289-293; (e) Katzberg, M.; Wechler, K.; Muller, M.; Dunkelmann, P.; Stohrer, J.; Hummel, W.; Bertau, M., Biocatalytical production of (5S)-hydroxy-2-hexanone. *Org Biomol Chem* **2009,** *7* (2), 304-314.

102. Pollard, D.; Truppo, M.; Pollard, J.; Chen, C. Y.; Moore, J., Effective synthesis of (S)-3,5-bistrifluoromethylphenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006,** *17* (4), 554-559.

103. Rasor, J. P.; Voss, E., Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General* **2001,** *221* (1-2), 145-158.

104. Kosjek, B.; Nti-Gyabaah, J.; Telari, K.; Dunne, L.; Moore, J. C., Preparative asymmetric synthesis of 4,4-dimethoxytetrahydro-2H-pyran-3-ol with a ketone reductase and in situ cofactor recycling using glucose dehydrogenase. *Org Process Res Dev* **2008,** *12* (4), 584-588.

105. (a) Liang, J.; Jeene, S. J.; Mundorff, E.; Voladri, R.; Lalonde, J.; Huisman, G. Improved ketoreductase polypeptides for the stereoselective production of (R)-3-hydroxythiolane. WO2009029554, 2009; (b) Liang, J.; Mundorff, E.; Voladri, R.; Jenne, S.; Gilson, L.; Conway, A.; Krebber, A.; Wong, J.; Huisman, G.; Truesdell, S.; Lalonde, J., Highly Enantioselective Reduction of a Small Heterocyclic Ketone: Biocatalytic Reduction of Tetrahydrothiophene-3-one to the Corresponding (R)-Alcohol. *Org Process Res Dev* **2010,** *14* (1), 188-192.

106. Patel, R. N., Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001,** *12* (6), 587-604.

107. Truppo, M. D.; Kim, J.; Brower, M.; Madin, A.; Sturr, M. G.; Moore, J. C., A novel resolution of a pharmaceutically important bridged bicyclic ketone intermediate via selective enzymatic reduction with a commercially available ketoreductase. *J Mol Catal B-Enzym* **2006,** *38* (3-6), 158-162.

108. Friberg, A.; Johanson, T.; Franzen, J.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Frejd, T., Efficient bioreduction of bicyclo[2.2.2]octane-2,5-dione and bicyclo[2.2.2]oct-7-ene-2,5-dione by genetically engineered Saccharomyces cerevisiae. *Org Biomol Chem* **2006,** *4* (11), 2304-2312.

109. Johanson, T.; Carlquist, M.; Olsson, C.; Rudolf, A.; Frejd, T.; Gorwa-Grauslund, M. F., Reaction and strain engineering for improved stereo-selective whole-cell reduction of a bicyclic diketone. *Appl Microbiol Biot* **2008,** *77* (5), 1111-1118.

110. Grau, B. T.; Devine, P. N.; DiMichele, L. N.; Kosjek, B., Chemo- and enantioselective routes to chiral fluorinated hydroxyketones using ketoreductases. *Org Lett* **2007,** *9*, 4951-4954.

111. Shafiee, A.; Motamedi, H.; King, A., Purification, characterization and immobilization of an NADPH-dependent enzyme involved in the chiral specific reduction of the keto ester M, an intermediate in the synthesis of an anti-asthma drug, Montelukast, from Microbacterium campoquemadoensis (MB5614). *Appl Microbiol Biot* **1998,** *49* (6), 709-717.

112. Liang, J.; Lalonde, J.; Borup, B.; Mitchell, V.; Mundorff, E.; Trinh, N.; Kochrekar, D. A.; Cherat, R. N.; Pai, G. G., Development of a Biocatalytic Process as an Alternative to the (-)-DIP-Cl-Mediated Asymmetric Reduction of a Key Intermediate of Montelukast. *Org Process Res Dev* **2010,** *14* (1), 193-198.

113. Chartrain, M.; Roberge, C.; Chung, J.; McNamara, J.; Zhao, D. L.; Olewinski, R.; Hunt, G.; Salmon, P.; Roush, D.; Yamazaki, S.; Wang, T.; Grabowski, E.; Buckland, B.; Greasham, R., Asymmetric bioreduction of (2-(4-nitro-phenyl)-N-(2-oxo-2-pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide) to its corresponding (R) alcohol [(R)-N-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acetamide] by using Candida sorbophila MY 1833. *Enzyme Microb Tech* **1999,** *25* (6), 489-496.

114. Homann, M. J.; Previte, E. Stereoselective microbial reduction of 5-fluorophenyl-5-oxo-pentanoic acid and a phenyloxazolidinone condensation product thereof US 5618707, 1997.

115. Truppo, M. D.; Pollard, D.; Devine, P., Enzyme-catalyzed enantioselective diaryl ketone reductions. *Org Lett* **2007,** *9*, 335-338.

116. Chartrain, M.; Lynch, J.; Choi, W. B.; Churchill, H.; Patel, S.; Yamazaki, S.; Volante, R.; Greasham, R., Asymmetric bioreduction of a bisaryl ketone to its corresponding (S)-bisaryl alcohol, by the yeast Rhodotorula pilimanae ATCC 32762. *J Mol Catal B-Enzym* **2000,** *8* (4-6), 285-288.

117. (a) Schmidt, E.; Ghisalba, O.; Gygax, D.; Sedelmeier, G., Optimization of a process for the production of (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid - an intermediate for inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J Biotechnol* **1992,** *24* (3), 315-327; (b) Schmidt, E.; Blaser, H. U.; Fauquex, P. F.; Sedelmeier, G.; Spindler, F., Comparison of chemical and biochemical reduction methods for the synthesis of (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid. *Microbial Reagents in Organic Synthesis* **1992,** *381*, 377-388; (c) Ghisalba, O.; Gygax, D.; Lattmann, R.; Schar, H. P.; Schmidt, E.; Sedelmeier, G.; Schaer, H. Optically active alpha-hydroxy-carboxylic acid prepn. from racemate|by stereospecific redn. of 2-oxo-4-phenyl-butyric acid with lactate dehydrogenase enzyme. EP347374-A1; PT90747-A; DK8902712-A; FI8902702-A; JP2039893-A; US5098841-A; IL90527-A; EP347374-B1; DE58906409-G; ES2059817-T3; IE63497-B; CA1336081-C; FI95047-B; JP2873236-B2; DK172667-B; KR165102-B1, 1989.

118. Patel, R. N.; Chu, L.; Chidambaram, R.; Zhu, J.; Kant, J., Enantioselective microbial reduction of 2-oxo-2-(1 ', 2 ',3 ',4 '-tetrahydro-1 ',1 ',4 ',4 '-tetramethyl-6 '-naphthalenyl) acetic acid and its ethyl ester. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002,** *13* (4), 349-355.

119. (a) Tao, J. H.; McGee, K., Development of a continuous enzymatic process for the preparation of (R)-3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxy propionic acid. *Org Process Res Dev* **2002,** *6* (4), 520-524; (b) Tao, J. H.; McGee, K., Continuous enzymatic process for a practical synthesis of (R)-3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxypropionic acid. *Abstr Pap Am Chem S* **2001,** *221*, 326-ORGN.

120. Walton, A. Z.; Stewart, J. D., Understanding and Improving NADPH-Dependent Reactions by Nongrowing Escherichia coli Cells. *Biotechnol Progr* **2004,** *20* (2), 403-411.

121. Schroer, K.; Mackfeld, U.; Tan, I. A. W.; Wandrey, C.; Heuser, F.; Bringer-Meyer, S.; Weckbecker, A.; Hummel, W.; Daußmann, T.; Pfaller, R.; Liese, A.; Lütz, S., Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant Escherichia coli. *J Biotechnol* **2007,** *132* (4), 438-444.

122. Kaluzna, I. A.; Feske, B. D.; Wittayanan, W.; Ghiviriga, I.; Stewart, J. D., Stereoselective, biocatalytic reductions of α-chloro-β-keto esters. *J Org Chem* **2005,** *70* (1), 342-345.

123. Kizaki, N.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Wada, M.; Kataoka, M.; Shimizu, S., Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by Escherichia coli transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biot* **2001,** *55* (5), 590-595.

124. Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A., A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem* **2010,** *12* (1), 81-86.

125. (a) Patel, R. N., Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. In *Advances in Applied Microbiology, Vol 43*, 1997; Vol. 43, pp 91-140; (b) Patel, R. N.; McNamee, C. G.; Banerjee, A.; Howell, J. M.; Robison, R. S.; Szarka, L. J., Stereoselective reduction of β-keto-esters by *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb Tech* **1992,** *14* (9), 731-738.

126. Shaw, N.; Robins, K.; Kiener, A., Lonza: 20 Years of Biotransformations. *Adv Synth Catal* **2003,** *345* (4), 425-435.

127. (a) Chartrain, M.; Armstrong, J.; Katz, L.; Keller, J.; Mathre, D.; Greasham, R., Asymmetric bioreduction of a [beta]-ketoester to (R)-[beta]-hydroxyester by the fungus Mortierella alpina MF 5534. *J Ferment Bioeng* **1995,** *80* (2), 176-179; (b) Zaks, A.; Dodds, D. R., Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discov Today* **1997,** *2* (12), 513-531.

128. Borup, B.; Campapiano, O.; Mundorff, E.; Voladri, R.; Campopiano, O. New ketoreductase polypeptide capable of converting methyl-2-benzamidomethyl-3-oxobutyrate as substrate, to product 2S,3R-methyl-2-benzamidomethyl-3-hydroxybutyrate, with specific percent stereomeric excess. WO2009046153-A1; US2009162909-A1; WO2009046153-A4; KR2010065387-A; EP2205727-A1; IN201002450-P4, WO2009046153-A1 09 Apr 2009 C12N-009/04 200929.

129. Nanduri, V. B.; Hanson, R. L.; Goswami, A.; Wasylyk, J. M.; LaPorte, T. L.; Katipally, K.; Chung, H. J.; Patel, R. N., Biochemical approaches to the synthesis of ethyl 5-(S)-hydroxyhexanoate and 5-(S)-hydroxyhexanenitrile. *Enzyme Microb Tech* **2001,** *28* (7-8), 632-636.

130. (a) Patel, R. N.; McNamee, C. G.; Banerjee, A.; Szarka, L. J. 3,5-Dioxo ester stereospecific microbiological redn. for enantiomeric intermediates - by treating diketo ester with reductase supplying microorganism, for cholesterol lowering agent, esp. cpd. with P-fluorophenyl rings using single or two stage fermentation. EP569998-A; EP569998-A2; CA2094191-A; JP6030783-A; US5324662-A; EP569998-A3; EP569998-B1; DE69329719-E; ES2152234-T3; CA2094191-C; JP3476860-B2,

EP569998-A EP569998-A2 18 Nov 1993 C12P-007/62 199346; (b) Patel, R. N.; Banerjee, A.; McNamee, C. G.; Brzozowski, D.; Hanson, R. L.; Szarka, L. J., Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy) hexanoic acid, ethyl-ester. *Enzyme Microb Tech* **1993,** *15* (12), 1014-1021.

131. Machado, L. L.; Souza, J. S. N.; de Mattos, M. C.; Sakata, S. K.; Cordell, G. A.; Lemos, T. L. G., Bioreduction of aldehydes and ketones using Manihot species. *Phytochemistry* **2006,** *67* (15), 1637-1643.

132. Petersson, A.; Almeida, J. R. M.; Modig, T.; Karhumaa, K.; Hahn-Hägerdal, B.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Lidén, G., A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the Saccharomyces cerevisiae ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast* **2006,** *23* (6), 455-464.

133. Gooding, O. W.; Voladri, R.; Bautista, A.; Hopkins, T.; Huisman, G.; Jenne, S.; Ma, S.; Mundorff, E. C.; Savile, M. M.; Truesdell, S. J.; Wong, J. W., Development of a Practical Biocatalytic Process for (R)-2-Methylpentanol. *Org Process Res Dev* **2010,** *14* (1), 119-126.

134. Bougioukou, D. J.; Walton, A. Z.; Stewart, J. D., Towards preparative-scale, biocatalytic alkene reductions. *Chem Commun* **2010,** *46* (45), 8558-8560.

135. Kataoka, M.; Kotaka, A.; Thiwthong, R.; Wada, M.; Nakamori, S.; Shimizu, S., Cloning and overexpression of the old yellow enzyme gene of Candida macedoniensis, and its application to the production of a chiral compound. *J Biotechnol* **2004,** *114* (1-2), 1-9.

136. Meah, Y.; Massey, V., Old Yellow Enzyme: Stepwise reduction of nitro-olefins and catalysis of aci-nitro tautomerization. *P Natl Acad Sci USA* **2000,** *97* (20), 10733-10738.

137. (a) Hanson, R. L.; Schwinden, M. D.; Banerjee, A.; Brzozowski, D. B.; Chen, B. C.; Patel, B. P.; McNamee, C. G.; Kodersha, G. A.; Kronenthal, D. R.; Patel, R. N.; Szarka, L. J., Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine. *Bioorgan Med Chem* **1999,** *7* (10), 2247-2252; (b) Patel, R. N., Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. *Biomol. Eng* **2001,** *17* (6), 167-182.

138. Hanson, R. L.; Shi, Z.; Brzozowski, D. B.; Banerjee, A.; Kissick, T. P.; Singh, J.; Pullockaran, A. J.; North, J. T.; Fan, J.; Howell, J.; Durand, S. C.; Montana, M. A.; Kronenthal, D. R.; Mueller, R. H.; Patel, R. N., Regioselective enzymatic aminoacylation of lobucavir to give an intermediate for lobucavir prodrug. *Bioorgan Med Chem* **2000,** *8* (12), 2681-2687.

139. Schroer, K.; Lutz, S., A Continuously Operated Bimembrane Reactor Process for the Biocatalytic Production of (2R,5R)-Hexanediol. *Org Process Res Dev* **2009,** *13* (6), 1202-1205.

CAPÍTULO VIII

FUNDAMENTOS DE EVOLUCIÓN MOLECULAR DIRIGIDA DE ENZIMAS

MIGUEL ALCALDE

RESUMEN

La evolución molecular dirigida es una poderosa herramienta de ingeniería de proteínas con la capacidad de mejorar características determinadas o de crear nuevas funciones enzimáticas no requeridas en ambientes naturales. En ella, el científico emula en el laboratorio los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) y lo hace de tal manera que es posible diseñar enzimas de gran interés científico y tecnológico. La diversidad genética se recrea mediante mutaciones introducidas de manera aleatoria y/o recombinaciones en el material genético que codifica para las proteínas de interés. Después esta variabilidad génica se expresa y explora en las condiciones en las que se quiere mejorar la enzima. A continuación se escogen las mejores variantes de la generación creada, y se emplean como parentales en un nuevo ciclo de evolución, repitiendo este proceso tantas veces como sea necesario, hasta que se consiga el biocatalizador con las cualidades deseadas: estabilidad a altas temperaturas o en medios no convencionales, mejor eficiencia catalítica, actividad frente a nuevos sustratos, etc.

Este capítulo constituye una revisión general acerca de la metodología de evolución dirigida, comentando el proceso, sus virtudes y debilidades así como las diferentes alternativas en diseño evolutivo.

Palabras clave: Evolución molecular dirigida; High-throughput screening; Hospedador heterólogo; Generación de diversidad.

ABSTRACT

Principles of directed molecular evolution of enzymes

Directed Molecular Evolution is a powerful protein-engineering tool to improve known features or to generate novel enzymatic functions not required in natural environments. The scientist recreates in the laboratory the key events in natural evolution (mutation, DNA-recombination and selection), thereby making it possible to design scientifically interesting and technologically useful enzymes. Diversity is mimicked by random mutagenesis and/or recombination in the gene/s encoding a specific protein/s. Afterwards this genetic diversity is expressed and explored under the conditions in which one wants to improve the enzyme. Thus, the best performers in each generation are selected and further used as the parental types for a new round of evolution. The process is repeated as many times as necessary, until a biocatalyst is obtained with the desired traits: stability at high temperature or in organic solvents; improved catalytic activities; higher specificity; etc.

This chapter constitutes a general overview about the methodology of directed evolution, giving insights in the process, merits and flaws as well as the different possibilities available in evolution design.

Keywords: Directed molecular evolution, High-throughput screening, Heterologous host, Generation of Diversity.

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas han evolucionado durante millones de años adquiriendo diferentes propiedades para desarrollar funciones metabólicas muy específicas en contextos celulares determinados. Estos catalizadores biológicos exhiben un poder catalítico exquisito pudiendo ser altamente quimio-, regio- y estéreo-selectivos y llegando a acelerar las reacciones más complejas muchos ordenes de magnitud (hasta 10^{19} veces) (1). En la mayoría de los organismos, las enzimas están

habituadas a funcionar en unas condiciones de reacción suaves (en soluciones acuosas, temperatura ambiente y pH neutro) lo que lleva asociado un impacto medioambiental muy reducido (2). Sin embargo, para la eficiente aplicación biotecnológica e industrial de los biocatalizadores se requieren enzimas activas y estables bajo las drásticas condiciones del proceso (presencia de disolventes orgánicos u otros medios no acuosos, elevadas temperaturas, pHs extremos, etc.) (3, 4). Lamentablemente, la mayor parte de las enzimas -a excepción de unas pocas procedentes de ambientes extremos (5, 6)- terminan inactivándose o desnaturalizándose bajo las exigentes condiciones industriales.

Durante los últimos 25 años la investigación en el campo de la ingeniería de proteínas se ha visto impulsada por los avances en la tecnología del DNA recombinante, genómica y proteómica, y más recientemente por el desarrollo de herramientas de *high-throughput* (7) que ha multiplicado el diseño, a nivel molecular, de nuevos biocatalizadores y procesos biocatalíticos (8, 9). De esta manera, se han generado múltiples métodos para la creación o mejora de nuevas actividades y propiedades enzimáticas de relevancia biotecnológica al tiempo que se ha aportado luz sobre la relación estructura/función de muchas proteínas (10).

Desafortunadamente, las enzimas son moléculas extremadamente complejas y a menudo la relación entre su secuencia, estructura y mecanismo/función se escapa al conocimiento científico. El enfoque más tradicional en el campo de la ingeniería de enzimas se sustenta en el denominado diseño *"racional"* (mutagénesis dirigida a posiciones concretas del catalizador, en base a modelos o estructuras cristalográficas). Este abordaje, sin embargo, muchas veces se ha visto limitado por la ausencia de información estructural y mecanística requerida (11). A pesar del progreso en la resolución de proteínas por técnicas de cristalografía de rayos X o espectroscopía RMN, así como de la disponibilidad de programas informáticos cada vez más potentes y el apoyo de bases de datos de genes y proteínas (12), el diseño *"racional"* se ve frenado en la práctica por la complejidad de la función proteica. Se debe tener en cuenta que las enzimas son moléculas dinámicas, plásticas, en las cuales la entrada de sustratos y formación de productos siempre va acompañada de cambios locales y/o conformacionales con los correspondientes establecimientos o

rupturas de interacciones que un modelo cristalográfico no puede recoger con exactitud en toda su dimensión. En cierto sentido, un modelo cristalográfico representa con precisión tan sólo un momento determinado de la intrincada cinética enzimática, y a pesar del esfuerzo por obtener modelos más completos en presencia de análogos estructurales y del desarrollo exhaustivo de herramientas de modelado molecular, la predicción de la función catalítica sigue siendo limitada (14, 15).

La estrategia alternativa más adecuada para la ingeniería de enzimas en ausencia de suficiente información estructural es la denominada evolución molecular dirigida o evolución *in vitro* (15, 16). Se trata de una efectiva herramienta que está revolucionando la biotecnología, permitiendo el diseño de nuevas funciones enzimáticas nunca antes requeridas en ambientes naturales (17). Esta metodología recrea en el laboratorio los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) de manera que es posible diseñar enzimas de gran interés científico y tecnológico. Existen, sin embargo, diferencias sustanciales entre el simplificado proceso de evolución dirigida de enzimas y la evolución natural postulada por Darwin y sus contemporáneos (18, 19).

La evolución natural puede tener lugar a niveles extremadamente complejos -de organismos completos- mientras que la evolución dirigida se limita a un único gen, o en el mejor de los casos a rutas metabólicas relativamente simples (20, 21).

En la evolución natural, las adaptaciones más sobresalientes aparecen de manera espontánea durante la reproducción y supervivencia de los organismos, mientras que en la evolución dirigida, la presión selectiva es estrictamente estipulada por el investigador en busca de una mejora en particular (17, 22).

La evolución dirigida comprime la escala temporal de la evolución natural desde miles de millones de años, hasta tan sólo meses de trabajo en el laboratorio (23).

En la evolución *in vitro*, mediante mutagénesis aleatoria y/o recombinaciones en el material genético que codifica para una o varias proteínas, se crea una diversidad genética que posteriormente se expresa y explora bajo las condiciones en las que se quiere mejorar la enzima (altas temperaturas o medios no

convencionales, pHs extremos, etc. (24). De esta manera, sometiendo los genes seleccionados a ciclos sucesivos de evolución artificial, las diferentes mutaciones puntuales beneficiosas se irán acumulando y combinando hasta adquirir la propiedad deseada, que se ve mejorada de manera acumulativa, generación tras generación (Figura 1) (11, 25).

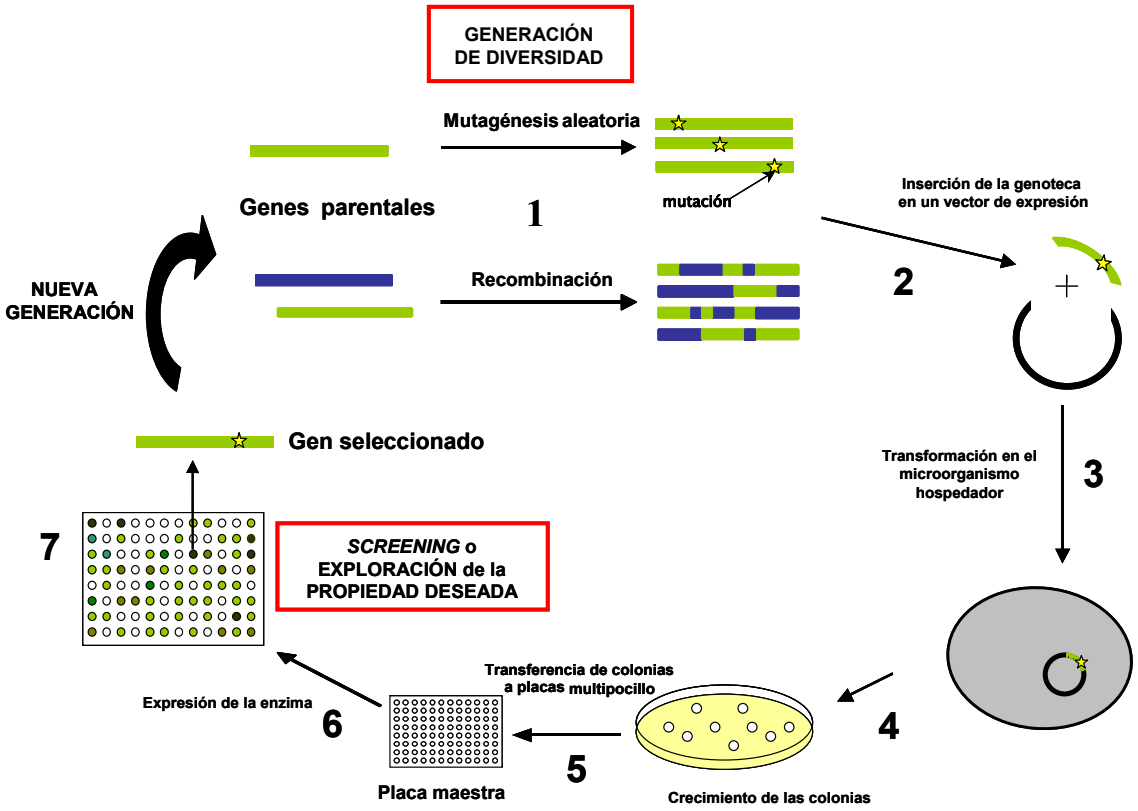


Figura 1.- Esquema general de un clásico experimento de evolución molecular dirigida (13).

Hoy en día, las enzimas mejoradas por evolución de laboratorio son cada vez más abundantes, incluso ya se comercializan muchos productos desarrollados por esta vía. Empresas como Genencor, Dow Chemical, Maxygen, Diversa o Novozymes entre otras tienen líneas punteras de evolución dirigida, al tiempo que el número de artículos científicos sobre esta metodología crece rápidamente (Figura 2) (13, 26).

La mayoría de las características enzimáticas -regioespecificidad (27), enantioespecificidad (28, 29), quimioespecificidad (30), termoestabilidad (31-33), estabilidad en disolventes orgánicos (34, 35), expresión génica (36), incluso la búsqueda de actividades *de novo* en el caso de anticuerpos catalíticos (9) - pueden ser sometidas a experimentos de evolución dirigida.

Los tres requisitos más importantes e indispensables a la hora de desarrollar una estrategia de evolución en el laboratorio son:

Disponer de un organismo hospedador adecuado para la expresión funcional de la enzima a evolucionar (generalmente Escherichia coli o Saccharomyces cerevisiae).

Contar con métodos de generación de diversidad lo suficientemente variados como para abordar de manera eficaz el estudio del vasto espacio de secuencia proteica.

Diseñar un método de screening o exploración robusto y fiable para mejorar la característica enzimática marcada como objetivo evolutivo por el investigador.

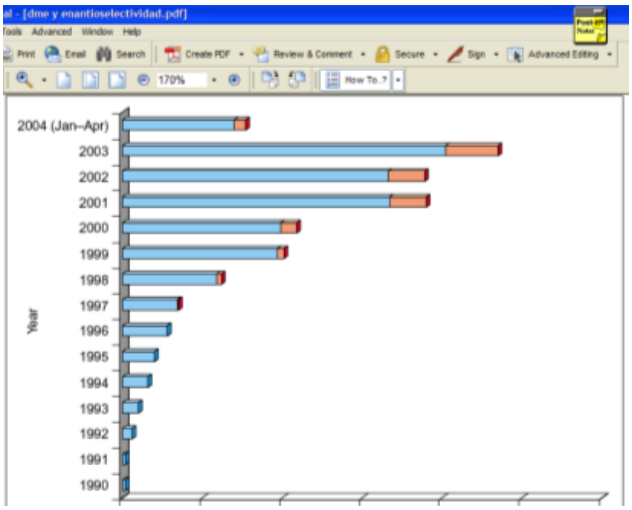


Figura 2-. Número de artículos científicos publicados entre los años 1990 y 2004 sobre evolución dirigida. En naranja, se indica los trabajos en los que se ha mejorado la enantioselectividad mediante evolución in vitro (29).

2. ELECCIÓN DE UN ORGANISMO HOSPEDADOR

La expresión funcional heteróloga de los genes que codifican la proteína de interés es el primer requerimiento para llevar a cabo un experimento de evolución dirigida.

Los organismos hospedadores más utilizados en experimentos de evolución dirigida son *E. coli* y *S. cerevisiae* aunque también hay trabajos en los que se ha empleado *Bacillus subtillis* (37) o como el caso de la evolución de una cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* donde la transformación de las genotecas se realizó en el mismo organismo productor (38). Más recientemente se ha diseñado un sistema basado en la fisiología de *Pichia pastoris*, pero la recuperación de los genes mutados junto con la baja eficiencia de transformación limita su aplicación práctica (39).

En cualquier caso, considerando la eficiencia de transformación, la estabilidad del DNA plasmídico y la tasa de crecimiento, *E. coli* es el organismo hospedador más frecuentemente utilizado. Sin embargo, la expresión bacteriana de genes eucarióticos puede estar limitada por la diferencia entre los sistemas de expresión bacterianos y los nativos. El diferente uso de codones, y las modificaciones post-traduccionales como el procesamiento proteolítico o las glicosilaciones pueden causar bajos niveles de expresión, o un plegamiento inapropiado, con la consiguiente formación de cuerpos de inclusión (40).

Algunos de estos problemas pueden evitarse si estos genes se expresan en hospedadores eucarióticos cuya maquinaría celular sea más próxima a la nativa, como es el caso de las levaduras. En especial, el uso de *S. cerevisiae* es de gran interés ya que posee la habilidad de glicosilar y secretar las proteínas al medio extracelular (lo cual evita en muchos casos pasos intermedios de lisis celular) y tiene una elevada eficiencia de transformación (41). Además, haciendo uso de un vector episómico adecuado no integra el plásmido dentro de su genoma, tal y como hace *Pichia pastoris* (42), facilitando así su posterior manipulación. Otra ventaja muy interesante desde un punto de vista evolutivo es su elevada frecuencia de recombinación de DNA, la cual a diferencia de *E. coli* permite la construcción de

genotecas *in vivo* a través de la recombinación homóloga de diferentes genes (conocido como *in vivo* DNA *shuffling* o barajado, ver siguiente apartado). Por último, la ligación de los genes mutados en vectores de expresión es, en muchos casos, un paso laborioso que requiere un ajuste fino. En levaduras, el mecanismo reparador de huecos (*in vivo gap repair*) puede sustituir la ligación *in vitro* de una manera rápida y precisa (43, 44). Los insertos de genes mutados son co-transformados con el plásmido linearizado que contiene secuencias homólogas (con al menos 15 bases de homología) con ambos extremos del inserto (45, 46). La propia maquinaría celular los recombina homólogamente para recrear un plásmido circular de replicación autónoma (47).

3. GENERACIÓN DE DIVERSIDAD

El éxito en la optimización de una proteína mediante evolución molecular dirigida depende en gran parte del tamaño de la genoteca (que debe ajustarse a la capacidad de *screening*) y de su calidad (la frecuencia y el tipo de mutaciones/recombinaciones introducidas). En una proteína de 300 aminoácidos existen 5700 maneras diferentes de cambiar un sólo residuo, 16 millones de maneras de cambiar dos y más de 30000 millones de cambiar tres. Por lo tanto, es imposible investigar todo el espacio proteico con las herramientas actualmente disponibles (48, 49). Además si tenemos en cuenta que las mutaciones beneficiosas son muy poco frecuentes (la mayoría son neutras o deletéreas), y mucho menos las combinaciones de éstas, es preferible desarrollar una estrategia de pasos pequeños, cambiando aproximadamente de uno a tres aminoácidos por generación (24). En definitiva, una estrategia en la que mutaciones puntuales beneficiosas se vayan acumulando y recombinando en generaciones consecutivas hasta adquirir la propiedad enzimática deseada.

En general, se suelen emplear dos alternativas para la generación de diversidad: la mutagénesis aleatoria a partir de un único gen parental, y los métodos de recombinación de DNA de varios genes parentales (50).

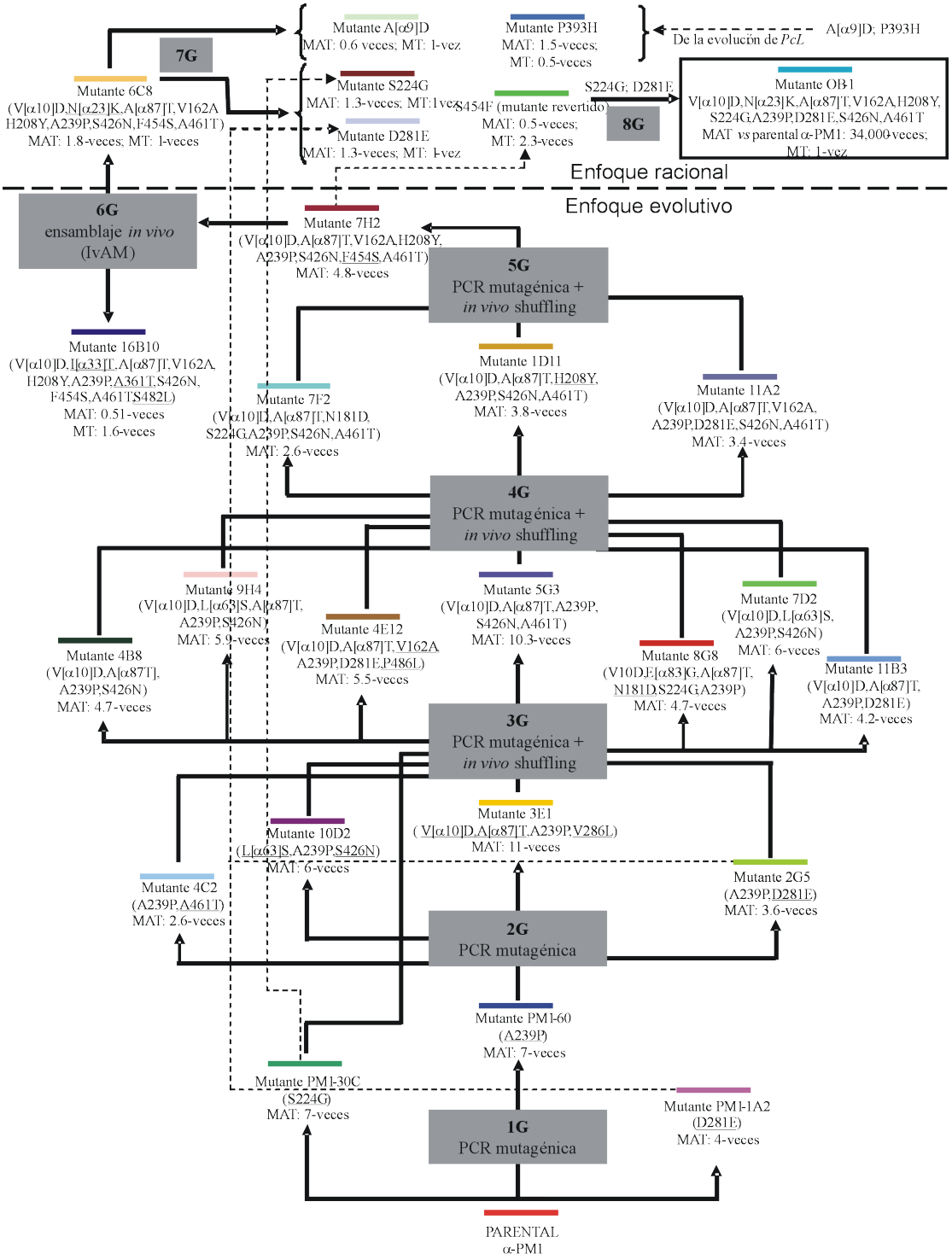


Figura 3.- Ruta del proceso de evolución dirigida de una lacasa de alto potencial redox en S. cerevisiae llevado a cabo en nuestro laboratorio.

En este ejemplo, se llegó a mejorar 34.000 veces las capacidades catalíticas de la enzima, aunando una mejora en la secreción y en las cinéticas enzimáticas al

tiempo que se conservó la termoestabilidad. Para ello se llevaron a cabo 8 ciclos de evolución *in vitro* combinando la mutagénesis aleatoria con diversas estrategias de recombinación de DNA. En los últimos ciclos se hizo uso del enfoque racional para recuperar mutaciones puntuales no seleccionadas e incorporar mutaciones procedentes de experimentos paralelos de evolución dirigida con otra lacasa con alto grado de identidad de secuencia. MAT: mejora en actividad total; MT: mejora en la termoestabilidad.

3.1. Mutagénesis aleatoria

Existen numerosos métodos para producir mutaciones puntuales al azar en el gen que codifica la enzima de interés. El método más utilizado es la reacción de PCR propensa a error (*error-prone* PCR o epPCR) que genera mutaciones deliberadamente mediante el empleo de una DNA polimerasa que carece de actividad correctora o bien induce la aparición de mutaciones bajo unas determinadas condiciones de reacción (17, 51).

Uno de los factores más importantes a considerar en las reacciones epPCR es la frecuencia de mutación o promedio de mutaciones por gen. La frecuencia de mutación total es el producto de tres parámetros: la tasa de error (fidelidad) de la DNA polimerasa en las condiciones de reacción, el tamaño del gen a mutar, y el número de ciclos de duplicación efectiva. La fidelidad de la polimerasa también depende de la naturaleza de la secuencia diana, ya que se pueden observar diferentes tasas de mutación en secuencias distintas incluso bajo las mismas condiciones de reacción.

Para el estudio de la relación estructura-función, una frecuencia de mutación que induzca un cambio de un aminoácido por gen parece lo más deseable. Sin embargo, los estudios de evolución dirigida para mejorar actividad o estabilidad de enzimas utilizan frecuencias mayores, induciendo 1-4 cambios de aminoácidos (2-7 sustituciones nucleotídicas) por proteína. Sorprendentemente, también se han obtenido proteínas con propiedades mejoradas a partir genotecas altamente mutagenizadas con más de 20 mutaciones por gen (52, 53). Típicamente, una tasa de error es adecuada cuando el 30-40% de los mutantes de la librería presenta

menos del 10% de la actividad de la enzima parental; sin embargo, este valor puede cambiar, dependiendo de la enzima y de la función (54).

Aunque simples y versátiles, los métodos de epPCR son limitados en su habilidad de crear diversidad a nivel genético. El mayor de los inconvenientes de la epPCR deriva de la intrínseca redundancia del código genético. Existen 61 codones que se traducen en los 20 aminoácidos esenciales. En términos prácticos, únicamente se puede acceder, de promedio, a aproximadamente 5,6 aminoácidos de los 20 posibles a través del cambio de una única base por codón (55).

Otra característica de la estructura del código genético es que un único cambio de base frecuentemente genera sustituciones de aminoácidos conservativas, reemplazando un aminoácido por otro de propiedades físico-químicas similares (56). Por este motivo, los aminoácidos que son traducidos a partir de 4 o 6 codones son más frecuentes en una colección de mutantes que aquellos que sólo codifican por uno o dos codones. Este desequilibrio es aún más importante en genotecas con una tasa de error pequeña. Todo esto, unido a la tendencia mutacional de las polimerasas, especialmente hacia las transiciones (cambios de bases púricas por púricas y pirimidínicas por pirimidínicas) (51), hace que se reduzca significativamente la diversidad de los nucleótidos sustituidos y por lo tanto una amplia fracción del espacio proteico quede inexplorado.

Como alternativas mutagénicas a la epPCR algunas de las metodologías que se emplean son, entre otras: i) mutágenos físico/químicos (radiación UV, agentes desaminantes o alquilantes) (26, 57) ; ii) cepas mutadoras (29); iii) métodos basados en la mutagénesis saturada como la mutagénesis de cassette, mutagénesis de codón o la mutagénesis de secuencia saturada (58, 59); iv) técnicas que posibilitan la deleción y posterior inserción de un número arbitrario de bases consecutivas en posiciones al azar (60); v) o estrategias más recientes como la permutación circular en la que tras fusionar los extremos N y C terminal de una proteína y circularizar la construcción, se promueven cortes al azar para conseguir una proteína con la misma secuencia y estructura en términos generales pero en la que la cadena polipeptídica empieza y acaba en posiciones muy diferentes (61).

3.2. Métodos de recombinación del ADN

En la naturaleza, la recombinación del ADN mediante los procesos de reproducción sexual juega un papel muy importante en la supervivencia y evolución de los organismos vivos porque permite reparar los genes dañados y aumentar la diversidad genética de una población dada (26).

En el laboratorio, mediante la recombinación del material genético de diferentes genes se acelera el proceso evolutivo facilitando la acumulación de mutaciones beneficiosas y eliminando aquellas que se presentan como deletéreas o neutrales (49).

Es importante tener en cuenta que durante la mutagénesis aleatoria sólo las mutaciones del gen seleccionado son transmitidas a la siguiente generación, descartando otras variantes posiblemente útiles y haciendo que sus mutaciones beneficiosas deban ser re-descubiertas para acumularse en posteriores ciclos de evolución (62). Por este motivo, los métodos de recombinación de ADN se convierten en herramientas realmente poderosas puesto que permiten la incorporación de las mejores mutaciones de diversas variantes en un mismo ciclo.

En 1994 Pim Stemmer, desarrolló el primer método de recombinación *in vitro* de ADN conocido como *in vitro* ADN *shuffling* (63). Se basa en la fragmentación aleatoria del ADN mediante la acción de una ADNsa, seguida de una reacción de PCR en ausencia de oligonucleótidos cebadores para el reensamblaje de los fragmentos, la cual gradualmente produce secuencias recombinadas completas con nuevas combinaciones.

A raíz de los experimentos de Stemmer, se han desarrollado multitud de nuevas técnicas para la creación de diversidad mediante la recombinación de genes (Figura 4) (8, 24, 26, 50, 62, 64).

a) Métodos *in vitro*

1. Métodos basados en la recombinación homóloga del DNA: StEP (*Staggered Extensión Process*) (65) y RACHITT (*Random Chimeragenesis on Transient Templates*) (66).

2. Métodos basados en el *Family shuffling* (67) o recombinación de genes de una misma familia o relacionados con una homología de secuencia superior al 60%: DOGS (*Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling*) (68) y variedades del *family shuffling* haciendo uso de DNAs de cadena sencilla o enzimas de restricción (69, 70).
3. Métodos basados en la recombinación de genes con una homología de secuencia inferior al 60%: ITCHY (*Incremental Truncation for The Creation of Hybrid enzymes*) (71), THIO-ITCHY (72), SCRATCHY (combina ITCHY y DNA *shuffling*) (73), SHIPREC (*Secuence Homology-Independent Protein Recombination*) (74) e *in vivo Exon Shuffling* (75).

b) Métodos *in vivo*: *S. cerevisiae* como herramienta para la generación de diversidad

La mayoría de las técnicas de recombinación *in vitro* de ADN requieren una manipulación precisa del material genético (fragmentación, ligación a vectores de expresión, etc.) y a menudo resultan ser mutagénicas debido a las diferentes reacciones de amplificación que se deben llevar a cabo (44, 47, 57). En *S. cerevisiae*, la recombinación *in vivo* es un método sencillo, rápido y no mutagénico. En efecto, la elevada frecuencia de recombinación y la fácil manipulación de *S. cerevisiae* hace que la recombinación homologa *in vivo* sea una valiosa herramienta para crear genotecas altamente diversas a partir de genes de la misma familia (43, 76). Una de las ventajas del *in vivo shuffling* es que durante la recombinación el aparato corrector de errores de la célula de levadura previene la aparición de mutaciones adicionales que son comunes en los métodos *in vitro* (44, 47). Además, estudios sobre la identidad de secuencia requerida para la recombinación homóloga en levadura sugieren que secuencias de ADN que compartan de 15 a 30 pares de bases contiguas pueden recombinar (78). Por lo tanto se antoja factible aplicar el *in vivo shuffling* para crear genes quiméricos a partir de familias de genes homólogos y así explotar la diversidad funcional natural (77).

Otros métodos de recombinación *in vivo* empleados con éxito son: CLERY (*Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast*) que hace uso del *in vitro* DNA *shuffling* y la recombinación *in vivo* de levadura (79); y el *Random Chimeragenesis by Heteroduplex* basado en el sistema reparador de errores en el

ADN de *E. coli* (80). Más recientemente, se han reportado métodos como el IVOE (*in vivo overlap extension*) para la construcción de librerías combinatoriales, (44, 81, 82) o el IvAM (*in vivo assembly of mutant libraries with different mutational spectra*) (83) que se basa en el barajado *in vivo* de librerías mutagénicas de diferente perfil mutacional. La tendencia actual apunta al uso de los métodos *in vivo* e *in vitro* de manera combinada con la finalidad de expandir la exploración del espacio de secuencia proteica mediante la generación de nuevos entrecruzamientos (*ej.* la combinación de StEP e *in vivo* DNA-shuffling en el mismo ciclo de evolución) (84) o el arriba mencionado CLERY (79).

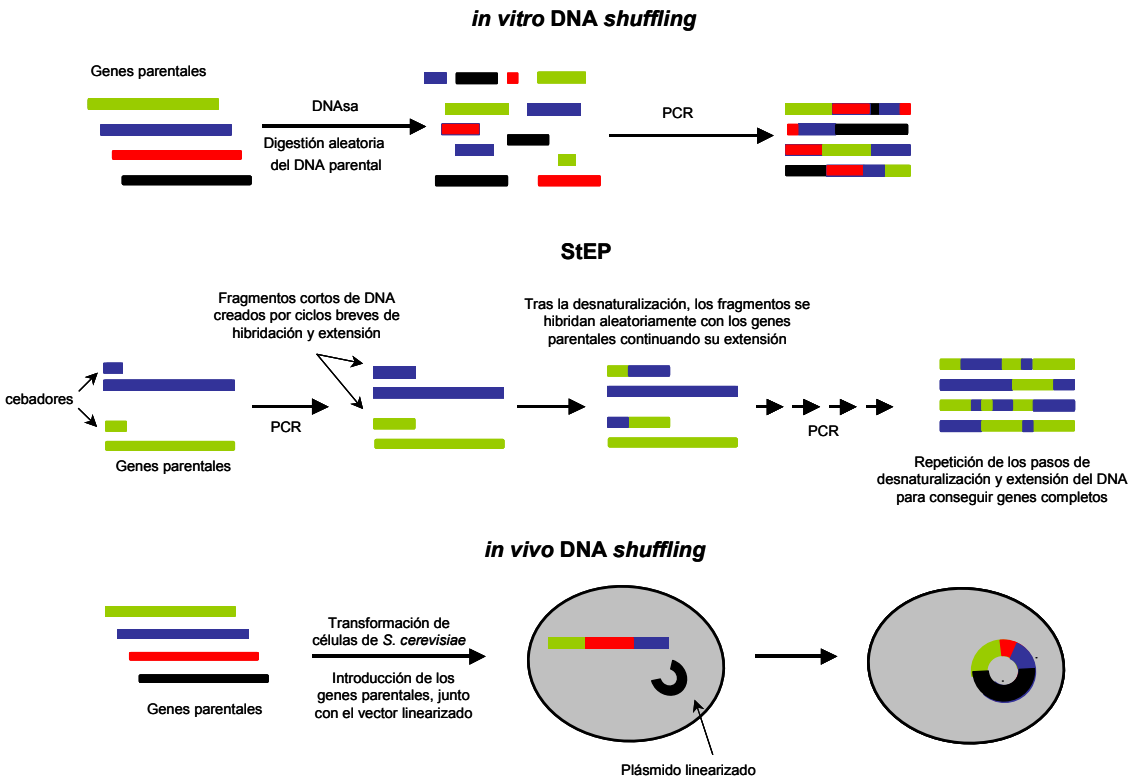


Figura 4. - Algunos métodos de recombinación de DNA.

4. EL MÉTODO DE *SCREENING*

La puesta a punto de un método eficiente para la detección de las propiedades deseadas es probablemente el elemento más determinante en un experimento de evolución dirigida (17, 85). Existen dos alternativas ampliamente utilizadas:

- La **selección biológica** es la generación de una función que confiere crecimiento o ventaja de supervivencia al organismo hospedador. La enzima se encuentra vinculada a la supervivencia del hospedador, de tal forma que sólo los organismos que posean la característica deseada podrán crecer (11). Normalmente son métodos muy específicos y difíciles de implementar productivamente. Sin embargo, la selección puede ser un mecanismo muy eficiente de análisis permitiendo una exhaustiva búsqueda de librerías de 10^6 e incluso más variantes. La principal desventaja es que la propiedad o proteína de interés no puede desacoplarse de la función biológica y que la actividad enzimática diana no debe interferir con el metabolismo celular. Por lo tanto, puede ser difícil, incluso imposible, su uso para explorar nuevas funciones como la actividad/estabilidad en ambientes no-naturales o a altas temperaturas (24).
- La exploración o ***screening*** es un método más versátil y flexible, donde cada uno de los miembros de la librería es analizado individualmente para la propiedad catalítica a estudiar (86). Al contrario que en los procesos de selección, en el *screening* las condiciones experimentales pueden ajustarse para satisfacer el criterio deseado. El mayor inconveniente del *screening*, sin embargo, es que el tamaño de la librería que puede explorarse es limitado, normalmente alrededor de 10^4 clones, aunque con la ayuda de robots se pueden lograr incrementos de hasta un par de órdenes de magnitud.

El *screening* de actividad enzimática normalmente se hace mediante detección de la absorbancia o mediante la emisión de fluorescencia (87). Los métodos colorimétricos son menos sensibles y selectivos que los fluorimétricos. Por norma general, los colorimétricos tienen su límite de detección en 10^{-7} g/mL (pocas sustancias pueden ser detectadas a concentraciones más bajas), y los fluorimétricos pueden llegar de 10^{-8} hasta 10^{-10} g/mL.

Algunos métodos de *screening* se hacen directamente en fase sólida conteniendo el correspondiente sustrato. En estos casos, las variantes se detectan directamente por visualización de halos en torno a las colonias (coloración o decoloración) o la generación de color en el interior del hospedador. Estos estudios

pueden acoplarse a analizadores digitales, aumentando la exploración de las librerías hasta 10^5-10^6 variantes (88). En cualquier caso, son métodos cualitativos siendo particularmente válidos en procesos de *pre-screenings*. Por este motivo, el *screening* en fase líquida es el más empleado habitualmente, ya que son métodos cuantitativos, lo que permite valorar los pequeños cambios en las actividades como consecuencia de las mutaciones introducidas. En términos generales, este tipo de *screening* implica la transferencia de colonias individuales a microplacas -generalmente en formato de 96 o 384 pocillos-, creciendo las células hasta la fase estacionaria, e induciendo a partir de estos microcultivos la expresión de la proteína (87). Es importante destacar que el *screening* en fase líquida facilita la inclusión del tipo parental bajo las mismas condiciones que los clones de la librería, obteniéndose datos más uniformes y fiables al contar cada microplaca con su propio estándar interno (17). Si la proteína en estudio es intracelular, se debe hacer un paso adicional de lisis celular para liberar los contenidos celulares. Finalmente, la actividad enzimática se cuantifica en un espectrofotómetro/fluorímetro lector de microplacas, o bien mediante el empleo de técnicas de cromatografía líquida de alta resolución en *high-throughput* (89).

El sistema de *screening* debe permitir *high-throughput* (HTP) a coste moderado, y ser fiable y reproducible. En este aspecto, el desarrollo de la tecnología de robots manipuladores de líquidos mejora mucho la reproducibilidad, reduce la dispersión de los datos y facilita sobremanera la labor del investigador (Figura 5). Un sistema HTP-*screening* debe ser lo suficientemente preciso para detectar las pequeñas mejoras (de 1.5 a 4 veces, por norma general) y lo suficientemente sensible para detectar los bajos niveles de actividad en los primeros ciclos. Es decir, las condiciones de *screening* deben asegurar que las pequeñas mejoras esperadas a partir de sustituciones de un único aminoácido puedan ser detectadas. Esto se consigue mediante el ajuste de las condiciones del ensayo en un punto en el que la actividad de la enzima nativa o parental está cerca (y nunca por debajo) del límite de detección. Si la actividad de la enzima nativa se encuentra por debajo del límite de detección, las pequeñas mejoras no van a ser detectables (54).



Figura 5.- Equipamiento para HTP-screening. a) Robot picador de colonias. b) Lector de microplacas. c) Robot manipulador de líquidos. d) Inyector automático HTP para HPLC.

Las reacciones más convenientes de analizar en HTP son aquellas que implican sustratos cromogénicos o fluorogénicos. Sin embargo, este tipo de análisis no es posible con muchos biocatalizadores y por ello en los últimos años ha habido un constante desarrollo de técnicas para el *screening* de actividades enzimáticas variadas (7, 24, 89): desde el uso de ensayos basados en el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) acoplado a FACS (*Fluorescente-Activated Cell Sorting*); experimentos de compartimentalización *in vitro*; registro de cambios físico-químicos (por ejemplo pH o temperatura); o uso de marcadores isotópicos, hasta las más novedosas técnicas que hacen uso de *fingerprinting* de enzimas y *microarrays* (90, 91).

5. ESTUDIOS "SEMI-RACIONALES"

Tal como se ha comentado en el apartado 3, las limitaciones derivadas de los métodos mutagénicos actualmente disponibles son obvias, por lo que se está realizando un enorme esfuerzo para ampliar la exploración del espacio de secuencia proteica mediante los llamados estudios "*semi-racionales*". Mediante la técnica de mutagénesis saturada, donde un único codón que codifica para un determinado aminoácido de interés es mutado por todos los codones que codifican los 20 aminoácidos naturales, se logra expandir el número de sustituciones aminoacídicas accesibles por mutagénesis aleatoria (92). Además, también puede utilizarse para mutagenizar simultáneamente varios codones (mutagénesis saturada combinatorial) tanto en bloques contiguos como en posiciones separadas. De esta forma se exploran todas las posibles combinaciones y permutaciones de aminoácidos de interés para identificar sus óptimas interacciones y sinergias en el estudio de las propiedades proteicas deseadas (27, 82). Si bien esta estrategia ha sido exitosamente empleada en muchos casos (82, 93), aparecen de nuevo limitaciones en la exploración, y es que la *randomización* de sólo 5 residuos generaría librerías de hasta $3.2x10^6$ mutantes, inabordables con las actuales tecnologías de HTP-*screening*.

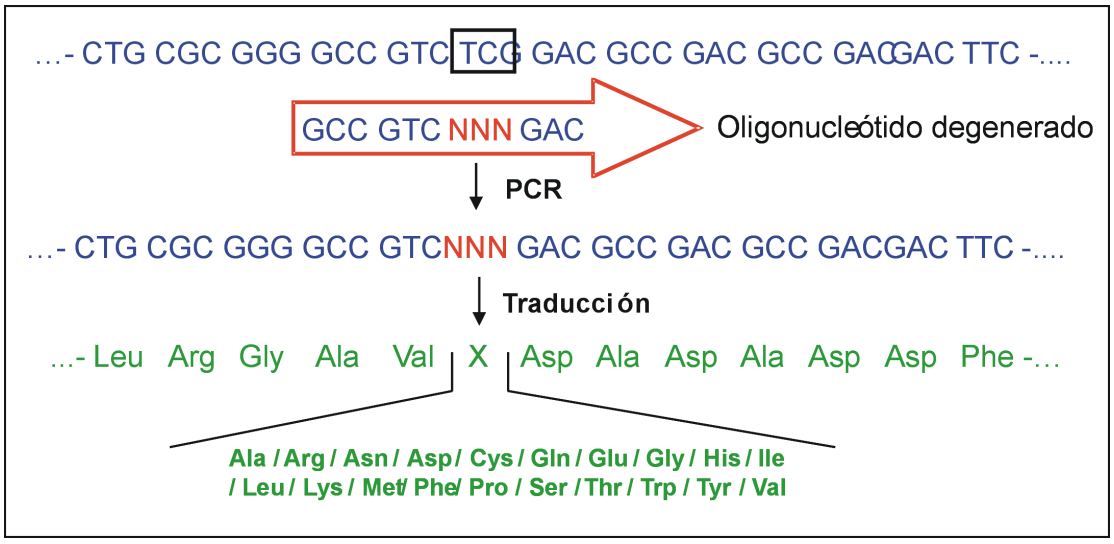


Figura 6.- Fundamento de la mutagénesis saturada. NNN representa las 4 posibles bases nucleotídicas durante el diseño de oligos degenerados.

Los estudios "*semi-racionales"* de proteínas son métodos que se sitúan entre el diseño "*racional"* y el evolutivo. Esto se debe a que hacen uso del análisis estructural de la enzima para la elección de los residuos a estudiar sometiéndolos a mutagénesis saturada combinatorial y acoplando el estudio a ensayos en HTP-*screening*. Por ello se llaman métodos "*semi-racionales"*, puesto que hacen uso de la estructura (diseño *racional*) aunque al tiempo permiten el análisis exhaustivo de un gran número de variantes que se comparan con el parental (tal como sucede en los protocolos de evolución molecular) (94).

Asimismo, la combinación experimental de la mutagénesis dirigida con la aleatoria o saturada puede resultar muy útil en el diseño de biocatalizadores. Dependiendo de la cantidad y el tipo de información estructural y funcional del que se dispone, la estrategia experimental a seguir puede variar:

- Creación de librerías combinatoriales: es el caso más frecuente. Cuando se dispone de información estructural, se puede dirigir la mutagénesis saturada a varios residuos específicos (por ejemplo, aminoácidos en contacto directo con el sustrato o cerca del sitio activo).
- Mutagénesis aleatoria y saturada simultáneamente: con este tipo de enfoque se pretenden potenciar en un sólo paso las propiedades del biocatalizador. Para ello, se hace mutagénesis saturada en residuos específicos, y el gen se amplifica finalmente mediante mutagénesis aleatoria descubriendo nuevas posiciones involucradas en el proceso catalítico.
- Mutagénesis aleatoria seguida de mutagénesis saturada: se localizan por mutagénesis aleatoria residuos de interés catalítico y se expande su estudio mediante una posterior mutagénesis saturada.

En una vertiente paralela, se están desarrollando novedosos métodos computacionales. Generalmente, son métodos basados en *screening in silico* (virtuales) de librerías del tamaño de hasta 10^{80} variantes, permitiendo la obtención de información de mutaciones que son inconsistentes con el plegamiento de la proteína. De esta manera se reduce considerablemente el trabajo experimental y en especial el espacio proteico susceptible de ser explorado. Los ejemplos más

destacados son el PDA (*Protein Design Automation*) (95) y el SCHEMA (96). PDA genera mutaciones a nivel de aminoácido y no de nucleótido, y permite la predicción de la secuencia óptima que puede adoptar un plegamiento deseado a partir del rastreo de secuencias. En principio el PDA permite la exploración de librerías de hasta 10^{23} mutantes, escogiéndose las secuencias óptimas en base a la energía conformacional más baja. Las mutaciones que aparecen con más frecuencia son las que se deben analizar experimentalmente, permitiendo identificar múltiples sitios de mutación y la evaluación de sinergias. Con el SCHEMA se identifican sitios proteicos que son tolerantes a mutaciones o que toleran entrecruzamientos sin alteraciones significativas. Aparte de los citados métodos computacionales existen también otros como el *Evolutionary Trace Method* (97) donde se escogen los residuos a mutar en base a estudios filogenéticos con genes relacionados; o métodos que predicen mutaciones que son necesarias para la introducción de sitios catalíticamente activos en moldes proteicos no catalíticos (98); y más recientemente, el análisis estadístico mediante ProSAR *(Protein Sequence Activity Relationships*) para aumentar estrategias de recombinación en protocolos de evolución molecular (99).

6. CONCLUSIONES

Cuando en los años 80 K.B. Mullis inventó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un principio muy pocos creyeron en su potencial. Tal es así, que su idea la vendió por unos pocos dólares; sin embargo unos años más tarde comenzó una autentica revolución biotecnológica. Entre otros desarrollos soportados por la PCR, se abrió la etapa del diseño racional de enzimas, que supuso una nueva forma de ingeniería de proteínas. En los 90, F.H. Arnold y W.P.C. Stemmer dieron un nuevo giro biotecnológico, presentando la evolución dirigida a la comunidad científica como una alternativa al diseño racional, cansados de las limitaciones que frustraban una y otra vez el diseño de enzimas más robustas. Mullis recibió el Premio Nobel en 1993; Arnold y Stemmer fueron premiados en el 2011 con el Charles Stark Draper (el Premio Nobel de Ingeniería). La próxima década promete nuevas emociones, pues ha llegado el momento de aunar esfuerzos para solucionar problemas que hasta hace muy poco se antojaban lejos de nuestro conocimiento. En esta nueva etapa ómica, la utilización de herramientas de high-throughput junto con

la puesta a punto de métodos genómicos adecuados permitirá el acceso a un universo proteico que hasta ahora nos era desconocido, lo que permitirá disfrutar diseñando enzimas al tiempo que facilitará la aplicación de la biocatálisis en diversos campos.

7. AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todos mis estudiantes graduados, pre y post-doctorales por aportar ideas brillantes, dinamismo y entusiasmo en el día a día de nuestro laboratorio. Estaré siempre en deuda con la Prof. Frances H. Arnold, por introducirme en este maravilloso mundo de la evolución dirigida, y darme la oportunidad de crecer en todos los aspectos. Asimismo, agradezco a los Prof. Francisco Plou y Antonio Ballesteros, por creer en mí, y por apoyar esta "loca idea evolutiva" desde el principio. Esta investigación ha sido parcialmente financiada a través de los proyectos europeos (NMP4-SL-2009-229255, FP7-KBBE-2010-4.26537, COST Action CM0701) y el Proyecto Nacional BIO2010-19697.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Plou, F.J., Alcalde, M. & Ballesteros, A. (1999) Estabilidad de los biocatalizadores. *Investigación y Ciencia* 273:46-55.

2. Cherry, J.R. & Fidantsef, A.L. (2003) Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology* 14:438-443.

3. Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. & Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258-268.

4. Kirk, O., Borchert, T.V. & Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13:345-351.

5. Ferrer, M., Martinez-Abarca, F. & Golyshin, P.N. (2005) Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 16:588-593.

6. Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J. & Ballesteros, A. (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology* 24:281-287.

7. Wahler, D. & Reymond, J.L. (2001) High-throughput screening for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 12:535-544.

8. Zhao, H.M., Chockalingam, K. & Chen, Z.L. (2002) Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 13:104-110.

9. Tao, H.Y. & Cornish, V.W. (2002) Milestones in directed enzyme evolution. *Current Opinion in Chemical Biology* 6:858-864.

10. Arnold, F.H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409:253-257.

11. Arnold, F.H. & Volkov, A.A. (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:54-59.

12. Bornscheuer, U.T. & Pohl, M. (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* 5:137-143.

13. Alcalde, M. (2003) Evolución Molecular Dirigida: hacia el diseño de nuevos biocatalizadores. *Investigación y Ciencia* 326:69-77.

14. Tracewell C.A. & Arnold F.H. (2009) Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Current Opinion Chemical Biology* 13:3-9.

15. Arnold, F.H. (1998) Design by directed evolution. *Accounts of Chemical Research* 31:125-131.

16. Bloom J.D. & Arnold F.H. (2009) In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9995-10000.

17. Zhao, H., Moore, J.C., Volkov, A.A., & Arnold, F.H. (1999) Method for optimizing industrial enzymes by directed evolution. In: Demain, A. L. & Davies, J.E. (Eds), *Manual of industrial microbiology & biotechnology.* (pp. 597-604). ASM Press, Washington (EEUU),.

18. Darwin, C. (1859) *The Origin of Species. By mean of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London (Reino Unido).

19. Maynard Smith, J. (1984) *La teoría de la evolución*. Hermann Blume (Reino Unido).

20. Schmidt-Dannert, C., Umeno, D. & Arnold, F.H. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nature Biotechnology* 18:750-753.

21. Parales, R.E. & Ditty, J.L. (2005) Laboratory evolution of catabolic enzymes and pathways. *Current Opinion in Biotechnology* 16:315-325.

22. Affholter, J. & Arnold F.H. (1999) Engineering a revolution. *Chemtech* 29:34-39.

23. Bloom JD, Wilke CO, Arnold FH & Adami C (2004) Stability and the evolvability of function in a model protein. *Biophys J*, 86:2758-2764.

24. Williams, G.J., Nelson, A.S., & Berry, A. (2004) Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61:3034-3046.

25. Kuchner, O. & Arnold, F.H. (1999) Directed evolution of enzyme catalysis. *BioFutur* B1-B11.

26. Zhao, H. & Zha, W. (2004) Evolutionary methods for protein engineering. In: Svendsen, A. (Ed.), *Enzyme functionality. Design, engineering, and screening* (pp. 353-373) Marcel Dekker, Inc, New York (EEUU).

27. Sun, L.H., Bulter T., Alcalde, M., Petrounia, I.P. & Arnold, F.H. (2002) Modification of galactose oxidase to introduce glucose 6-oxidase activity. *ChemBioChem* 3:781-783.

28. May, O., Nguyen, P.T. & Arnold, F.H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nature Biotechnology* 18:317-320.

29. Jaeger, K.E. & Eggert, T. (2004) Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 15:305-313.

30. Glieder, A., Farinas, E.T. & Arnold, F.H. (2002) Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nature Biotechnology* 20:1135-1139.

31. Salazar, O., Cirino, P.C. & Arnold, F.H. (2003) Thermostabilization of a cytochrome P450 peroxygenase. *ChemBioChem* 4:891-893.

32. Giver L, Gershenson A, Freskgard PO & Arnold FH (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:12809-12813.

33. Arnold FH, Giver L, Gershenson A, Zhao HM & Miyazaki K (1999) Directed evolution of mesophilic enzymes into their thermophilic counterparts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 870:400-403.

34. Wong, T.S., Arnold, F.H., & Schwaneberg, U. (2004) Laboratory evolution of cytochrome P450BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnology and Bioengineering* 85:351-358.

35. Zumárraga M, Bulter T, Shleev S, Polaina J, Martínez-Arias A, Plou FJ, Ballesteros A, & Alcalde M (2007) *In vitro* evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. *Chemistry & Biology*, 14:1052-1064.

36. Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. & Arnold, F.H. (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 69:987-995.

37. You, L. & Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Engineering* 9:719-719.

38. Rai, G.P., Sakai, S., Florez, A.M., Mogollon, L. & Hager, L.P. (2001) Directed evolution of chloroperoxidase for improved epoxidation and chlorination catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis* 343:638-645.

39. Liu, Z., Pscheidt, B., Avi, M., Gaisberger, R., Hartner, F. S., Schuster, C., Skranc, W., Gruber, K. & Glieder, A. (2008). Laboratory evolved biocatalysts for stereoselective syntheses of substituted benzaldehyde cyanohydrins. *ChemBioChem* 9:58-61.

40. Romanos, M.A., Scorer, C.A. & Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8:423-488.

41. Shuster, J.R. (1991) Gene expression in yeast: protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology* 2:685-690.

42. Vedvick, T.S. (1991) Gene expresion in yeast: *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 2:742-745.

43. Bulter, T. & Alcalde, M. (2003) Preparing libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Arnold, F.H. & Georgiou, G. (Eds.), *Directed evolution: library creation. Methods and protocols* (pp. 17-22). G. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).

44. Alcalde, M. (2010). Mutagenesis protocols in *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo overlap extension. In: Bramman, J. (Ed.), *In vitro Mutagenesis Protocols*, (pp. 000-000 in press). Totowa, New Jersey, US: Humana Press.

45. Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. & Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation - a model system for the study of recombination. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 78:6354-6358.

46. Muhlrad, D., Hunter, R. & Parker, R. (1992) A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. *Yeast* 8:79-82.

47. Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., & Pedersen, A.H. (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology* 17:379-384.

48. Arnold, F.H. (1999) Unnatural selection: molecular sex for fun and profit. *Engineering & Science* 1/2:41-50.

49. Romero, P.A. & Arnold, F.H. (2009). Exploring protein fitness landscapes by directed evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 10*, 866-876.

50. Arnold, F. & Georgiou, G. (2003) Directed evolution: library creation. Methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).

51. Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L. & Denolf, P. (2005) Reducing mutational bias in random protein libraries. *Analytical Biochemistry* 339:9-14.

52. Zaccolo, M., Williams, D.M., Brown, D.M. & Gherardi, E. (1996) An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *Journal of Molecular Biology* 255:589-603.

53. Drummond, D.A., Iverson, B.L., Georgiou, G. & Arnold, F.H. (2005) Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins. *Journal of Molecular Biology* 350:806-816

54. Cirino, P., Mayer, K.M. & Umeno, D. (2003) Generating mutant libraries using error-prone PCR. In: Arnold, F.H. y Georgiou G. (Eds.), *Directed evolution: library creation. Methods and protocols* (pp. 3-9). Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).

55. Bloom, J.D., Labthavikul, S.T., Otey, C.R. & Arnold, F.H. (2006) Protein stability promotes evolvability. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 103:5869-5874.

56. Miyazaki, K. & Arnold, F.H. (1999) Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: Rapid improvement of protein function. *Journal of Molecular Evolution* 49:716-720.

57. Wong, T.S., Zhurina, D. & Schwaneberg, U. (2006) The diversity challenge in directed protein evolution. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:271-288.

58. Wong, T.S., Tee, K.L., Hauer, B. & Schwaneberg, U. (2004) Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Research* 32:E23.

59. Wong, T.S., Tee, K.L., Hauer, B. & Schwaneberg, U. (2005) Sequence saturation mutagenesis with tunable mutation frequencies. *Analytical Biochemistry* 341:187-189.

60. Murakami, H., Hohsaka, T. & Sisido, M. (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nature Biotechnology* 20:76-81.

61. Qian, Z. & Lutz, S. (2005) Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *Journal of the American Chemical Society* 127:13466-13467.

62. Kagami, O., Baik, S.H. & Harayama, S. (2004) Effective DNA shuffling methods for enzyme evolution. In: Svendsen, A. (Eds.), *Enzyme functionality. Design, engineering, and screening* (pp. 425-441). Marcel Dekker, Inc, New York (EEUU).

63. Stemmer, W.P.C. (1994) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391.

64. Bommarius, A.S. & Riebel, B.R. (2004) Applications of recombinant DNA technology: directed evolution. In: *Biocatalysis. Fundamentals and applications.* (pp. 309-333), Wiley-VCH (EEUU).

65. Zhao, H., Giver, Z., Shao, Z., Affholter, J. & Arnold, F.H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology* 16:258-261.

66. Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H. & Monticello, D.J. (2001) DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology* 19:354-359.

67. Crameri, A., Raillard, S.A., Bermudez, E. & Stemmer, W.P.C. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391:288-291.

68. Gibbs, M.D., Nevalainen, K.M.H. & Bergquist, P.L. (2001) Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* 271:13-20.

69. Kikuchi, M., Ohnishi, K. & Harayama, S. (1999) Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes. *Gene* 236:159-167.

70. Kikuchi, M., Ohnishi, K. & Harayama, S. (2000) An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene* 243:133-137.

71. Ostermeier, M., Shim, J.H. & Benkovic, S.J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnology* 17:1205-1209.

72. Lutz, S., Ostermeier, M. & Benkovic, S.J. (2001) Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Research* 29:E16.

73. Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D. & Benkovic, S.J. (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 98:11248-11253.

74. Sieber, V., Martinez, C.A. & Arnold, F.H. (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nature Biotechnology* 19:456-460.

75. Kolkman, J.A. & Stemmer, W.P.C. (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nature Biotechnology* 19:423-428.

76. Okkels, J.S. (2004) *In vivo* gene shuffling in yeast: a fast and easy method for directed evolution of enzymes. In: Svendsen, A. (Eds.), *Enzyme functionality. Design, engineering, and screening* (pp. 413-424) Marcel Dekker, Inc, New York (EEUU).

77. Cusano, A.M., Mekmouche,Y., Meglecz, E. & Tron,T. (2009). Plasticity of laccase generated by homeologous recombination in yeast. Febs J. *276*, 5471-5480.

78. Manivasakam, P., Weber, S.C., Mcelver, J. & Schiestl, R.H. (1995) Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 23:2799-2800.

79. Abecassis, V., Pompon, C. & Truan G. (2000) High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Research* 28:E88.

80. Volkov, A.A., Shao, Z. & Arnold, F.H. (1999) Recombination and chimeragenesis by *in vitro* heteroduplex formation and *in vivo* repair. *Nucleic Acids Research* 27:E18.

81. Alcalde, M., Zumárraga, M., Polaina, J., Ballesteros, A. & F.J. Plou. (2006) Combinatorial saturation mutagenesis by *in vivo* overlap extension for the engineering of fungal laccases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9:719-727.

82. Zumárraga, M., Domínguez, C.V., Camarero, S., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Ferrer, M., L. de Lacey, A., Fernández, V., Ballesteros, A., Plou, F.J. & Alcalde, M. (2008) Combinatorial Saturation Mutagenesis of the Myceliophthora thermophila laccase T2 mutant: the connection between the C-terminal plug and the conserved 509VSG511 tripeptide. *Combinatorial Chemistry & High-throughput Screening*, 11:807-816.

83. Zumárraga, M., Camarero, S., Shleev, S., Martínez-Arias, A., Ballesteros, A., Plou, F.J. & Alcalde, M. (2008) Altering the laccase functionality by *in vivo* assembly of mutant libraries with different mutational spectra. *Proteins*, 71:250-260.

84. García, E., Maté, D., Ballesteros, A., Martínez, A.T. & Alcalde, M. (2010). Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast. *Microbial Cell Factories. 9*, 17.

85. Arnold, F. & Georgiou, G. (2003) Directed enzyme evolution: screening and selection methods. Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).

86. Zhao, H.M. & Arnold, F.H. (1997) Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. *Current Opinion in Structural Biology* 7:480-485.

87. Salazar, O. & Sun, L. (2003) Evaluating a screen and analysis of mutant libraries. In: Arnold, F.H. & Georgiou, G. (Eds.), *Directed enzyme evolution. Screening and selection methods* (pp. 85-97). Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).

88. Turner, N.J. (2003) Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology* 21:474-478.

89. Goddard, J.P. & Reymond, J.L. (2004) Enzyme assays for high-throughput screening. *Current Opinion in Biotechnology* 15:314-322.

90. Joo, H., Lin, Z.L., & Arnold, F.H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* 399:670-673.

91. Farinas, E.T., Bulter, T. & Arnold, F.H. (2001) Directed enzyme evolution. *Current Opinion in Biotechnology* 12:545-551.

92. Georgescu, R., Bandara, G. & Sun, L.H. (2003) Saturation mutagenesis. In: Arnold, F.H. & Georgiou, G. (Eds.), *Directed evolution. Library creation. Methods and protocols* (pp. 75-83). Humana Press, Totowa, New Jersey (EEUU).

93. Reetz, M.T., Carballeira, J.D. & Vogel, A. (2006) Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem Int Ed*, 45:7745-7751.

94. Chica, R.A., Doucet, N. & Pelletier, J.N. (2005) Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current Opinion in Biotechnology* 16:378-384.

95. Hayes, R.J., Bentzien, J., Ary, M.L., Hwang, M.Y. & Jacinto, J.M. (2002) Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties. *Proceedings of the USA National Academy of Sciences* 99:15926-15931.

96. Voigt, C.A., Martinez, C., Wang, Z.G., Mayo, S.L. & Arnold, F.H. (2002) Protein building blocks preserved by recombination. *Nature Structural Biology* 9:553-558.

97. Lichtarge, O., Bourne, H.R. & Cohen, F.E. (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *Journal of Molecular Biology* 257:342-358.

98. Dwyer, M.A., Looger, L.L. & Hellinga, H.W. (2004) Computational design of a biologically active enzyme. *Science* 304:1967-1971.

99. Fox, R.J., Davis, S.C., Mundorff, E.C., Newman, L.M., Gavrilovic, V., Ma, S.K., Chung, L.M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J.C., Sheldon, R.A. & Huisman, G.W. (2007) Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nature Biotechnology* 25:338-344.

CAPÍTULO IX

ERA POST-GENÓMICA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS BIOCATALIZADORES

MARÍA EUGENIA GUAZZARONI, LUCÍA FERNÁNDEZ ARROJO, NIEVES LÓPEZ-CORTÉS, MANUEL FERRER

RESUMEN

En la actualidad, la biología molecular moderna experimenta un aumento hacia enfoques "-ómicas», y, en particular, la genómica y la (meta) genómica como herramientas emergentes para el estudio de genes que codifican las enzimas a nivel de microorganismos individuales y comunidades imposibles de cultivar y, microorganismos sin explorar hasta ahora. Durante los últimos años, hemos visto enormes avances en nuestra capacidad para aislar microbios y analizar los genomas individuales, y la información proporcionada por estas secuencias es bastante sorprendente en lo que respecta a descifrar nuevas enzimas con nuevas actividades. Los métodos moleculares, en particular, (meta) genómica, se aplican ampliamente para caracterizar nuevos biocatalizadores. La (meta) genómica es la aplicación de modernas técnicas de la genómica al estudio de las comunidades de organismos microbianos directamente en sus ambientes naturales, evitando la necesidad de aislamiento y cultivo en el laboratorio de las especies individuales. Desde entonces, la (meta) genómica ha revolucionado la biotecnología desviando el interés lejos de cepas microbianas individuales hacia el 99% de las especies microbianas que actualmente se estima no se puede cultivar. Analizaremos las diferentes estrategias para aislar nuevas enzimas y como la aplicación directa de la (meta) genómica sobre las comunidades microbianas y sus enzimas revierte en una amplia gama de aplicaciones biomédicas, industriales y ambientales.

Palabras clave: Biocatalizador; Biodiversidad; Enzima; (meta-) genoma.

ABSTRACT

Post-genomic era for the development of new biocatalysts

Currently, modern molecular biology experiences a rise of '-omics' approaches, and in particular, genomics and (meta-) genomics as emerging tools to study gene coding enzymes at the level of single microorganisms and communities of uncultured and, so far, unexplored microorganisms. During the last few years, we have seen enormous strides in our abilities to isolate microbes and analyse single genomes, and the information that has poured out of these sequences is quite astonishing with respect to decipher new enzymes with new activities. Molecular approaches, in particular (meta-) genomics, are widely applied to characterize new biocatalysts. (Meta-) genomics is the application of modern genomics techniques to the study of communities of microbial organisms directly in their natural environments, bypassing the need for isolation and lab cultivation of individual species. Since then, (meta-) genomics has revolutionized biotechnology by shifting focus away from single microbial isolates towards the estimated 99% of microbial species that cannot currently be cultivated. We discuss here the different approaches to isolate new enzymes and how (meta-) genomics can direct application of microbial communities and their enzymes in a broad range of biomedical, industrial and environmental applications.

Keywords: Biocatalyst; Biodiversity; Enzyme; (meta-) genomics.

1. INTRODUCCIÓN

Los biocatalizadores son la respuesta de la Naturaleza a muchos retos industriales y medioambientales. Este artículo detalla los últimos avances para la identificación y mejora de biocatalizadores, con un enfoque mayoritario en la aplicación de técnicas independientes del cultivo microbiano.

Lo que los circuitos integrados son para los ordenadores, la biotecnología lo es para las industrias química, médica y medioambiental. En la primera línea de esta revolución están las enzimas microbianas o biocatalizadores – proteínas que juegan un papel clave en las actividades metabólicas de los microorganismos, confiriéndoles la habilidad de sobrevivir en un rango de condiciones ambientales muy diversas. De hecho, las enzimas cumplen una función vital en los seres vivos, y aunque su estudio se remonta a poco más de cien años, desde hace miles de años hasta la fecha se han utilizado en la preparación de productos de interés.

La comunidad científica ha logrado grandes avances en el aislamiento y expresión de genes que codifican enzimas que facilitan reacciones químicas de una forma sostenible (1, 2); en algunos casos los biocatalizadores pueden reemplazar compuestos químicos agresivos en numerosos procesos industriales (3). Esta capacidad ha promovido una iniciativa de la comunidad científica dedicada al descubrimiento y desarrollo de enzimas.

Dado que las enzimas presentan propiedades catalíticas específicas, solo una pequeña cantidad de las mismas se requiere para llevar a cabo una conversión deseada, y los rendimientos hacia el producto a sintetizar son, a menudo, superiores a aquellos obtenidos por rutas químicas. Derivadas de fuentes renovables, son totalmente biodegradables; cualquier exceso de biomasa puede transferirse a campos agrícolas como fertilizante. Además, las enzimas trabajan bajo condiciones suaves de reacción (a menudo, temperatura ambiente y pH neutro), lo que las convierte en una alternativa eficiente energéticamente.

Desafortunadamente, muchos de los procesos industriales en los que las enzimas pueden ofrecer importantes ventajas no se realizan en condiciones suaves. Es por ello, que el descubrimiento y desarrollo de enzimas que trabajen de una forma óptima a un rango de temperaturas y pH específico y que no pierdan o alteren su actividad en presencia de compuestos químicos adicionales, es de gran interés (4). También, si una nueva e inusual enzima es descubierta, se puede diseñar un esquema de producción eficiente y económicamente viable que lleve dicha enzima al mercado.

Las enzimas se obtienen de fuentes naturales, tales como hongos o bacterias, y posteriormente pueden ser genética- o molecularmente mejoradas o evolucionadas en el laboratorio para conferir nuevas propiedades específicas. El nuevo material genético se incorpora a un huésped recombinante, tal como el hongo *Aspergillus*, las levaduras *Pichia* o *Saccharomyces* o las bacterias *Escherichia*, *Bacillus* o *Pseudomonas*, que pueden ser fácilmente escalables mediante fermentación. Las razones para usar un huésped recombinante son entre otras, garantizar la producción segura (algunos microorganismos nativos pueden producir toxinas o pueden ser patógenos), conseguir una alta pureza de la enzima producida y un menor número y cantidad de sub-productos no deseados y favorecer la economía del proceso.

2. BIOTECNOLOGÍA Y BIOCATALIZADORES

En el siglo XXI se tiene que hacer frente a algunos problemas clave producidos fundamentalmente por el ser humano (5). Prácticas insostenibles en la utilización de los recursos naturales y una industrialización masiva han ocasionado un aumento de la contaminación y una degradación del medioambiente, que está provocando un calentamiento global del Planeta y cambios climáticos extremos. En paralelo, existen problemas sanitarios derivados no sólo del incremento y envejecimiento de la población, sino también de los estilos de vida sedentarios y del resurgir de epidemias, entre otros. Por lo tanto, hay una necesidad urgente de nuevas tecnologías, productos y procesos que por un lado, aporten mejoras en las condiciones de vida (por ejemplo, síntesis de compuestos bioactivos para nuevos fármacos) y, por otro, cumplan criterios de sostenibilidad (Química Verde). La Biotecnología, y dentro de ésta la Biocatálisis, ofrecen múltiples soluciones técnicas en salud, medioambiente y en el desarrollo de prácticas sostenibles, mediante el empleo de biocatalizadores, proteínas globulares complejas que están plegadas formando un surco o bolsillo en el que encajan la molécula o las moléculas reactivas – el sustrato – y donde tienen lugar las reacciones (6).

Los biocatalizadores contribuyen a avances médicos, asistiendo no solo a la síntesis de nuevos fármacos de prevención y cura de enfermedades como penicilinas y cefalosporinas semisintéticas, inmunomoduladores y moléculas

ópticamente activas, sino también a la producción de nuevos biomateriales biocompatibles (7, 8). Éstos constituyen una herramienta útil en la síntesis de alimentos nutricionales (como vitaminas y triglicéridos estructurados) y funcionales (por ejemplo, prebióticos, flavonoides, esteroides y ácidos poliinsaturados) que pueden ayudar a prevenir algunas enfermedades (9). En agricultura, se están desarrollando nuevas estrategias para la prevención de enfermedades de plantas mediante la síntesis, asistida por biocatizadores, de biopesticidas (10). Los biocatalizadores ofrecen también la posibilidad de optimizar el consumo de materias primas y de energía, así como de reducir la contaminación medioambiental mediante técnicas como la biorremediación, biodesulfuración y síntesis de biodiesel, bioetanol o hidrógeno (5). En conclusión, los biocatalizadores tienen y tendrán un enorme potencial en una sociedad industrializada y que apuesta por procesos altamente selectivos. Es por ello que el desarrollo de nuevas y mejores enzimas es un campo en auge que proporciona nuevas expectativas para químicos y biólogos. Para los químicos, nuevas moléculas combinatorias, así como nuevas reacciones químicas con una enorme diversidad estructural y funcional, que puede llevarnos a imaginar el ensamblaje de cualquier compuesto. Y para biólogos, el descubrimiento de reacciones bioquímicas inesperadas, así como de estructuras únicas.

3. EN BUSCA DEL BIOCATALIZADOR IDEAL

Las ribozimas (naturales y combinatoriales y deoxiribozimas sintéticas) han demostrado ser una herramienta útil con gran potencial en la biotecnología basada en ácidos nucleicos y presentan buenas expectativas para el desarrollo de terapias moleculares, biosensores y nuevos materiales (11). Sin embargo, aunque presentan nuevas actividades (y mecanismos de reacción), su aplicación práctica en biotecnología es limitada porque en la mayoría de los casos el sustrato de las ribozimas es ARN (12).

El diseño y obtención de anticuerpos catalíticos constituye también una alternativa en biotecnología. Sin embargo, presentan eficacias catalíticas 10^4-10^5 veces inferiores a las de las enzimas, haciendo de estas últimas la elección primera para el futuro desarrollo de la biotecnología (13). El descubrimiento de nuevas y mejores enzimas, así como la ingeniería racional del catalizador para potenciar una

determinada aplicación, son claves para un futuro sostenible (3). No obstante, hay numerosos aspectos que deben ser considerados y que han estimulado diferentes áreas de investigación.

Así, muchos procesos requieren enzimas estables y activas en disolventes orgánicos o en sistemas con bajo contenido en agua (reacciones en sistemas bi- o polifásicos para facilitar la separación de productos) (14). Sin embargo, la baja estabilidad y la disminución de las velocidades de reacción limitan la aplicación extendida de los biocatalizadores en medios no acuosos. Si bien la utilización de líquidos iónicos, fluidos supercríticos y medios micelares se ha planteado como alternativa, la inactivación de las enzimas por falta de control del pH, la posible baja estabilidad en presencia de detergentes y los cambios estructurales inducidos por los cambios de presión, son inconvenientes que limitan la aplicación de los mismos. Es por ello que se necesitan nuevos biocatalizadores activos y estables en medios casi anhidros. Quizás, será importante analizar, mediante métodos computacionales y de dinámica molecular *in silico*, los efectos indeseados del disolvente sobre la enzima (15).

La aplicación práctica de las enzimas requiere también el desarrollo de estrategias para aumentar no solo su estabilidad y reutilización sino también ampliar su especificidad de sustrato (promiscuidad catalítica) (8, 16). Para ello existen en la actualidad técnicas de ingeniería enzimática (inmovilización, modificación química, diseño de enzimas (semi) sintéticas) y genética (evolución dirigida, mutagénesis dirigida, barajado de ADN, mutagénesis al azar y permutación circular) que permiten el diseño de novedosos procesos enzimáticos partiendo de biocatalizadores conocidos (3). Pese a ello, existe una necesidad creciente de desarrollar nuevos biocatalizadores (17).

4. TÉCNICAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE BIOCATALIZADORES

El primer paso para el descubrimiento de una enzima es determinar las condiciones de operación industrial de la misma, incluida su estabilidad en la disolución industrial y la identidad de los constituyentes que pueden inhibir su actividad. Por tanto, un mayor conocimiento del proceso puede ayudar en el proceso

de selección del mejor método de tamizado para el desarrollo de nuevos biocatalizadores (18). Preguntas importantes a plantearse en el proceso son, por ejemplo: ¿Es la primera vez que se emplean enzimas para la aplicación en particular para la cual se busca? ¿Es necesario diseñar una nueva enzima para llevar a cabo esta reacción, o existen accesibles enzimas con capacidades similares? y ¿La nueva enzima incrementará el rendimiento de un proceso existente? En la actualidad se pueden aplicar una variedad de métodos para el descubrimiento de enzimas, dependiendo del objetivo final:

- Tamizado clásico de microorganismos usando una colección establecida de cepas microbianas.
- Un acceso integrado que involucre tamizados moleculares de microorganismos aislados y muestras complejas medioambientales; los tamizados moleculares emplean herramientas genómicas, proteómicas y metabolómicas, acopladas con análisis bioinformáticos y computacionales.
- Evolución molecular mediante ingeniería iterativa de proteínas.

5. TAMIZADO CLÁSICO DE COLECCIONES DE MICROORGANISMOS

El tamizado clásico se basa en el cultivo de una amplia diversidad de microorganismos que se encuentran en las colecciones privadas o públicas de microorganismos. La diversidad viene reflejada no solo por la taxonomía, sino también por la variedad fisiológica, bioquímica y ecológica de los microorganismos. Aunque el tamizado es un juego de números (el éxito en la búsqueda dependerá del número de organismos a rastrear), nos permite identificar genes de interés si se sabe cómo y dónde buscar (19, 20). De esta forma, el criterio que un biocatalizador debe reunir ha de estar reflejado en la librería de microorganismos a rastrear. Por ejemplo, enzimas para uso en detergentes deben mostrar rendimiento óptimo a valores de pH altos y a temperaturas entre 20 y 50ºC. Por otra parte, enzimas para alimentación deben trabajar a pH neutro y 37ºC (por ejemplo, la temperatura del tracto digestivo). Además, las enzimas de alimentación deben mostrar una estabilidad extrema a pH bajos, dado que tiene que actuar en las condiciones drásticas que existen en el estómago. Las enzimas secretadas, aquellas que se

producen extracelularmente por microorganismos, tienen la mayor probabilidad de actuar en condiciones extremas muy diversas (4). Al contrario que las enzimas intracelulares, que son estabilizadas en el citoplasma, las enzimas secretadas por los microorganismos han sido optimizadas para trabajar en ambientes muy diversos por selección natural, dado que han evolucionado durante miles de años. Ejemplos de fuentes microbianas para aislar enzimas extracelulares son los lagos salados con valores de pH muy altos, o fuentes ácidas con valores muy bajos de pH, áreas geotermales con temperaturas cercanas a ebullición, o regiones polares (21).

El desafío del tamizado de microorganismos es la diversidad infinita de formas de vida (19, 22). En este punto hay que mencionar que se han identificado hasta la fecha cerca de 7500 especies microbianas que están representadas en varios centenares de miles de microorganismos, los cuales están accesibles en laboratorios y colecciones privadas y públicas (23, 24). Sin embargo, una vez que el método de tamizado ha sido diseñado, los microorganismos (independientemente de su número) pueden ser sometidos a un tamizado inicial para encontrar el mayor número posible de dianas positivas - microorganismos o enzimas que encajen con las condiciones de aplicación. Esto a menudo resulta en un medio de cultivo que contiene cientos o miles de enzimas (**F**igura 1, panel izquierdo). En un tamizado posterior, se aplican ensayos más restrictivos a los medios de cultivo.

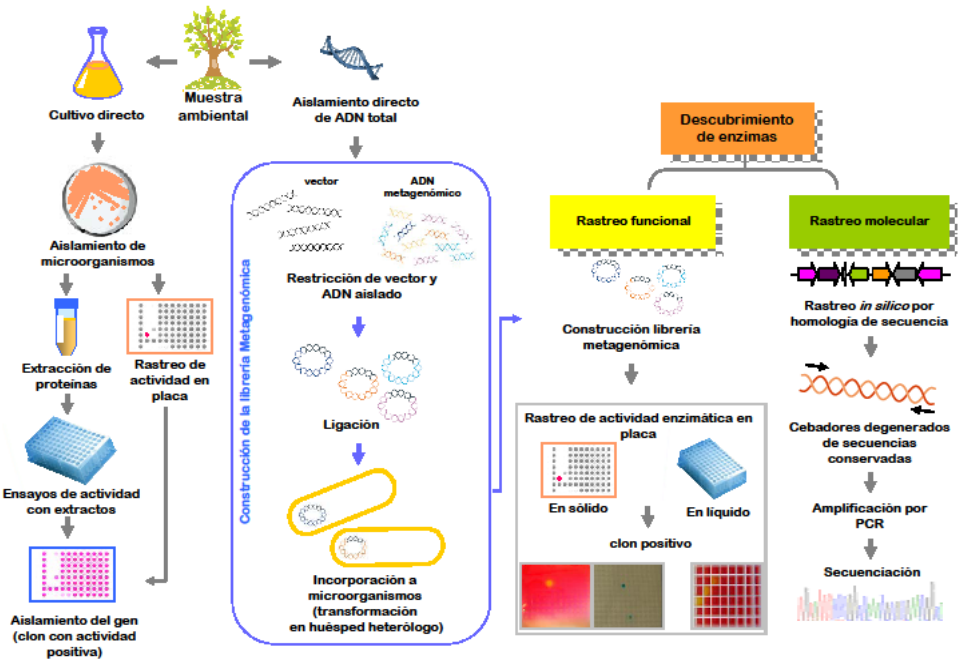


Figura 1.- Técnicas de tamizado que permiten acceder a nuevas enzimas de interés biotecnológico presentes en la biodiversidad microbiana.

El tamizado de una librería de microorganismos puede realizarse en placas de agar sólido o en micro-placas, dependiendo del ensayo a realizar. Los ensayos líquidos en formato de placas multipocillo ofrecen un amplio rango de posibilidades, especialmente porque el tamizado es independiente del crecimiento del microorganismo correspondiente (25-29). Normalmente, una librería se transfiere desde una placa de agar sólido a una placa multipocillo mediante el empleo de sistemas robotizados (30). Estas librerías se incuban para crecer una placa madre y parte de este cultivo se transfiere (preferiblemente mediante sistemas robotizados) a una placa de tamizado para finalmente identificar el organismo activo en una librería hecha de cientos o miles de ellos (29). Los organismos individuales que se encuentren activos en el tamizado son posteriormente analizados, y las enzimas de interés directamente purificadas. Alternativamente, el ADN microbiano del organismo en cuestión puede ser aislado y el gen que codifica para la enzima deseada se aísla de la mezcla y se inserta en un huésped adecuado. La librería (una secuencia de nucleótidos en un gen) se rastrea nuevamente usando el mismo ensayo que se aplicó en el tamizado original.

Los tamizados funcionales, basados en la identificación de microorganismos dentro de una colección que son capaces de transformar un sustrato deseado mediante el análisis de caldos de cultivo, son a menudo complementados con técnicas de tamizado molecular que permiten identificar genes de interés por similitud con secuencias de genes que codifican enzimas conocidas (31, 32). En otras palabras, la información de secuencias de ADN de un conjunto de enzimas relacionadas se usa para rastrear y clonar genes adicionales de otros microorganismos. Un alineamiento de las secuencias de nucleótidos o de las secuencias correspondientes de amino ácidos, seguido de la identificación de regiones conservadas evolutivamente, hace posible generar reacciones degeneradas en cadena de polimerasa (PCR) que contengan las secuencias de ADN correspondientes a regiones homólogas. En este caso, simplemente hay que aislar el ADN del organismo o de los organismos a investigar.

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica ampliamente usada en biotecnología para amplificar trazas de ADN (33). El primer paso para la reacción de PCR es sintetizar “oligo-nucleótidos” que son diseñados para complementar las regiones homólogas del gen de interés. Mediante el solapamiento de oligonucleótidos específicos al ADN molde y realizando múltiples ciclos de replicación dirigidos por los oligonucleótidos, la secuencia de ADN deseada puede ser amplificada millones de veces en varias horas. La limitación de este método es que se generan solo variantes de enzimas conocidas, pero no totalmente nuevas (34). La ventaja de este método es que no se basa en la expresión del gen en cuestión (tanto en el organismo donador como el receptor) y no requiere ensayos funcionales para detectar la actividad de la enzima. Este método se puede usar para rastrear librerías medioambientales, dado que no es un prerrequisito disponer de organismos vivos (este punto se discutirá posteriormente). Usando este método, comenzando con solo media docena de genes homólogos se pueden crear cientos de biocatalizadores de interés industrial (35).

Las técnicas de tamizado descritas anteriormente pueden ayudar a identificar candidatos de biocatalizadores que actúan de forma correcta sobre la aplicación en cuestión. Sin embargo, si la actuación de la enzima no es aún correcta, se deben

considerar otras alternativas: iniciar nuevos ciclos de tamizado basados en los resultados obtenidos en etapas anteriores o realizar programas intensos de optimización enzimática, por ejemplo, evolución molecular que involucra técnicas de ingeniería de proteínas, tales como mutagénesis al azar o recombinación homóloga *in vitro* de genes mutantes seleccionados procedentes de la fragmentación de ADN al azar (34).

Se han descrito métodos de tamizado alternativo en los cuales la librería de genes procedente de un organismo en cuestión se rastrea funcionalmente mediante el empleo de ensayos bioquímicos (36). Esto puede realizarse mediante inmuno-tamizado, que se basa en crear anticuerpos contra todas las proteínas secretadas en un cultivo libre de un microbio dado. Entonces, se genera una librería de genes del mismo organismo, usando un sistema de expresión que dirige la expresión de proteínas. Un vector es una molécula de ADN que replica en una célula huésped. Si una pequeña pieza de ADN foráneo se incorpora a un vector, éste replicará en la célula huésped. La librería de expresión se rastrea con los anticuerpos para selectivamente identificar clones que expresen las proteínas de interés (36). La secuenciación posterior de los clones identificados y la comparación de las mismas en bases de datos permite asignar actividades proteicas. La ventaja de este método es la rápida producción de todo un conjunto de clones de expresión sin la necesidad de usar métodos de tamizado funcional que solo permite la detección de la actividad enzimática deseada.

6. BIOCATALIZADORES Y CULTIVO DIRECTO DE MICROORGANISMOS

Pese a que se dispone en estos momentos de colecciones importantes de microorganismos, se sabe que el Planeta es una fuente inagotable de nuevos organismos. Como manifestara el investigador estadounidense Stephen Jay Gould (1941-2002): "…en la Tierra no vivimos en la Era del Hombre, vivimos hoy, y siempre, en la Era de los microorganismos". Los microorganismos son, y siempre han sido, la forma de vida predominante en la Tierra. Pese a que fueron descubiertos hace unos 300 años por van Leeuwenhoek y que la mayor parte de la investigación microbiológica se ha producido en los últimos 100 años, iniciada con Louis Pasteur y Robert Koch, líderes en el desarrollo de la disciplina, se cree que

fueron los primeros habitantes del planeta, hace 3.500 millones de años. Esto significa que son 2.000 millones de años más antiguos que los organismos eucariotas, y tienen una tasa de reproducción mucho más rápida. Los procariotas pueden vivir, y sus enzimas trabajar, en ambientes muy diversos (4). La piel humana, por ejemplo, alberga a unos 100 mil microbios por cm^2, hay microorganismos que viven en volcanes a 250°C, otros en ambientes ácidos (pH entre 1 y 2), otros a profundidades entre 5 y 10 Km. de la superficie terrestre soportando presiones enormes (ver ejemplos en ref. 37). Son fundamentales para el planeta porque fabrican y mantienen la composición de la atmósfera y del suelo, convierten elementos clave como carbón, nitrógeno y azufre en formas accesibles para otros seres vivos, y contribuyen a formar la mayor biomasa del planeta. Como consecuencia de esas interacciones, se producen (macro) moléculas con actividades biológicas variadas, que juegan un papel importante en su supervivencia.

Todo esto convierte a los microorganismos en el foco de importantes proyectos de investigación. Incluso, los científicos destacan la importancia del estudio no sólo de los microorganismos como individuos sino de las comunidades de microbios, las cuales desarrollan tareas complejas esenciales para la salud de los seres humanos y la sustentación del planeta (37). El objetivo principal de este tipo de investigaciones, en lo que al tema de desarrollo de biocatalizadores se refiere, se centra en obtener una colección de microorganismos capaces de metabolizar un determinado sustrato y determinar posteriormente las enzimas responsables de tal transformación. Para ello se proponen diferentes programas de aislamiento y selección de microorganismos a partir del proceso de transformación de diferentes moléculas (38) (Figura 1, panel izquierdo).

Para lograr esta premisa mediante el aislamiento y selección de los microorganismos más adecuados, los científicos siembran los organismos en un medio de cultivo junto con los nutrientes básicos y, como única fuente de carbono, los sustratos sobre los que se pretende actuar (39). A continuación, se determina la concentración inicial de estos elementos y tras varios días de incubación se mide la concentración final. De esta forma, los expertos pueden comprobar la capacidad real

de los microorganismos presentes en una muestra para transformar los compuestos objeto de análisis. Este procedimiento se aplica por ejemplo para la selección de organismos capaces de eliminar metales pesados o para la búsqueda de organismos capaces de degradar los compuestos (ligno-) celulósicos para la identificación de microorganismos con exo-enzimas que intervengan en su degradación (40). Una vez identificado el organismo u organismos portadores de un biocatalizador de interés, se puede aplicar cualquiera de las técnicas descritas en el punto anterior para la localización y expresión del gen y la producción del biocatalizador.

El estudio de los microorganismos y sus funciones ha sido una fuente inagotable para el desarrollo de la biotecnología y su industria (3, 37). Diferentes nichos microbianos han sido la fuente de no solo moléculas con aplicaciones terapéuticas como compuestos antimicrobianos, anticancerígenos, antidepresores, sino también de organismos cultivables con aplicaciones industriales en diversos campos. A pesar de todas las herramientas de que disponen actualmente los microbiólogos y de todo el conocimiento generado desde la aplicación de técnicas de biología molecular, nos puede parecer que la complejidad de interrogantes que tiene ante sí la biotecnología es considerable. Así, hoy en día sabemos que toda la información generada en estos aproximadamente veinticinco años de aplicación de la biología molecular a la microbiología es tan sólo una pequeña parte de la que se está obteniendo desde hace unos pocos años con la aplicación de técnicas de secuenciación y análisis de genomas. No obstante, hoy es bien conocido que un simple gramo de suelo puede contener entre 2000 y 8.300.000 diferentes genomas (37), donde únicamente alrededor del 1% de éstos son accesibles con técnicas dependientes de cultivo. Es más, se estima que sólo un 10% de las especies han sido descritas, y que el 90% restante representa un enorme reservorio biológico y genético (41-44). Las limitaciones para conocer, y por lo tanto acceder a, la gran diversidad son la dependencia de medios de cultivo y la falta de conocimiento de las interacciones microbianas que nos imposibilita el cultivo de todos los microorganismos presentes en una muestra.

Es claro entonces que existe una gran cantidad de información con un potencial de aplicaciones biotecnológicas dentro de la porción no cultivable de microorganismos. Es por esto que aproximaciones como la (meta-) genómica representan una oportunidad para dilucidar más ampliamente el potencial biotecnológico inmerso en las comunidades microbianas (45). La (meta-) genómica supone la extracción, clonación, secuenciación y análisis del genoma de una comunidad microbiana, lo cual permite el estudio de una gran variedad de genes y sus productos, además de un conjunto de operones que codifican rutas de degradación o de biosíntesis. En este contexto, la (meta-) genómica es un campo nuevo de investigación que se ha desarrollado en la última década, con el objeto de entender la diversidad de diferentes nichos ecológicos conformados por microorganismos cultivables y no cultivables. Su principal objetivo ha estado centrado en la comprensión de los procesos ecológicos relacionados con la actividad microbiana en el planeta, tales como su participación en los ciclos biogeoquímicos, la diversidad ambiental, la evolución de poblaciones, la respuesta del ecosistema a los cambios ambientales y la influencia de los microorganismos en otros seres vivos y en el ambiente, entre otros (37). Así mismo, este campo se ha desarrollado gracias a la necesidad de identificar nuevos biocatalizadores con aplicación industrial, que cumplan funciones únicas, o bajo ciertas condiciones que sean de interés para su aplicación industrial (Beloqui et al., 2008).

7. BIOCATALIZADORES Y (META-) GENÓMICA

Del estudio del ADN de comunidades de microorganismos, se ocupa la (meta-) genómica, un campo nuevo en el que se busca obtener y analizar secuencias del genoma de los diferentes microorganismos que componen una comunidad (46). Idealmente, los métodos independientes del cultivo permiten a los microbiólogos explotar el potencial biológico de comunidades microbianas completas. La (meta-) genómica, o clonación desde microorganismos no cultivables (aquellos que no crecen normalmente bajo condiciones estándar de laboratorio), es una estrategia alternativa para el aislamiento de biocatalizadores (17, 47, 48). La estrategia ha proporcionado evidencias de que las fuentes genéticas contienen millones de genes no caracterizados hasta la fecha (42, 47-49). La particularidad de esta técnica

radica en el hecho de que no se basa en el cultivo de microorganismos para obtener el material genético, sino en la extracción de ADN o ARN mensajero (mARN) de todo tipo de organismos presentes en una muestra ambiental (**Fi**gura 1). Las células de estos microorganismos se rompen mediante métodos químicos (condiciones alcalinas) o físicos (sonicación) y el material genético posteriormente aislado.

Una vez que el ADN está libre, éste es separado del resto de la muestra usando centrifugación diferencial, afinidad o precipitación (34). Enzimas de restricción se emplean posteriormente para fragmentar el ADN (ambas cadenas) en una secuencia particular de fragmentos más pequeños. Estos fragmentos son combinados con vectores – pequeñas unidades de ADN que pueden ser insertados en células para replicar y producir las proteínas codificadas en el ADN. Los vectores también contienen un marcador selectivo que proporciona al organismo modelo una ventaja de crecimiento que normalmente no tiene, por ejemplo, una resistencia a un antibiótico particular.

Posteriormente, los vectores que contienen el ADN (meta-) genómico se introducen en un organismo modelo, típicamente *E. coli*, que crece en un medio selectivo, de tal forma que solo las células que contiene el vector sobreviven, formando una colonia. La muestra de células que contiene todo el ADN (meta-) genómico en vectores se denomina librería (meta-) genómica y es la que típicamente se emplea para la búsqueda de nuevas formas de genes (des) conocidos. El paso final en el procedimiento es el análisis de ADN de la librería (meta-) genómica. Esta librería de genes puede ser rastreada empleando tanto métodos de PCR basados en homología de secuencias de ADN como ensayos funcionales, como se ha comentado en el punto anterior (Figura 1, panel derecho).

Sin embargo, la complejidad de una librería de ADN (meta-) genómico plantea retos técnicos. Estos incluyen: la calidad del ADN medioambiental, normalización de la librería para evitar el tamizado repetitivo de genes muy abundantes y ampliamente distribuidos; el tamaño de la librería (meta-) genómica, que a menudo requiere equipos de tamizado de alto rendimiento; la aplicabilidad de la técnica para organismos eucariotas, que indudablemente se encuentran en el medio-ambiente; la aprobación del producto y la producción, la cual, en muchos países requiere una

fuente microbiana conocida y definida (por ejemplo, una bacteria o un hongo); y el potencial del gen o de los genes detectados para ser expresado correctamente en un organismo huésped productor (46).

La construcción y tamizado de librerías (meta-) genómicas está todavía en su infancia, y la eficiencia de tamizado es baja en comparación con el coste y la complejidad técnica (48) del método en algunos caos. Solamente el tiempo nos dirá si el valor de esta tecnología residirá en estudios ecológicos o se extenderá a aplicaciones industriales, para el desarrollo de nuevos biocatalizadores y nuevos productos y procesos alrededor de los mismos. Independientemente de ello, la iniciativa de concretar proyectos metagenómicos requiere de la colaboración entre múltiples centros de investigación en todo el mundo, de la mejora de las tecnologías de secuenciación de genes (50) y el aprovechamiento de las herramientas más actualizadas de bioinformática (43, 51-56). El avance tecnológico es un requisito para la secuenciación de (meta-) genomas ya que los secuenciadores que se venían utilizando, incluso con el proyecto Genoma Humano (http://nihroadmap.nih.gov/hmp/), no resultan totalmente poderosos para secuenciar (meta-) genomas en corto tiempo (57).

8. HISTORIA DE LA (META-) GENÓMICA EN RELACIÓN A OTRAS "-ÓMICAS"

El primer término "-ómico" introducido fue "genómica" en 1998. Se estima que una bacteria produce intracelularmente unas 750-1.500 proteínas y excreta una media de 150-180 (58), mientras que el genoma más grande de un hongo filamentoso se estima que produce hasta 3.000 proteínas y excreta 300-400. Asumiendo que el tamaño medio de una bacteria es de 4 megabases (MB) (59) y que para un hongo filamentoso es de 30-40 MB (60), solo el 2%-5% de los marcos de lectura abierta (ORF) en un genoma completo es de interés primario en lo que a la presencia de biocatalizadores de interés se refiere (44, 50, 61, 62).

Como resultado de la baja proporción de enzimas identificadas en los análisis genómicos, se desarrollaron métodos alternativos para rastrear selectivamente nuevos biocatalizadores (34, 40). Así, un año después de la acuñación del término

genómico, el concepto “(meta-) genómica” empezó a usarse, definido como la aplicación de técnicas genómicas modernas al estudio de comunidades de microorganismos directamente en su medio natural, evitando la necesidad de aislar y crecer las especies individuales (37). Esta técnica tiene sus orígenes en la recuperación independiente de cultivo de genes 16S rARN, iniciada por Pace y colaboradores hace más de dos décadas (63). Desde entonces, la (meta-) genómica ha revolucionado la microbiología de tal forma que se ha pasado de investigar aislados microbianos individuales hacia el estudio estimado del 99% de especies microbianas que se estima no pueden ser cultivados (37). Mientras que el genoma representa el material genético (ADN) de un organismo individual, el (meta-) genoma representa el ADN de una comunidad entera de organismos (Figura 2). Sin embargo, el nivel de complejidad es extremadamente alto en comparación con el estudio de genomas individuales. Una de las razones principales son que cada comunidad microbiana puede contener 10, 100, 1.000, 10.000 organismos y, lo que es peor, un número desconocido de diferentes especies desconocidas. Además, puede existir una amplia variación en la abundancia de cada especie: algunas especies pueden representar más del 10% de la comunidad mientras que otras pueden solo representar menos del 0,1%.

En la actualidad, se encuentran disponibles varios miles de genomas y (meta-) genomas para investigación (http://www.genomeonline.org) (64). Por ejemplo, en 2007, la expedición “Global Ocean Survey” publicó el análisis de 41 (meta-) genomas (65), y en octubre de 2008,

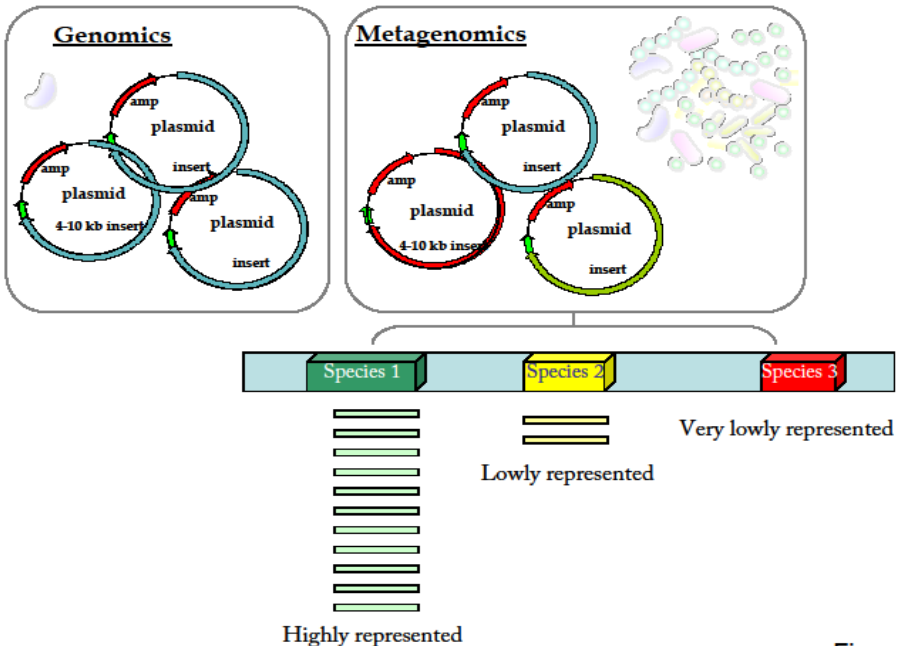


Figura 2.- Representación esquemática de las diferencias entre genómica y (meta-) genómica.

Mientras la primera analiza el material genético de un organismo individual, la (meta-) genómica lo hace del conjunto de una mezcla organismos que se encuentran en diferentes proporciones.

El número de (meta-) genomas accesibles en las bases de datos públicas superó los 1300 (42). Hemos entrado en la era de los denominados "proyectos (meta-) genómicos" que incluyen, por ejemplo, el proyecto para la creación de la Enciclopedia Genómica de bacteria y Arqueas (GEBA) (http://www.jgi.doe.goc/programs/GEBA/) y el proyecto del Microbioma Humano (http://nihroadmap.nih.gov/hmp/), con otros proyectos visionarios en el horizonte.

La "proteómica" (el estudio de la producción y función de las proteínas totales de una célula siguió a la (meta-) genómica algo más tarde, en 1997. Las investigaciones en el área de proteómica crecieron rápidamente sobrepasando el número de publicaciones científicas relacionadas con la genómica en 2009, alcanzando un plató de 3000 publicaciones al año (37). Aunque las técnicas de aislamiento de proteínas se han aplicado tradicionalmente a los cultivos de

microorganismos puros, los últimos avances en la proteómica de alto rendimiento han proporcionado nuevas herramientas par obtener una visión integrada de mezclas complejas de proteínas. En este contexto, se introdujo el término (meta-) proteogenómica o (meta-) proteómica en 2004 para definir el estudio de mezclas complejas de proteínas en una muestra ambiental (66, 67). Técnicas como la electroforesis en dos dimensiones (2-DE) acoplada a la espectrometría de masas puede ser utilizada para separar e identificar cientos de proteínas de comunidades microbianas con más de 50 especies y es posible incluso identificar proteínas de una mezcla de bacterias con genomas sin secuenciar (68, 69). La (meta-) proteómica se ha empleado para identificar nuevos biocatalizadores (70), por ejemplo, involucrados en la degradación de biomasa (71, 72). A diferencia de las técnicas génomicas que identifica genes inducidos en un microorganismo frente a señales específicas, el proteoma analiza todos los genes que se expresan como proteínas.

El término "transcriptómica" siguió en 1999 y se utiliza para definir el seguimiento de los cambios globales en la expresión de genes (ARN). Por el contrario que la genómica y proteómica, los estudios de transcriptómica no se hicieron populares inicialmente debido a los problemas técnicos inherentes a la técnica, fundamentalmente que los microarrays (usados para detectar los niveles de los tránscritos de ARN) son específicos de cada organismo, y por lo tanto, la secuencia del genoma del organismo en cuestión debe ser conocido (37). En estos momentos, el número de estudios se está incrementando hasta un número de 200 publicaciones al año (73-75), debido principalmente a la introducción de los micro-arrays de ADN ambiental que permiten medir el nivel de expresión de miles de genes al mismo tiempo, lo que se denomina (meta-) transcriptoma. También la introducción de las técnicas de secuenciación masiva de ARN, que serán discutidas posteriormente a lo largo de este capítulo, que han sufrido un auge en los últimos 5 años, han contribuido a la expansión de estas técnicas: la secuenciación directa del (meta-) transcriptoma permite estudiar el análisis de expresión génica de una comunidad sin conocimiento previo de su secuencia de ADN, el (meta-) genoma (76, 77).

Un micro-array de ADN contiene miles de segmentos de ADN adheridos a una superficie sólida, como por ejemplo vidrio, plástico o chips de silicona. La tecnología es un método popular para medir simultáneamente los niveles de expresión de un amplio número de genes (78) y puede ser también aplicada a programas de tamizado de enzimas para detectar genes inducidos bajo condiciones fisiológicas específicas (79). Por ejemplo, cuando un microorganismo se hace crecer en un sustrato específico, los genes involucrados en la utilización de este sustrato se inducen. Esta expresión diferencial permite a los científicos detectar genes que puedan degradar este sustrato. Posteriormente estos genes se expresan y testan en aplicaciones industriales (80). Los micro-arrays de ADN genómico aparecen como un método viable para identificar nuevas enzimas involucradas en la degradación de sustratos complejos, como nuevas peroxidasas que se expresan cuando el huésped se crece en pulpa tratada térmicamente (79).

Pese a que la identificación y cuantificación de metabolitos se desarrolló mucho antes usando técnicas de cromatografía de capa fina o cromatografía líquida o de gases para estudiar los extractos de plantas medicinales o aceites esenciales, no fue hasta 1998, que se introdujo el término “metaboloma” en un artículo relacionado con el genoma de la levadura *S. cerevisiae* (81). Dos años más tarde el término “metabolómica” se empezó a usar en analogía con las otras técnicas “-omicas” desarrolladas hasta el momento. El número de publicaciones relacionadas con la metabolómica (o metabonómica) muestra un menor crecimiento que la genómica o proteómica, con aproximadamente unas 600 publicaciones en 2008 (37). Esta baja producción de debe al hecho de que no se han definido métodos de análisis definidos para el análisis de metabolomas, a diferencia que la genómica o proteómica. Avances en el campo del análisis de metabolitos incluyen mejoras en técnicas cromatográficas, incremento de la resolución en espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, diseño de técnicas bidimensionales y la identificación directa de metabolitos en extractos crudos, cuya presencia o ausencia está directamente ligada a la presencia o ausencia de la enzima correspondiente (82).

9. COMO SE TRABAJA EN (META-) GENÓMICA

La (meta-) genómica incluye una amplia variedad de técnicas y estrategias de trabajo. La mayoría de éstas constan de algunos primeros pasos comunes que se detallan a continuación.

En primer lugar los investigadores obtienen una muestra de un ambiente particular (suelo, agua de mar, la boca de un ser humano, etc.) y se realiza una extracción de ADN (o ARN) de todos los microbios presentes en la muestra. La mayoría de los proyectos de (meta-) genómica se enfocan en los microbios que tienen pequeñas cantidades de ADN, como bacterias o Arqueas (identificadas como una división mayor de organismos en 1977; pueden vivir en ambientes extremos y por lo tanto son portadores de biocatalizadores estables y activos en condiciones extremas) (4).

Una vez que el ADN es extraído se induce una replicación del mismo en un microorganismo para crear una "biblioteca" la cual contiene porciones de genomas de todos los microorganismos de la muestra o se lo secuencia directamente para estudios comparativos o para búsquedas de genes en particular (46), evitando la necesidad de crear una biblioteca. La secuencia no contiene genomas separados de cada especie, sino que consiste en una mezcla de millones de fragmentos de ADN al azar de todos los microorganismos muestreados de una comunidad.

Posteriormente, el tratamiento de la biblioteca de genomas ((meta-) genoma), depende del objetivo de búsqueda. En proyectos de (meta-) genómica basado en secuencias, los investigadores se focalizan en encontrar la secuencia genética completa -el patrón de bases nitrogenadas (A, C, G, T) en las cadenas de ADN – de los microorganismos descubiertos en la muestra. La secuencia puede entonces ser analizada de diferentes formas. Por ejemplo, los investigadores pueden usar la secuencia de una comunidad para determinar el genoma completo de especies microbianas individuales. Alternativamente, los investigadores podrían usar la secuencia para analizar el genoma de una comunidad como un todo, lo cual ofrece información sobre la ecología de la población y la evolución o la búsqueda de genes que codifican enzimas de interés.

Los proyectos de (meta-) genómica basados en la función, exploran los productos que producen los microorganismos en una comunidad natural. De esta forma es posible extraer directamente ADN a partir de una comunidad microbiana e identificar nuevas proteínas y metabolitos. A través de estos métodos los científicos pueden identificar funciones desconocidas hasta hoy (debido a que previamente el estudio se basaba sólo en microorganismos cultivados en laboratorio) (83-86).

10. BÚSQUEDA DE BIOCATALIZADORES MEDIANTE ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE (META-) GENOMAS

Los marcos de lectura abierta (ORF) se encuentran normalmente a lo largo de la cadena de ADN cuando se trata de localizar un gen que codifica una proteína (86). Un ORF es un conjunto de tripletes de nucleótidos, cada uno de los cuales codifica un amino ácido que se encuentra entre un codón de iniciación que consta de tres nucleótidos (normalmente ATG), y un codón de terminación (normalmente TAA, TAG o TGA). Sin embargo, esta secuencia no contiene una señal de parada de la traslación antes de crear una proteína completa. Cuando se identifica un nuevo gen y su secuencia de ADN se descifra, no está claro cual es su secuencia proteica correspondiente. Esto se debe a que en ausencia de información adicional, la secuencia de ADN puede ser leída en seis marcos de lectura posible (tres por cada cadena, correspondiente a las tres posiciones de iniciación para el primer codón). En este sentido, un reto primario de la (meta-) genómica es establecer una conexión entre una secuencia génica y una función y una estructura (87, 88). El desarrollo y la automatización de las tecnologías de secuenciación, así como los avances en bioinformática, ha permitido secuenciar comunidades enteras en periodos de tiempo muy cortos y a un precio razonable, generando giga-bases de nuevas secuencias (89, 90). De esta forma se dispone de una colección anotada de secuencias de nucleótidos y amino ácidos accesibles en las bases de datos: más de 190 billones de bases están depositadas actualmente y este número se duplica cada 18 meses. Por una parte, esto abre una oportunidad sin precedentes para la búsqueda de nuevos biocatalizadores en esta “caja negra” de nuevas secuencias que pueden obtenerse mediante la aplicación de diferentes métodos de secuenciación (**Figura**

3); por otra, el alto número y variabilidad de secuencias levanta una serie de problemas de procesado y lleva a las técnicas bioinformáticas al límite.

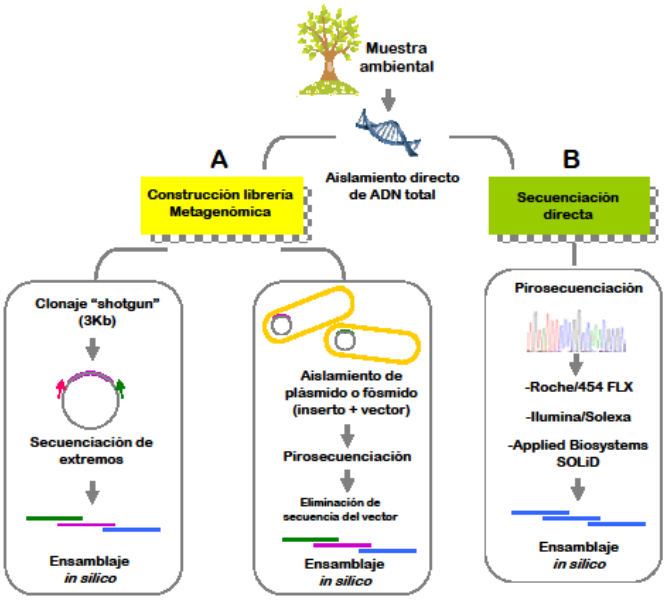


Figura 3.- Técnicas de secuenciación del ADN (meta-) genómico. (A) Dos enfoques diferentes para secuenciar clones de una librería (meta-) genómica. (B) Secuenciación de ADN aislado directamente de una muestra medioambiental.

En la actualidad las técnicas empleadas para el análisis de datos (meta-) genómicos se basan en las herramientas computacionales inicialmente diseñadas para el análisis de genomas microbianos (50). La diferencia radica en que mientras que actualmente los análisis computacionales generalmente dedican días o semanas por ordenador para el análisis completo de un genoma sencillo por comparación con bases de datos de proteínas no redundantes (una colección de proteínas de todos los organismos secuenciados hasta la fecha), el análisis de un (meta-) genoma requiere varios años si se utiliza un solo ordenador (91). Es por ello que uno de los principales cuellos de botella es la falta de algoritmos y de software para el procesamiento de un gran número de datos. Esto es de gran importancia dado que la cantidad y distribución de especies y, por tanto, de biocatalizadores

afecta el muestreo y que normalmente se sacrifica un muestreo extenso obtenido por piro-secuenciación por otro de más precisión para describir los microorganismos y biocatalizadores más abundante en una muestra (52).

Para resolver esto, la mayoría de estudios de (meta-) genómica se han centrado en comunidades con bajo número de miembros como minas ácidas que contienen menos de 10 especies (68). Otros ecosistemas actualmente investigados incluyen el análisis de comunidades microbianas y biocatalizadores en intestino de termitas para la búsqueda de biocatalizadores útiles en la producción de energía (37). La biorremediación es también un aspecto de interés desde el punto de vista de desarrollo de biocatalizadores dado que involucra la exposición a una mezcla de moléculas con estructuras químicas muy diversa a una red intrincada de múltiples especies en un escenario contaminado (92, 93).

El enfoque principal de la biología computacional es descifrar y entender la biología de los (meta-) genomas. Éstos contienen la información necesaria para el desarrollo y evolución de organismos vivos. Aunque esta información está incluida en un código de cuatro letras, ésta representa diferentes niveles de complejidad. En la actualidad el uso combinado de métodos experimentales y computacionales tiene como objetivo responder a cuestiones moleculares, evolutivas y aplicadas específicas mediante el uso de técnicas bioinformáticas, una disciplina multidisciplinar que aúna la biología, las matemáticas y ciencias de la computación (53). Existen en la actualidad una gran variedad de herramientas bioinformáticas y páginas webs accesibles para aplicaciones en (meta-) genómica. Éstas incluyen un amplio rango de herramientas para el ensamblado y asignación de (meta-) secuencias (91) pero también para la anotación y análisis automático de fragmentos de secuencias y la clasificación filogenética y funcional (37, 84-86) de millones de fragmentos de secuencias (meta-) genómicas (94-96). Estos análisis se facilitan gracias a la creación de un amplio número de bases de datos públicas que recogen la mayoría de los proyectos de (meta-) genómica.

Ejemplos de herramientas web accesibles y públicas para anotación y análisis automático son IMG/M (98), CAMERA (99), MG-RAST (42, 100), RAMMCAP (55), WebCARMA (85) y Sort-ITEMS (86). Además, se han desarrollado una serie de

herramientas (por ejemplo, TETRA) específicamente diseñadas para el análisis de (meta-) genomas basados en la composición de oligonucleótidos de diferente tamaño o motivos (101-103).

El reto en el ensamblaje se secuencias (meta-) genómicas deriva del pequeño tamaño de las mismas y la alta complejidad de especies que la forman. Pese a ello, de forma individual las pequeñas lecturas pueden ser comparadas con otras en las bases de datos de genes (o proteínas) conocidas para identificar secuencias homólogas. Este método tiene menos especificidad en la identificación de secuencias homólogas. Se han diseñado también herramientas para mejorar la predicción de genes (104). Una de ellas es el programa llamado "Metagenomic ORFome Assembly (MetaORFA)" (105), que consta de tres etapas. Primero, cada lectura se anota con un marco de lectura abierta (ORF) putativo que codifica una proteína. A continuación, cada ORF se ensambla en una colección de péptidos usando el método de ensamblaje EULER. Finalmente, los péptidos ensamblados (denominado ORFoma) se usan para realizar un escrutinio con bases de datos.

Recientemente, se ha desarrollado un programa que permite el análisis computacional de un alto número de secuencias, denominado MEGAN (90). En éste, antes de realizar el análisis las secuencias de ADN se comparan con secuencias conocidas depositadas en las bases de datos usando BLAST (105). MEGAN se usa entonces para explorar el contenido taxonómico de cada conjunto de datos, empleando la taxonomía de NCBI para resumir y ordenar los resultados. El software permite diseccionar los resultados sin necesidad de ensamblar o buscar marcadores filogenéticos específicos.

Los métodos de (meta-) genómica comparativa se usan para descubrir las adaptaciones de microorganismos a factores ambientales muy diversos y revelar la existencia de genes y biocatalizadores específicos (37, 57). Sin embargo, muchos de los parámetros extraídos de estos datos (por ejemplo, características genómicas, funcionales y filogenéticas) son interdependientes e influenciadas por aspectos técnicos tales como la preparación de la muestra y el tratamiento de datos, entre otras, que pueden producir una interpretación errónea de los resultados. Para evitar esto, se han propuesto iniciativas para disponer de estándares mínimos para la

obtención, tratamiento y análisis (meta-) genómicos, iniciativa que se ha denominado MINIMESS (106).

Pese al desarrollo de métodos bioinformáticos, uno de los problemas más grandes es la calidad de las anotaciones (meta-) genómicas (107, 108) y el alto número de marcos de lectura que se encuentran anotados como "proteína hipotética" o "proteína hipotética conservada" (61, 62, 106). Como ejemplo, el análisis de las secuencias obtenidas de una muestra de una planta de tratamiento de aguas produjo una cantidad considerable de marcos de lectura que codificaban proteínas hipotéticas conservadas (21%) y a otro tanto no se pudieron asignar actividades (o funciones) concretas (25%) (109, 110, 111). Además, las mutaciones naturales en una secuencia de amino ácidos de una proteína codificada en un (meta-) gen puede producir una proteína muy similar a otras descritas en las bases de datos, pero con una bioquímica muy diferente. Por lo tanto, en un escenario (meta-) genómico es extremadamente difícil extraer información bioquímica de una secuencia de ADN. En este contexto, se están diseñando nuevas bases de datos como MetaBioME (112), específicamente diseñadas para facilitar la identificación computacional basada en homología de nuevas enzimas de genomas y (meta-) genomas.

11. (META-) GENÓMICA FUNCIONAL: BÚSQUEDA DIRIGIDA DE BIOCATALIZADORES

Mientras que los métodos de búsqueda basados en secuencias de ADN se basan en comparación con datos de secuencias homólogas, que son obtenidas de secuencias depositadas en las bases de datos, la (meta-) genómica funcional se basa en el tamizado directo de una librería de clones de ADN que muestran un fenotipo específico, es decir, los genes son reconocidos por su actividad y no por su secuencia (113, 114). El poder de esta aproximación radica en que no se requiere que el gen de interés sea reconocido por su secuencia, asegurando que esta técnica tiene el potencial de identificar directamente nuevas clases de enzimas con funciones no solo conocidas sino totalmente novedosas (115, 116). Otra ventaja de este método es que mientras que los métodos basados en análisis de secuencias pueden resultar en una anotación incorrecta de secuencias con baja similitud a

enzimas caracterizadas bioquímicamente, los resultados de la (meta-) genómica funcional son inequívocos (117).

La estrategia básica de la (meta-) genómica funcional se muestra en la Figura 1. Se toma en primer lugar una muestra ambiental y entonces el ADN total es extraído de la muestra. Este proceso de extracción es de vital importancia si se quiere disponer de una muestra representativa (118). En la mayoría de los casos se prefiere trabajar con ADN de gran calidad y que no esté fragmentado, preferiblemente con un tamaño de entre 30 y 100 mil pares de bases. Dos métodos que se usan de forma rutinaria son aquellos que incluyen la lisis directa de la muestra mediante ciclos de congelación y descongelación (119) o un fraccionamiento indirecto donde los microorganismos se separan y purifican del resto de componentes orgánicos o inorgánicos de la muestra previamente a la lisis (120). La lisis directa es mucho más rápida y puede proporcionar un mayor rendimiento en la extracción de ADN (121). Sin embargo, este método proporciona todo el material genómico sin discriminar el origen bacteriano, arquea o eucariota. Por lo tanto existe una gran probabilidad de la presencia de información redundante en los posteriores tamizados por actividad de las bibliotecas de ADN creadas, lo que requiere tiempo, es costoso y disminuye la eficiencia del tamizado. Además, la co-extracción de compuestos indeseados (por ejemplo, ácidos húmicos del suelo) puede resultar en procesos de inhibición en etapas posteriores de clonación del ADN resultante. Para evitar este problema se requieren etapas de electroforesis para purificar el ADN, lo que disminuye el rendimiento en la extracción del mismo. Por el contrario, los métodos de fraccionamiento indirecto, requieren más tiempo de procesamiento pero evitan los problemas asociados con la interferencia de contaminantes e incrementan la eficiencia de los tamizados. La sobre-representación de material genómico de organismos mayoritarios puede ser evitada mediante el uso de gradientes de cloruro de cesio capaces de separar ADN en función del tamaño y su contenido GC (34).

En algunos casos, por ejemplo ambientes bajos en nutrientes (por ejemplo, áreas del Ártico sometidas a de-glaciación), la cantidad de ADN extraída es muy limitada. En estos casos se pueden utilizar métodos de amplificación genómica total

(WGA: Whole Genome Amplification). Otro método es la amplificación con ADN polimerasa ϕ29 (Multiple Displacement Amplification, MDA) que es capaz de incrementar la cantidad inicial de ADN a una temperatura constante. Aunque estos métodos permiten amplificar al azar el ADN genómico (MDA proporcionando productos más largos), éstos se basan en el uso de métodos de PCR proporcionando una polarización de los resultados. Es por ello que en cada caso se requiere una optimización de los procesos y etapas de extracción de ADN de suficiente cantidad, pureza y calidad.

El ADN aislado se usa posteriormente para generar una librería (meta-) genómica usando un vector apropiado (114). En estos momentos se dispone de una gran variedad de vectores para la construcción de librerías (meta-) genómicas (121). Para la inserción de pequeños fragmentos (de 0.5 a 5 mil pares de bases) se utilizan plásmidos, mientras que para la inserción de fragmentos de hasta 35 mil pares de bases se utilizan fósmidos (por ejemplo, pCCFOS) o cósmicos (por ejemplo, pLAFR3) y en el caso de fragmentos de gran tamaño, cromosomas bacterianos artificiales (BAC).

La librería se transfiere posteriormente a un huésped y los clones individuales se someten a un tamizado para identificar la presencia de una enzima específica. Cuando este tamizado se realiza de forma robotizada el método es extremadamente eficiente para aislar nuevas enzimas de organismos que por métodos convencionales son inaccesibles. La Tabla I ilustra ejemplos de biocatalizadores aislados usando herramientas de (meta-) genómica funcional, que incluyen esterasas, lipasas, quitinasas, amilasas y amidasas, entre las más estudiadas.

Como se aprecia en la Figura 4 existe un desfase entre las enzimas que se requieren en biotransformaciones industriales y las aisladas por técnicas (meta-) genómicas.

Tabla I.- Listado de biocatalizadores con potencial interés en biotransformaciones desarrollados por técnicas (meta-) genómicas en los últimos ocho años

Muestra	Biodiversidad enzimática	Referencias
Suelo	53 alcohol oxidoreductasas	**130**
Suelo	3 glicerol dehidratasa y 2 diol dehidratasas	**131**
Sedimento marino	4 amidasas, 1 peroxidasa y 1 dehidrogenasa	**40**
Suelo	8 lipasas	**132**
Microbiota de ratón	Una 1,3-1,4-β-glucanasa, tres 1,3(4)-β-glucanasa, 1 β-glucosidasa, a α-glucosidasa, 1 α-amilasa	**133**
Agua de lago	11 lipasas	**134**
Agua de río	1 metano y 1 amonio monooxigenasa	**135**
Mar de Sargaso	11 endo-β-1,4-glucanasas, 2 aminopeptidasas	**136**
Rumen bovino	12 esterasas, 9 endo-beta-1,4-glucanasas y una ciclodextrinasa	**137-140**
Fosa marina	5 esterasas	**141**
Sedimento de lago	1 citocromo P450 monooxigenasa	**142**
Sedimento marino	1 lipasa	**143**
Suelo	1 esterasa	**144**
Rumen bovino	1 lacasa	**117**
Planta de tratamiento de aguas	43 extradiol dioxigenasas (EDO) capaces de transformar 2,3-dihidroxibifenol	**145**
Bioreactor de minería	Oxidasa (hidracina)	**146**
Planta de tratamiento de aguas	1 lipasa (activa a baja temperatura)	**147**

Bacterioplancton marino	110 ciclasas de isoprenoides	**148**
Sedimento marino	1 esterasa (alcalina) con actividad 3-oxoadipato enol-lactonasa	**149**
Tubo digestivo conejo	4 endo-β-1,4-glucanasas de las familias 3 y 5 capaces de hidrolizar enlaces beta 1,3-, 1,4- y 1-6	**150**
Fuente termal	1 esterasa (hipertermofílica)	**151**
Sedimento marino	1 metalo-proteasa capaz de hidrolizar azocaseina y fibrina	**152**
Lago hipersalino, alcalino	2 quitinasas (familias 18 y 20)	**153**
Suelo y compost	12 esterasas, una 1,2-dioxigenasa (hogentisato) y 1 amidasa	**154**
Suelo contaminado	1 decarboxilasa capaz de catalizar la decarboxilación de L-cisteina a cisteamina	**155**
Suelo forestal	4 lipasas (familia HSL)	**156**
Bioreactores de minería	3 sulfuro oxigenasas-reductasas	**157**
Suleo contaminado con petróleo	1 naftaleno oxidoreductasa capaz de catalizar la conversión de naftaleno a salicilato	**158**
Suelo	1 estireno monooxigenasa que cataliza la epoxidación de estireno y derivados para formar los (S)-epóxidos correspondientes	**159**
Sedimento marino	1 esterasa	**160**
Sedimento marino	2 alcano hidroxilasas, 9 dehidrogenasas, , 1 proteasa, 2 oxidoreductasa, 1 amidasa, 1 dioxigenasa, 1 aril-sulfatasa, 1 beta-lactamasa y 2 hidrolasas	**161**
Fuente termal (Tailandia)	1 fosfolipasa y 1 esterasa (termoestables) activas a pH alcalinos	**162**
Mar de China	2 esterasas	**163**

Sedimento de estuario	4-clorobenzoato dehalogenasa	**164**
Compost	1 poli(DL-lactico) depolimerasa	**165**
Suelo	2 esterasa (piretroides y piretrinas)	**166**
Suelo	4 nuevas 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD) que convierten 4-hidroxifenilpiruvato en homogentisato.	**167**
Suelo	1 celulasa	**168**
Suelo	1 xilanasa	**169**
Suelo forestal	6 lipasas, cuatro de ellas de la familia 4 y dos de la familia 2	**170**
Suelo	1 N-acilhomoserina lactonasa (NAHL)	**171**
Agua del Río Ganges	1 esterasa y 1 dehidrogenasa	**172**
Suelo	2 lipasas	**173**
Suelo	2 metalo-proteasas	**174**
Sedimento de río contaminado	1 bifenil-dioxigenasa	**124**
Planta de tratamiento de aguas	38 extradiol dioxigenasas	**175**
Compost	3 endoglucanasas (familia 5)	**176**
Suelo	2 extradiol 1,2-dioxigenasa	**177**
Suelo antárctico	1 esterasa halotolerante alcalina (nueva familia)	**178**
Rumen de búfalo	14 cellulasas (ácidas)	**179**
Suelo	1 lisina racemasa	**180**
Suelo contaminado	8 extradiol dioxigenasa	**181**
Rumen bovino	3,5,6-tricloro-2-piridinol hidrolasa	**182**
Planta de tratamiento de aguas	1 esterasa estable en presencia de detergentes y metales	**183**

Suelo de manglar	1 oxidasa multicobre	**184**
Suelo antárctico	1 lipasa	**185**
Sedimento marino	15 lipasas	**186**
Mar de Sargaso	1 hidrogenasa	**187**
Sedimento marino	14 PAH dioxigenasas	**188**
Reactor enriquecido en biomasa	1 lipasa (alcalina y termoestable)	**189**
Rumen de vaca	2 lipasas	**190**
Muestras varias	6 agarasas, 55 amilasas, 27 celulasas, 11 quitinasas, 1 ciclodextrinasa y 17 esterasas	**191**
Sedimento marino	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	**192**
Sedimento marino	1 lipasa (activa a baja temperatura)	**193**
Suelo	64 quitinasas	**194**
Suelo	1 amilasa	**195**
Compost	1 esterasa (familia VIII) activa en presencia de 5-30% disolventes	**196**
Intestino gusano de tierra	**1 feruloil esterasa**	**197**

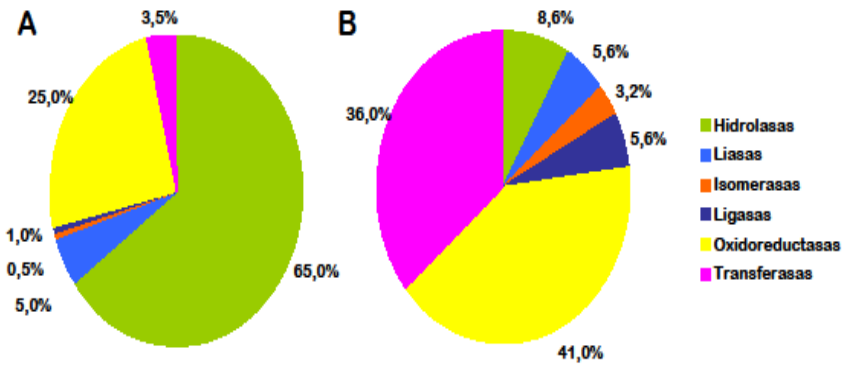


Figura 4.- Distribución de enzimas empleadas en biotransformaciones industriales (A) y enzimas presentes en (meta-) genomas bacterianos (B).

En particular, hidrolasas seguidas de oxido-reductasas y en menor medida liasas son las enzimas más utilizadas a escala industrial, mientras que los (meta-) genomas contienen un mayor número de oxido-reductasas y transferasas en comparación con otras actividades de interés (37).

Hasta la fecha, los datos bibliográficos indican que se han identificado y caracterizado aproximadamente 1.400 enzimas de microorganismos no cultivables mediante la aplicación de técnicas (meta-) genómicas, con un 10% de las mismas aisladas en el último año (Tabla I). En este sentido, pese al enorme potencial de esta técnica para el desarrollo de nuevos biocatalizadores existe una limitación en lo que se refiere al número de enzimas activas, es decir, el acceso a nuevos biocatalizadores mediante análisis (meta-) genómicos está sobreestimado (106). Así, se ha estimado que solo el 0,000001% de las enzimas presentes en (meta-) genomas microbianos pueden ser identificadas por métodos de tamizado convencional. Por ejemplo, en una muestra que contiene 1.000.000 de microorganismos y un total de aprox. 2.000.000.000 de genes, el 20% de los cuales codifica proteínas con actividad enzimática, solo 400 de ellas pueden ser identificadas, lo que limita el poder de las técnicas basadas en el tamizado por actividad (114). Sin embargo, estimaciones actuales indican que pese a los grandes esfuerzos en proyectos de mega secuenciación la identificación de nuevas familias de proteínas es lineal, lo que indica que los microorganismos continuarán siendo una fuente de nuevos biocatalizadores en el futuro (122). Como muchos de estos genes son enteramente novedosos, sus actividades no pueden inferirse por comparación con proteínas conocidas en bases de datos, y por lo tanto se han de desarrollar métodos funcionales para la identificación y futura caracterización de los mismos (117). Esto implica el desarrollo de métodos de tamizado de alto rendimiento (29).

La aplicación de métodos de tamizado por actividad y no por homología (32), accesibles a gran escala mediante el uso de sustratos cromogénicos y fluorogénicos, permiten analizar decenas de miles de clones en un solo ensayo (**Figura 1**), independientemente de las secuencia de los mismos. Las metodologías de tamizado y selección deben cumplir una serie de requisitos: (i) deben, si es

posible, seleccionar directamente la propiedad de interés – se selecciona lo que se busca, es una de las reglas principales en cualquier programa de búsqueda de enzimas; (ii) el ensayo debe ser lo más sensible posible en un rango adecuado y dinámico; (iii) el método debe ser aplicable en formato de alto rendimiento.

Se han diseñado numerosos ensayos para detectar actividades enzimáticas en medio de agar sólido (empleando colonias) o en líquido (empleando lisados celulares) mediante la producción de un fluoróforo o un cromóforo (25-27). Los ensayos en medio agar-sólido permiten rastrear unas 10.000 colonias al día, pero están muy limitados por la baja sensibilidad. Así, los productos de reacción difunden de la colonia y solo aquellas enzimas muy activas se detectan. Ejemplos clásicos de métodos de tamizado colorimétrico consisten en la suplementación de los medios de cultivo con tributirina para detectar actividad lipasa mediante la presencia de halos correspondientes a la hidrólisis del sustrato. El rango de aplicación de los ensayos en medio líquido es mucho más amplio, pero su aplicación en formato de alto rendimiento es todavía muy limitado: en ausencia de sofisticados sistemas robóticos que son inaccesibles a laboratorios académicos, solo se pueden rastrear de media los extractos de 1.000 a 10.000 clones (30). Esto convierte a ambos sistemas en métodos de bajo-medio rendimiento.

Para generar una librería (meta-) genómica efectiva, se necesitan métodos alternativos que permitan enriquecer la muestra en genomas individuales (114). El gen que codifica un biocatalizador de interés puede representar en muchos casos una fracción muy pequeña, en algunos casos menos del 0,01%, del total representado en la muestra y por lo tanto la baja proporción del gen en la librería juega un papel crítico en los programas de búsqueda de biocatalizadores (38). Por esta razón, se han desarrollado métodos de enriquecimiento alternativo (123), dependientes o independientes de la secuencia de ADN, como por ejemplo el método basado en el enriquecimiento del cultivo mediante el uso de medios selectivos o el marcaje isotópico (SIP: Stable Isotope Probing). Sin embargo, el inconveniente principal de esta técnica es el peligro de enriquecer la muestra en organismos de crecimiento rápido que no utilizan los nutrientes suplementados, la baja eficiencia en el marcaje y la posibilidad de un marcaje indirecto de

microorganismos que no utilizan el sustrato marcado directamente pero si utilizan intermediarios del mismo (34, 124).

El tamizado clásico funcional acoplado con técnicas innovadoras tales como la expresión inducida de genes por sustrato (SIGEX) (125, 126), la pre-amplificación inversa por PCR (PAI-PCR) (127) y el barajado de ADN (meta-) genómico (129), pueden incrementar las posibilidades de los tamizados. De entre ellos, el método de mayor relevancia para la identificación de biocatalizadores es el SIGEX, que se desarrolló inicialmente para detectar clones que expresan genes catabólicos inducidos por la presencia de un sustrato usando una proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero (125, 126). Los clones que contienen genes expresados constitutivamente se separan inicialmente mediante Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) y a continuación los genes deseados se inducen mediante la incorporación del sustrato de interés seguido de una separación por FACS. Utilizando este sistema, que permite analizar hasta 150 mil clones con un tamaño medio de inserto de 7 mil pares de bases en 17 días, se han identificado genes involucrados en la degradación de benzoato y catecol en una muestra obtenida de agua superficial. Pese a que el sistema puede ser aplicado en un formato de alto rendimiento, una de las mayores limitaciones es que solo se pueden detectar genes que son inducidos por ciertos sustratos, hecho éste que ocurre en un limitado número de actividades (menos del 0,2% total).

Otros métodos de tamizado, se basan en el tamizado fenotípico donde se introduce una ruta catabólica en un huésped para monitorizar posteriormente el crecimiento de las colonias frente a un sustrato inaccesible a dicha bacteria. Una modificación de este método es el uso de cepas modificadas en las que una actividad particular está ausente y la re-introducción de dicha actividad mediante la clonación de fragmentos de ADN (meta-) genómico permitiría identificar colonias que contengan el gen de interés. Este sistema permite rastrear la actividad mediante el método sencillo de crecimiento o no crecimiento, que se puede acoplar con espectrometría de masas para identificar diferencias en los productos de reacción de miles de clones (129).

12. BIOCATALIZADORES DESARROLLADOS POR (META-) GENÓMICA

Como se muestra en la Tabla 1, las actividades enzimáticas más estudias e identificadas por métodos (meta-) genómicos son hidrolasas que incluyen esterasas, lipasas, glicosil hidrolasas (celulasas, glucosidasas y xilanasas, por citar las más estudiadas) y lactonasas, seguidas de oxidoreductasas, incluyendo mono- y dioxigenasas. Estas dos superfamilias de enzimas constituyen los dos tipos de biocatalizadores más empleados en la industria (3).

Además de estas enzimas, Xu et al. (161) han identificado una serie de alcano hidroxilasas de sedimentos marinos profundos capaces de realizar oxigenaciones terminales. Un ejemplo que muestra la versatilidad de los (meta-) genomas microbianos como factorias enzimáticas es la habilidad que presenta la bacteria *E. coli* para transformar una gran variedad de compuestos aromáticos (desde catecol a 2,3-dihidroxibifenol) cuando expresa 38 extradiol dioxigenasas aisladas de una planta de tratamiento de aguas (145). También se ha desarrollado otra ruta de síntesis que comienza con L-cisteina y utiliza una decarboxilasa de suelos alcalinos contaminados (155) para generar cisteamina, un importante terapéutico. Más recientemente el grupo del Prof. Jaeger ha construido un conjunto de cepas de la bacteria *E. coli* que expresan una variedad de enzimas con potencial en biotransformaciones industriales, incluídas, benzaldehído liasas, benzoilformato decarboxilasas, hidroxinitrilo liasas y alcohol dehidrogenasas, que producen benzaldehído mediante la conversión de benzoína, benzoilformato, mandelonitrilo, o benzoil alcohol, respectivamente (198). Aunque estos estudios muestran el potencial de las enzimas obtenidas por (meta-) genómica, se han de realizar esfuerzos adicionales para potenciar el uso y la aplicación de las mismas a escala industrial. Así, hasta la fecha, solo una esterasa de un microorganismo no cultivado capaz de degradar ésteres de tereftalato, un importante componente de bio-plásticos, ha sido empleado en la industria (199).

13. DEL DESCUBRIMIENTO A LA COMERCIALIZACIÓN: UNA VISIÓN DE FUTURO SOBRE LA (META-) GENÓMICA DEL SIGLO XXI

En particular, El informe de las Sociedades de Microbiología señala que menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos son conocidas, y que millones de especies microbianas permanecen desconocidas, por lo que es grande el potencial de los microorganismos como proveedores de biocatalizadores. Sin embargo, la complejidad de las muestras ambientales como portadoras de microorganismos ha proporcionado una visión del mundo microbiano como una "caja negra" de la cual se sabía que contenía una serie de funciones o actividades aunque no se conociese su contenido. Las aproximaciones (meta-) genómicas acopladas con nuevas herramientas de producción y empleo en biotransformaciones de los nuevos biocatalizadores identificados, permiten acceder al potencial de los organismos no cultivados. Este punto es de especial interés dado que en la actualidad el tiempo transcurrido entre la identificación de una enzima hasta su producción a escala es de aproximadamente 12 meses, casi tres veces inferior al necesario hace una década y cinco veces inferior al de principios de la década de los noventa. El descubrimiento de una enzima es seguido por un proceso de escalado, que normalmente incluye una selección y evaluación del organismo productor, un desarrollo de la fermentación y una optimización a escala de 2 L. Posteriormente, se sigue con una fermentación microbiana a escala piloto (500-2000 L), durante las cuales se producen pruebas para control de calidad y determinación del rendimiento. Finalmente la producción se realiza a escala de hasta 160.000 L para la aplicación industrial de la enzima. Pese a que este procedimiento está bien establecido, hasta la fecha no existe ningún ejemplo de producción de una enzima obtenida por métodos (meta-) genómicos a tal escala, y por lo tanto, se ha de trabajar en esta dirección.

14. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha contado con el apoyo económico de los siguientes proyectos: CSD2007-00005, BIO2006-11738, GEN2006-27750-C-4-E, BFU2008-04398-E/BMC, CTQ2007-60480/BQU y KBBE-226977. M-E.G., agradece al CSIC la beca JAE.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Nedwin, G. E. (1997) Using Enzymes as Benign Substitutes for Synthetie Chemicals and Harsh Conditions in Industrial Processes Biotech (pp. 13-32) Tile Sustainable Environment.

2. Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, 13(4), 345-351.

3. Beloqui, A., de Maria, P. D., Golyshin, P. N., & Ferrer, M. (2008). Recent trends in industrial microbiology. Current Opinion Microbiology, 11(3), 240-248.

4. Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., & Golyshin, P. N. (2007). Mining enzymes from extreme environments. Current Opinion Microbiology, 10(3), 207-214.

5. Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., & Ballesteros, A. (2006). Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. Trends in Biotechnology, 24(6), 281-287

6. Gernaey, K. V., Lantz, A. E., Tufvesson, P., Woodley, J. M., & Sin, G. (2010). Application of mechanistic models to fermentation and biocatalysis for next-generation processes. Trends in Biotechnology.

7. Prieto, M. A. (2007). From oil to bioplastics, a dream come true? Jornal of Bacteriology, 189(2), 289-290.

8. Lee, M. Y., Park, C. B., Dordick, J. S., & Clark, D. S. (2005). Metabolizing enzyme toxicology assay chip (MetaChip) for high-throughput microscale toxicity analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(4), 983-987.

9. Alvaro-Benito, M., de Abreu, M., Fernandez-Arrojo, L., Plou, F. J., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A., et al. (2007). Characterization of a beta-fructofuranosidase from Schwanniomyces occidentalis with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. Journal of Biotechnology, 132(1), 75-81.

10. Weiner, B., Szymanski, W., Janssen, D. B., Minnaard, A. J., & Feringa, B. L. (2010). Recent advances in the catalytic asymmetric synthesis of beta-amino acids. Chemical Society Reviews, 39(5), 1656-1691.

11. Weiner, B., Szymanski, W., Janssen, D. B., Minnaard, A. J., & Feringa, B. L. (2010). Recent advances in the catalytic asymmetric synthesis of beta-amino acids. Chemical Society Reviews, 39(5), 1656-1691.

12. Fiammengo, R., & Jaschke, A. (2005). Nucleic acid enzymes. Current Opinion in Biotechnology, 16(6), 614-621.

13. Davis, B. G., & Boyer, V. (2001). Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. Natural Product Reports, 18(6), 618-640.

14. Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature, 409(6817), 241-246.

15. Hudson, E. P., Eppler, R. K., & Clark, D. S. (2005). Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. Current Opinion in Biotechnology, 16(6), 637-643.

16. Nobeli, I., Favia, A. D., & Thornton, J. M. (2009). Protein promiscuity and its implications for Biotechnologyogy. Nature Biotechnology, 27(2), 157-167.

17. Steele, H. L., Jaeger, K. E., Daniel, R., & Streit, W. R. (2009). Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 16(1-2), 25-37.

18. Ferrer, M., Beloqui, A., Golyshin, P.N. Microbial metagenomes: moving forward industrial biotechnology. Journal of Chemical Technology and Biotechnology (2007) 82: 421-423.

19. Bull, A. T. (2003) Microbial Diversity and Bioprospecting American Society For Microbiology

20. Lee, H. S., Kwon, K. K., Kang, S. G., Cha, S. S., Kim, S. J., & Lee, J. H. (2010). Approaches for novel enzyme discovery from marine environments. Current Opinion in Biotechnology.

21. Vorgias, C. E., and G. Antranikian. (2004) Extremophiles: pH, Temperature, and Salinity. Microbial Diversity and Bioprospecting. ASM Press, Washington, D.C., pp. 146-153.

22. Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzeby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., et al. (2008). The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. System Applied Microbiology, 31(4), 241-250.

23. Raymond, J. (2008). Coloring in the tree of life. Trends in Microbiology, 16(2), 41-43.

24. Tamames, J., Abellan, J. J., Pignatelli, M., Camacho, A., & Moya, A. (2010). Environmental distribution of prokaryotic taxa. BMC Microbiology, 10, 85.

25. Bornscheuer, U. T. (2002). Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. Current Opinion in Biotechnology, 13(6), 543-547.

26. Goddard, J. P., & Reymond, J. L. (2004). Enzyme assays for high-throughput screening. Current Opinion in Biotechnology, 15(4), 314-322.

27. Andexer, J., Guterl, J. K., Pohl, M., & Eggert, T. (2006). A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity. Chemical Communications (Camb)(40), 4201-4203.

28. Pham, V. D., Palden, T., & DeLong, E. F. (2007). Large-scale screens of metagenomic libraries. Journal of Visualized Experiments(4), 201.

29. Ferrer, M., Beloqui, A., Vieites, J.M., Guazzaroni, M.E., Berger, I., Aarón, A. (2008) Interplay of metagenomics and in vitro compartmentalization. Microbial Biotechnology 2:31-39.

30. Geddie, M. L., Rowe, L. A., Alexander, O. B., & Matsumura, I. (2004). High throughput microplate screens for directed protein evolution. Methods Enzymology, 388, 134-145.

31. Dalbege, H., and L. Lange. (1998) Using Molecular Techniques to Identify New Microbial Biocatalysts. Trends in Biotechnology 16: 265-272.

32. Kotik, M. (2009). Novel genes retrieved from environmental DNA by polymerase chain reaction: current genome-walking techniques for future metagenome applications. Journal of Biotechnology, 144(2), 75-82.

33. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

34. Beloqui, A., Zumárraga, M., Alcalde, M., Golyshin, P., Ferrer, M. (2008) Microbes and enzymes: recent trends and new directions to expand protein space. In: Handbook of Protein Engineering (John Wiley & Sons GmbH, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA) 1: 233–264.

35. Schiilein, M. (1996) Novel Endoglucanases. Novo Nordisk A/S. Patents WO 96/29379 and U.S. 6,001,639

36. Nielsen, P., and B. R. Jrgensen. (2001) Method for Genome Mining for secreted Protein Genes. Patent WO 01/98484, (pp. 1-43).

37. Vieites, J. M., Guazzaroni, M. E., Beloqui, A., Golyshin, P. N., & Ferrer, M. (2009). Metagenomics approaches in systems microbiology. FEMS Microbiology Reviews, 33(1), 236-255.

38. Gabor, E., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J., & Lorenz, P. (2007). Updating the metagenomics toolbox. Biotechnology Journal, 2(2), 201-206.

39. Schloss, P.D. and Handelsman, J. (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. Current Opinion in Biotechnology 14, 303-310

40. Gabor, E. M., de Vries, E. J., & Janssen, D. B. (2004). Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. Environmental Microbiology, 6(9), 948-958.

41. Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2008). Microbiology: metagenomics. Nature, 455(7212), 481-483.

42. Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., et al. (2008). The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics, 9, 386.

43. Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. N Biotechnology, 25(4), 195-203.

44. Fox, S., Filichkin, S., & Mockler, T. C. (2009). Applications of ultra-high-throughput sequencing. Methods in Molecular Biology, 553, 79-108.

45. Steward, G. F., & Rappe, M. S. (2007). What's the 'meta' with metagenomics? Isme Journal, 1(2), 100-102.

46. Guazzaroni, M.E., Beloqui, A., Ferrer, M. (2009) Metagenomics as a new technological tool to gain scientific knowledge. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 945–954.

47. Lorenz, P., & Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. Nature Reviews Microbiology, 3(6), 510-516.

48. Bertin, P.N., Medigue, C., & Normand, P. (2008). Advances in environmental genomics: towards an integrated view of micro-organisms and ecosystems. Microbiology 154, 347-359.

49. Ingham, C. J., Sprenkels, A., Bomer, J., Molenaar, D., van den Berg, A., van Hylckama Vlieg, J. E., et al. (2007). The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(46), 18217-18222.

50. Valdivia-Granda, W. (2008). The next meta-challenge for Bioinformatics. Bioinformation, 2(8), 358-362.

51. Chen, K., & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. PLoS Computational Biology, 1(2), 106-112.

52. Raes, J., & Bork, P. (2008). Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. Nature Reviews Microbiology, 6(9), 693-699.

53. Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., & Hugenholtz, P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4), 557-578, Table of Contents.

54. Huson, D.H., Richter, D.C., Mitra, S., Auch, A.F., Schuster, S.C. (2009) Methods for comparative metagenomics. BMC Bioinformatics 10 (Suppl 1):S12.

55. Li W. 2009. Analysis and comparison of very large metagenomes with fast clustering and functional annotation. BMC Bioinformatics 10:359.

56. Sterk, P., Hirschman, L., Field, D., & Wooley, J. (2010). Genomic standards consortium workshop: metagenomics, metadata and metaanalysis (m3). Pacific Symposium on Biocomputing, 481-484.

57. Walker, A. (2010). A glut from the gut: metagenomics takes a giant step foward. Nature Reviews Microbiology, 8(5), 315.

58. Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K. & Yamane K. (2000) Proteome Analysis of Bacillus subtilis Extracellular Proteins: a Two-Dimensional Protein Electrophoretic Study. Microbiology. U.K., 146: 65-75.

59. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature, 390(6657), 249-256.

60. Dunn-Coleman, N., & Prade, R. (1998). Toward a global filamentous fungus genome sequencing effort. Nature Biotechnology, 16(1), 5.

61. Roberts, R. J. (2004). Identifying protein function--a call for community action. PLoS Biology, 2(3), E42.

62. Sleator, R. D., & Walsh, P. (2010). An overview of in silico protein function prediction. Archives of Microbiology, 192(3), 151-155.

63. Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., & Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annu Rev Microbiol, 40, 337-365.

64. Liolios, K., Mavromatis, K., Tavernarakis, N., & Kyrpides, N. C. (2008). The Genomes On Line Database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. Nucleic Acids Research, 36(Database issue), D475-479.

65. Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., et al. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. PLoS Biology, 5(3), e77.

66. Wilmes, P., Andersson, A. F., Lefsrud, M. G., Wexler, M., Shah, M., Zhang, B., et al. (2008). Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. Isme Journal, 2(8), 853-864.

67. Verberkmoes, N. C., Russell, A. L., Shah, M., Godzik, A., Rosenquist, M., Halfvarson, J., et al. (2009). Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. Isme Journal, 3(2), 179-189.

68. Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., et al. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. Nature, 428(6978), 37-43.

69. Beloqui, A., Guazzaroni, M.E., Ferrer, M. (2010) Procedures for protein isolation in pure culture and microbial communities. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer Verlag Press.

70. Blackstock, W. P., & Weir, M. P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends in Biotechnology, 17(3), 121-127.

71. Harris, P. (2004) Proteomics as a Tool for Enzyme Discovery in Filamentous Fungi - Applications in Lignocellulose Degradation for Sugar and Fuel Ethanol Production. 1st International Fungal Proteomics Symposium, Portland, OR.

72. Benndorf, D., Vogt, C., Jehmlich, N., Schmidt, Y., Thomas, H., Woffendin, G., et al. (2009). Improving protein extraction and separation methods for investigating the metaproteome of anaerobic benzene communities within sediments. Biodegradation, 20(6), 737-750.

73. Parro, V., Moreno-Paz, M., & Gonzalez-Toril, E. (2007). Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays. Environmental Microbiology, 9(2), 453-464.

74. Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W., et al. (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(10), 3805-3810.

75. Moran, A.M. (2009) Metatranscriptomics: Eavesdropping on Complex Microbial Communities. Microbe 4: 329-335.

76. Bailly, J., Fraissinet-Tachet, L., Verner, M. C., Debaud, J. C., Lemaire, M., Wesolowski-Louvel, M., et al. (2007). Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. Isme Journal, 1(7), 632-642.

77. Feist, A. M., Herrgard, M. J., Thiele, I., Reed, J. L., & Palsson, B. O. (2009). Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. Nature Reviews Microbiology, 7(2), 129-143.

78. Gao, H., Yang, Z. K., Gentry, T. J., Wu, L., Schadt, C. W., & Zhou, J. (2007). Microarray-based analysis of microbial community RNAs by whole-community RNA amplification. Applied and Environmental Microbiology, 73(2), 563-571.

79. Daran-Lapujade, P., Rossell, S., van Gulik, W.M., Luttik, M.A., de Groot, M.J., et al. (2007). The fluxes through glycolytic enzymes in Saccharomyces cerevisiae are predominantly regulated at posttranscriptional levels. Proceeding of the National Academy of Science USA 104, 15753-15758.

80. Warnecke, F., & Hess, M. (2009). A perspective: metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. Journal of Biotechnology, 142(1), 91-95.

81. Yaver, D. S. (2003) Global Expression Profiling of the Lignin Degrading Fungus Ceriporiopsis subvermispom for the Discovery of Novel Enzymes. Applied Mvcologv and Biotecli., 4, Fungal Genomics. Elsevier Science, Amsterdam.

82. Nicholson, J. K., & Lindon, J. C. (2008). Systems biology: Metabonomics. Nature, 455(7216), 1054-1056.

83. Kalyuzhnaya, M. G., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A. C., McHardy, A. C., Szeto, E., et al. (2008). High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. Nature Biotechnology, 26(9), 1029-1034.

84. Dick, G. J., Andersson, A. F., Baker, B. J., Simmons, S. L., Thomas, B. C., Yelton, A. P., et al. (2009). Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. Genome Biology, 10(8), R85.

85. Gerlach, W., Junemann, S., Tille, F., Goesmann, A., & Stoye, J. (2009). WebCARMA: a web application for the functional and taxonomic classification of unassembled metagenomic reads. BMC Bioinformatics, 10, 430.

86. Krause, L., Diaz, N. N., Bartels, D., Edwards, R. A., Puhler, A., Rohwer, F., et al. (2006). Finding novel genes in bacterial communities isolated from the environment. Bioinformatics, 22(14), e281-289.

87. Monzoorul Haque, M., Ghosh, T. S., Komanduri, D., & Mande, S. S. (2009). SOrt-ITEMS: Sequence orthology based approach for improved taxonomic estimation of metagenomic sequences. Bioinformatics, 25(14), 1722-1730.

88. Bork, P., Ouzounis, C., Sander, C. (1994) From Genome Sequences to Protein Function. Current Opinion in Structural Biology 4 (3), 393-403

89. Harrington, E. D., Singh, A. H., Doerks, T., Letunic, I., von Mering, C., Jensen, L. J., et al. (2007). Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(35), 13913-13918.

90. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 437(7057), 376-380.

91. Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., & Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. Genome Research, 17(3), 377-386.

92. Pop, M. (2009). Genome assembly reborn: recent computational challenges. Briefings in Bioinformatics, 10(4), 354-366.

93. Desai, C., Pathak, H., & Madamwar, D. (2010). Advances in molecular and "-omics" technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. Bioresource Technology, 101(6), 1558-1569.

94. de Lorenzo, V. (2008). Systems biology approaches to bioremediation. Current Opinion in Biotechnology, 19(6), 579-589.

95. Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., et al. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science, 304(5667), 66-74.

96. Edwards, R. A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D. M., et al. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. BMC Genomics, 7, 57.

97. Bidle, K. D., Lee, S., Marchant, D. R., & Falkowski, P. G. (2007). Fossil genes and microbes in the oldest ice on earth. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(33), 13455-13460.

98. Gianoulis, T. A., Raes, J., Patel, P. V., Bjornson, R., Korbel, J. O., Letunic, I., et al. (2009). Quantifying environmental adaptation of metabolic pathways in metagenomics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(5), 1374-1379.

99. Markowitz, V. M., Ivanova, N. N., Szeto, E., Palaniappan, K., Chu, K., Dalevi, D., et al. (2008). IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. Nucleic Acids Research, 36(Database issue), D534-538.

100. Seshadri, R., Kravitz, S. A., Smarr, L., Gilna, P., & Frazier, M. (2007). CAMERA: a community resource for metagenomics. PLoS Biology, 5(3), e75.

101. Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics, 9, 75.

102. Teeling, H., Waldmann, J., Lombardot, T., Bauer, M., & Glockner, F. O. (2004). TETRA: a web-service and a stand-alone program for the analysis and comparison of tetranucleotide usage patterns in DNA sequences. BMC Bioinformatics, 5, 163.

103. McHardy, A. C., & Rigoutsos, I. (2007). What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples. Current Opinion Microbiology, 10(5), 499-503.

104. Krause, L., Diaz, N. N., Goesmann, A., Kelley, S., Nattkemper, T. W., Rohwer, F., et al. (2008). Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments. Nucleic Acids Research, 36(7), 2230-2239.

105. Hoff, K. J., Tech, M., Lingner, T., Daniel, R., Morgenstern, B., & Meinicke, P. (2008). Gene prediction in metagenomic fragments: a large scale machine learning approach. BMC Bioinformatics, 9, 217.

106. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25(17), 3389-3402.

107. Raes, J., Foerstner, K. U., & Bork, P. (2007). Get the most out of your metagenome: computational analysis of environmental sequence data. Current Opinion Microbiology, 10(5), 490-498.

108. Gomez-Alvarez, V., Teal, T. K., & Schmidt, T. M. (2009). Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. Isme Journal, 3(11), 1314-1317.

109. Hoff, K. J. (2009). The effect of sequencing errors on metagenomic gene prediction. BMC Genomics, 10, 520.

110. Garcia Martin, H., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K. W., McHardy, A. C., et al. (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. Nature Biotechnology, 24(10), 1263-1269.

111. Sanapareddy, N., Hamp, T. J., Gonzalez, L. C., Hilger, H. A., Fodor, A. A., & Clinton, S. M. (2009). Molecular diversity of a North Carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing. Applied and Environmental Microbiology, 75(6), 1688-1696.

112. Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N. N., et al. (2009). A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. Nature, 462(7276), 1056-1060.

113. Sharma, V. K., Kumar, N., Prakash, T., & Taylor, T. D. (2010). MetaBioME: a database to explore commercially useful enzymes in metagenomic datasets. Nucleic Acids Research, 38(Database issue), D468-472.

114. Cardenas, E., & Tiedje, J. M. (2008). New tools for discovering and characterizing microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology, 19(6), 544-549.

115. Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2009). Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 16(1-2), 109-123.

116. Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(4), 669-685.

117. Kennedy, J., Marchesi, J. R., & Dobson, A. D. (2008). Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with Biotechnologyogical applications from marine environments. Microbial Cell Factories, 7, 27.

118. Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Golyshina, O. V., Zumarraga, M., et al. (2006). Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. Journal of Biological Chemistry, 281(32), 22933-22942.

119. Bertrand, H., Poly, F., Van, V. T., Lombard, N., Nalin, R., Vogel, T. M., et al. (2005). High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for Biotechnologyogical metagenomic library construction. Journal of Microbiological Methods, 62(1), 1-11.

120. Sauer, U. (2006). Metabolic networks in motion: 13C-based flux analysis. Molecular Systems Biology, 2, 62.

121. Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P., & Simonet, P. (2001). Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. Environmental Microbiology, 3(7), 431-439.

122. Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Konrad-Koszler, M., Weilharter, A., Reichenauer, T. G., Schofer, D., et al. (2006). mRNA-based parallel detection of active methanotroph populations by use of a diagnostic microarray. Applied and Environmental Microbiology, 72(2), 1672-1676.

123. Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., et al. (2004). The Pfam protein families database. Nucleic Acids Research, 32(Database issue), D138-141.

124. Demaneche, S., David, M. M., Navarro, E., Simonet, P., & Vogel, T. M. (2009). Evaluation of functional gene enrichment in a soil metagenomic clone library. Journal of Microbiological Methods, 76(1), 105-107.

125. Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., & Murrell, J. C. (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature, 403(6770), 646-649.

126. Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T., & Watanabe, K. (2005). Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. Nature Biotechnology, 23(1), 88-93.

127. Uchiyama, T., & Watanabe, K. (2008). Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries. Nature Protocols, 3(7), 1202-1212.

128. Yamada, K., Terahara, T., Kurata, S., Yokomaku, T., Tsuneda, S., & Harayama, S. (2008). Retrieval of entire genes from environmental DNA by inverse PCR with pre-amplification of target genes using primers containing locked nucleic acids. Environmental Microbiology, 10(4), 978-987.

129. Boubakri, H., Beuf, M., Simonet, P., & Vogel, T. M. (2006). Development of metagenomic DNA shuffling for the construction of a xenobiotic gene. Gene, 375, 87-94.

130. Northen, T. R., Lee, J. C., Hoang, L., Raymond, J., Hwang, D. R., Yannone, S. M., et al. (2008). A nanostructure-initiator mass spectrometry-based enzyme activity assay. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(10), 3678-3683.

131. Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A., & Daniel, R. (2003). Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology, 69(3), 1408-1416.

132. Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A., & Daniel, R. (2003). Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on Escherichia coli. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 5(1), 46-56.

133. Lee, S. W., Won, K., Lim, H. K., Kim, J. C., Choi, G. J., & Cho, K. Y. (2004). Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6), 720-726.

134. Walter, J., Mangold, M., & Tannock, G. W. (2005). Construction, analysis, and beta-glucanase screening of a bacterial artificial chromosome library from the large-bowel microbiota of mice. Applied and Environmental Microbiology, 71(5), 2347-2354.

135. Ranjan, R., Grover, A., Kapardar, R. K., & Sharma, R. (2005). Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. Biochemical and Biophysical Research Communications, 335(1), 57-65.

136. Erwin, D. P., Erickson, I. K., Delwiche, M. E., Colwell, F. S., Strap, J. L., & Crawford, R. L. (2005). Diversity of oxygenase genes from methane- and ammonia-oxidizing bacteria in the Eastern Snake River Plain aquifer. Applied and Environmental Microbiology, 71(4), 2016-2025.

137. Cottrell, M. T., Yu, L., & Kirchman, D. L. (2005). Sequence and expression analyses of Cytophaga-like hydrolases in a Western arctic metagenomic library and the Sargasso Sea. Applied and Environmental Microbiology, 71(12), 8506-8513.

138. Ferrer, M., Golyshina, O. V., Chernikova, T. N., Khachane, A. N., Reyes-Duarte, D., Santos, V. A., et al. (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. Environmental Microbiology, 7(12), 1996-2010.

139. Reyes-Duarte, D., Polaina, J., Lopez-Cortes, N., Alcalde, M., Plou, F. J., Elborough, K., et al. (2005). Conversion of a carboxylesterase into a triacylglycerol lipase by a random mutation. Angewandte Chemie International Edition England, 44(46), 7553-7557.

140. Ferrer, M., Beloqui, A., Golyshina, O. V., Plou, F. J., Neef, A., Chernikova, T. N., et al. (2007). Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. Biotechnology Journal, 2(2), 207-213.

141. Lopez-Cortes, N., Reyes-Duarte, D., Beloqui, A., Polaina, J., Ghazi, I., Golyshina, O. V., et al. (2007). Catalytic role of conserved HQGE motif in the CE6 carbohydrate esterase family. FEBS Letters, 581(24), 4657-4662.

142. Ferrer, M., Golyshina, O. V., Chernikova, T. N., Khachane, A. N., Martins Dos Santos, V. A., Yakimov, M. M., et al. (2005). Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. Chemistry & Biology, 12(8), 895-904.

143. Roh, C., Villatte, F., Kim, B. G., & Schmid, R. D. (2007). Screening and purification for novel cytochrome b5 from uncultured environmental micro-organisms. Letters in Applied Microbiology, 44(5), 475-480.

144. Lee, M. H., Lee, C. H., Oh, T. K., Song, J. K., & Yoon, J. H. (2006). Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology, 72(11), 7406-7409.

145. Kim, Y. J., Choi, G. S., Kim, S. B., Yoon, G. S., Kim, Y. S., & Ryu, Y. W. (2006). Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. Protein Expression and Purification, 45(2), 315-323.

146. Suenaga, H., Ohnuki, T., & Miyazaki, K. (2007). Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. Environmental Microbiology, 9(9), 2289-2297.

147. Shimamura, M., Nishiyama, T., Shigetomo, H., Toyomoto, T., Kawahara, Y., Furukawa, K., et al. (2007). Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology, 73(4), 1065-1072.

148. Roh, C., & Villatte, F. (2008). Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. Journal of Applied Microbiology, 105(1), 116-123.

149. Pearson, A., Flood Page, S. R., Jorgenson, T. L., Fischer, W. W., & Higgins, M. B. (2007). Novel hopanoid cyclases from the environment. Environmental Microbiology, 9(9), 2175-2188.

150. Park, S. Y., Kim, J. T., Kang, S. G., Woo, J. H., Lee, J. H., Choi, H. T., et al. (2007). A new esterase showing similarity to putative dienelactone hydrolase from a strict marine bacterium, Vibrio sp. GMD509. Applied Microbiology and Biotechnology, 77(1), 107-115.

151. Feng, Y., Duan, C. J., Pang, H., Mo, X. C., Wu, C. F., Yu, Y., et al. (2007). Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. Applied Microbiology and Biotechnology, 75(2), 319-328.

152. Byun, J. S., Rhee, J. K., Kim, N. D., Yoon, J., Kim, D. U., Koh, E., et al. (2007). Crystal structure of hyperthermophilic esterase EstE1 and the relationship between its dimerization and thermostability properties. BMC Structural Biology, 7, 47.

153. Couto, G.H., Glogauer, A., Faoro, H., Chubatsu, L.S., Souza, E.M., & Pedrosa, F.O. (2010). Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. *Genetics and Molecular Research* 9(1), 514-523.

154. LeCleir, G. R., Buchan, A., Maurer, J., Moran, M. A., & Hollibaugh, J. T. (2007). Comparison of chitinolytic enzymes from an alkaline, hypersaline lake and an estuary. Environmental Microbiology, 9(1), 197-205.

155. Lammle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., et al. (2007). Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. Journal of Biotechnology, 127(4), 575-592.

156. Jiang, C., & Wu, B. (2007). Molecular cloning and functional characterization of a novel decarboxylase from uncultured microorganisms. Biochemical and Biophysical Research Communications, 357(2), 421-426.

157. Hong, K. S., Lim, H. K., Chung, E. J., Park, E. J., Lee, M. H., Kim, J. C., et al. (2007). Selection and characterization of forest soil metagenome genes encoding lipolytic enzymes. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17(10), 1655-1660.

158. Chen, Z. W., Liu, Y. Y., Wu, J. F., She, Q., Jiang, C. Y., & Liu, S. J. (2007). Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(3), 688-698.

159. Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., & Tsuda, M. (2007). Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(2), 501-510.

160. van Hellemond, E. W., Janssen, D. B., & Fraaije, M. W. (2007). Discovery of a novel styrene monooxygenase originating from the metagenome. Applied and Environmental Microbiology, 73(18), 5832-5839.

161. Hardeman, F., & Sjoling, S. (2007). Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. FEMS Microbiology Ecology, 59(2), 524-534.

162. Xu, M., Xiao, X., & Wang, F. (2008). Isolation and characterization of alkane hydroxylases from a metagenomic library of Pacific deep-sea sediment. Extremophiles, 12(2), 255-262.

163. Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., et al. (2008). Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. Journal of Biotechnology, 133(1), 42-49.

164. Chu, X., He, H., Guo, C., & Sun, B. (2008). Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. Applied Microbiology and Biotechnology, 80(4), 615-625.

165. Chae, J. C., Song, B., & Zylstra, G. J. (2008). Identification of genes coding for hydrolytic dehalogenation in the metagenome derived from a denitrifying 4-chlorobenzoate degrading consortium. FEMS Microbiology Letters, 281(2), 203-209.

166. Mayumi, D., Akutsu-Shigeno, Y., Uchiyama, H., Nomura, N., & Nakajima-Kambe, T. (2008). Identification and characterization of novel poly(DL-lactic acid) depolymerases from metagenome. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(5), 743-750.

167. Li, G., Wang, K., Liu, Y.H. (2008) Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome. *Microbial Cell Factories 7* (1), 38.

168. Lee, C. M., Yeo, Y. S., Lee, J. H., Kim, S. J., Kim, J. B., Han, N. S., et al. (2008). Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. Biochemical and Biophysical Research Communications, 370(2), 322-326.

169. Kim, S. J., Lee, C. M., Han, B. R., Kim, M. Y., Yeo, Y. S., Yoon, S. H., et al. (2008). Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. FEMS Microbiology Letters, 282(1), 44-51.

170. Hu, Y., Zhang, G., Li, A., Chen, J., & Ma, L. (2008). Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-derived metagenomic library with an efficient approach. Applied Microbiology and Biotechnology, 80(5), 823-830.

171. Song, J.S., Jeon, J.H., Lee, J.H., Jeong, S.H., Jeong, B.C., Kim, S.J., Lee, J.H., & Lee, S.H. (2005). Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *Journal of Microbiology* 43(2), 172-178.

172. Riaz, K., Elmerich, C., Moreira, D., Raffoux, A., Dessaux, Y., & Faure, D. (2008). A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. Environmental Microbiology, 10(3), 560-570.

173. Wu, C., & Sun, B. (2009). Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze river. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19(2), 187-193.

174. Wei, P., Bai, L., Song, W., & Hao, G. (2009). Characterization of two soil metagenome-derived lipases with high specificity for p-nitrophenyl palmitate. Archives of Microbiology, 191(3), 233-240.

175. Waschkowitz, T., Rockstroh, S., & Daniel, R. (2009). Isolation and characterization of metalloproteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries. Applied and Environmental Microbiology, 75(8), 2506-2516.

176. Suenaga, H., Mizuta, S., & Miyazaki, K. (2009). The molecular basis for adaptive evolution in novel extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome. FEMS Microbiology Ecology, 69(3), 472-480.

177. Pang, H., Zhang, P., Duan, C. J., Mo, X. C., Tang, J. L., & Feng, J. X. (2009). Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. Current Microbiology, 58(4), 404-408.

178. Morimoto, S., & Fujii, T. (2009). A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. Applied Microbiology and Biotechnology, 83(2), 389-396.

179. Heath, C., Hu, X. P., Cary, S. C., & Cowan, D. (2009). Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. Applied and Environmental Microbiology, 75(13), 4657-4659.

180. Duan, C. J., Xian, L., Zhao, G. C., Feng, Y., Pang, H., Bai, X. L., et al. (2009). Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. Journal of Applied Microbiology, 107(1), 245-256.

181. Chen, I. C., Lin, W. D., Hsu, S. K., Thiruvengadam, V., & Hsu, W. H. (2009). Isolation and characterization of a novel lysine racemase from a soil metagenomic library. Applied and Environmental Microbiology, 75(15), 5161-5166.

182. Brennerova, M. V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D. H., & Junca, H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. Environmental Microbiology, 11(9), 2216-2227.

183. Math, R. K., Asraful Islam, S. M., Cho, K. M., Hong, S. J., Kim, J. M., Yun, M. G., et al. (2009). Isolation of a novel gene encoding a 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading enzyme from a cow rumen metagenomic library. Biodegradation.

184. Zhang, T., Han, W.J., Liu, Z.P. (2009) Gene cloning and characterization of a novel esterase from activated sludge metagenome. *Microbial Cell Factories*. *8*(1), 67.

185. Ye, M., Li, G., Liang, W. Q., & Liu, Y. H. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression. Applied Microbiology and Biotechnology.

186. Cieslinski, H., Bialkowskaa, A., Tkaczuk, K., Dlugolecka, A., Kur, J., & Turkiewicz, M. (2009). Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. Polish Journal of Microbiology, 58(3), 199-204.

187. Hu, Y., Fu, C., Huang, Y., Yin, Y., Cheng, G., Lei, F., et al. (2010). Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. FEMS Microbiology Ecology.

188. Maróti, G., Tong, Y., Yooseph, S., Baden-Tillson, H., Smith, H.O., Kovács, K.L., Frazier, M., Venter, J.C., Xu, Q. (2009) Discovery of [NiFe] hydrogenase genes in metagenomic DNA: cloning and heterologous expression in Thiocapsa roseopersicina. *Applied Environmental Microbiology. 75*(18), 5821-5830.

189. Marcos, M. S., Lozada, M., & Dionisi, H. M. (2009). Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. Letters in Applied Microbiology, 49(5), 602-608.

190. Meilleur, C., Hupe, J. F., Juteau, P., & Shareck, F. (2009). Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36(6), 853-861.

191. Liu, K., Wang, J., Bu, D., Zhao, S., McSweeney, C., Yu, P., Li, D. (2009) Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochemical and Biophysical Research Communications. 385*(4), 605-611.

192. Li, L. L., McCorkle, S. R., Monchy, S., Taghavi, S., & van der Lelie, D. (2009). Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. Biotechnology Biofuels, 2, 10.

193. Huang, Y., Lai, X., He, X., Cao, L., Zeng, Z., Zhang, J., et al. (2009). Characterization of a deep-sea sediment metagenomic clone that produces water-soluble melanin in Escherichia coli. Mar Biotechnology (NY), 11(1), 124-131.

194. Jeon, J. H., Kim, J. T., Kim, Y. J., Kim, H. K., Lee, H. S., Kang, S. G., et al. (2009). Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. Applied Microbiology and Biotechnology, 81(5), 865-874.

195. Hjort, K., Bergstrom, M., Adesina, M. F., Jansson, J. K., Smalla, K., & Sjoling, S. (2009). Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phytopathogen-suppressive soil. FEMS Microbiology Ecology.

196. Sharma, S., Khan, F. G., & Qazi, G. N. (2010). Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. Applied Microbiology and Biotechnology, 86(6), 1821-1828.

197. Kim, Y.H., Kwon, E.J., Kim, S.K., Jeong, Y.S., Kim, J., Yun, H.D., Kim, H. (2010) Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 393(1), 45-49.

198. Vieites, J.M., Ghazi, A., Beloqui, A., Polaina, J., Andreu, J.M., Golyshina, O.V., Nechitaylo, T.Y., Waliczek, A., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Ferrer, M. (2009) Inter-conversion of catalytic abilities in a bifunctional carboxyl/feruloyl-esterase from earthworm gut metagenome. Microbial Biotechnology. In press.

199. Henning, H., Leggewie, C., Pohl, M., Muller, M., Eggert, T., & Jaeger, K. E. (2006). Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection. Applied and Environmental Microbiology, 72(12), 7510-7517.

200. Michels, A., Puetz, A., Maurer, K.H., Eggert, T., Jaeger, K.E. (2007) Use of esterases for separating plastics. WO 2007017181.

CAPÍTULO X

MODELOS DE PREDICCIÓN Y SIMULACIÓN DE PROCESOS Y SU APLICACIÓN EN EL CAMPO DE LA BIOCATÁLISIS

Andrés Rafael Alcántara León y José María Sánchez Montero

RESUMEN

No todas las síntesis químicas tradicionales pueden ser sustituidas por procesos biocatáliticos, debido a la complejidad de la integración de los procesos y a un análisis de costo/beneficio no siempre favorable. El uso de la modelización y las técnicas de simulación constituye una poderosa herramienta para ayudar a concretar este desafío, puesto que las rutas alternativas y los cambios hipotéticos respecto a los procesos ya existentes se pueden explorar *in silico*, antes de la experimentación. Los modelos desarrollados en el campo de la Biocatálisis se pueden clasificar en cuatro áreas diferentes, según su nivel de aplicación y complejidad: catalizador, reacción, reactor y proceso.

Palabras clave: Biocatálisis; Enzimas; Modelización molecular; Catalizador; Reacción; Reactor; Procesos optimizados

ABSTRACT

Predictive models and process simulation and its application in Biocatalysis

Not all traditional chemical synthesis can be replaced by biocatalytic processes, due to the complexity of integration of processes and a cost / benefit ratio. The use of modeling and simulation techniques is a powerful tool to help in this challenge, since the alternative routes and hypothetical changes regarding existing processes can be explored *in silico*, before experimentation. The models developed in the field of Biocatalysis can be classified into four

different areas depending on their level of application and complexity: catalyst, reaction, reactor and process.

Keywords: Biocatalysis; Enzymes; Molecular modeling; Catalyst; Reaction; Reactors; Optimized processes.

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos biocatalíticos, que implican el uso de una o más enzimas (tanto en forma soluble como células enteras, o en alguna forma de inmovilización) para catalizar reacciones químicas, han encontrado una aplicación importante en el sector farmacéutico para la síntesis de moléculas ópticamente activas y de alto valor añadido ("fine chemicals") (1). En efecto, la aplicabilidad y la utilidad de la biocatálisis en este sector sin duda va a aumentar a medida que aumente la complejidad estructural de las moléculas cuyo uso terapéutico se pretende. Así, la biocatálisis permite la conversión altamente regio y estereoselectiva de moléculas multifuncionales en condiciones muy suaves, evitando de esta manera el empleo de múltiples pasos de protección y desprotección (2). Además, el uso de condiciones de reacción moderadas, por lo general en un medio acuoso, también permite una mejora significativa desde el punto de vista medioambiental de muchos procesos (3). Recientemente, se ha constatado un incremento en la aplicación de la biocatálisis en la síntesis de productos de bajo valor añadido ("bulk chemicals"), impulsado sin duda por la necesidad de protección medioambiental y el desarrollo de procesos sintéticos más sostenibles, evitando el uso de reactivos peligrosos y desarrollando rutas sintéticas basadas en materias primas renovables, según los principios de la Química Sostenible (4). Sin embargo, no todas las síntesis químicas tradicionales podrían ser candidatas para su sustitución por procesos biocatáliticos, debido a la complejidad de la integración de los procesos y a un análisis de costo/beneficio desfavorable. La evaluación de los casos más adecuados es, por tanto, un reto importante para la implementación de los procesos biocatalíticos.

En este sentido, el uso de la modelización y las técnicas de simulación constituyen una herramienta poderosa para ayudar a concretar este desafío, puesto que las rutas alternativas y los cambios hipotéticos respecto a los procesos ya existentes se pueden explorar *in silico*, previamente a la experimentación (5). Esto permite por tanto, que la misma pueda ser dirigida y centrada y se acelera así el desarrollo de los bioprocesos. Por último, pero no por ello menos importante, señalaremos que los modelos calculados de procesos, también pueden ser utilizados para desarrollar y evaluar estrategias de control que garanticen la estabilidad y la eficiencia deseada. El desarrollo de dichas estrategias de control de procesos para garantizar una calidad fiable del producto final, es especialmente relevante para el sector farmacéutico, tal y como marcan las directrices de la Tecnología Analítica de Procesos (Process Analytical Technology, PAT) dictadas por la FDA, para la consecución de dichos objetivos (6).

En resumen, un buen objetivo de trabajo consistiría en identificar las áreas significativas para seguir avanzando en los modelos y en su aplicación en el campo de la biocatálisis. En este sentido, los modelos desarrollados en el campo de la biocatálisis se pueden clasificar en cuatro áreas diferentes, según su nivel de aplicación (o condiciones de contorno):

1.- Catalizador: Se trataría de proponer modelos que describan la catálisis a nivel molecular, permitiendo una predicción acertada de la selectividad de la reacción .

2.- Reacción: Modelos cinéticos que describan el mecanismo y velocidades intrínsecas basándose en una serie de variables tales como la concentración, pH y temperatura.

3.- Reactor: Modelos cinéticos que describan la cinética de la reacción observada en los reactores, incorporando tanto balances de materia como condiciones hidrodinámicas (mezcla, transporte, etc.).

4.- Proceso: Modelos para el análisis de los resultados globales del proceso, incluyendo las interacciones entre las diferentes unidades de operación

implicadas en un diagrama de flujo del proceso, por ejemplo, la reacción enzimática, cristalización, separación, granulación, etc.

La interacción entre estos modelos se muestra en la Figura 1, donde se ve claramente que cada modelo tiene unos límites concretos y unos puntos focales bien definidos.

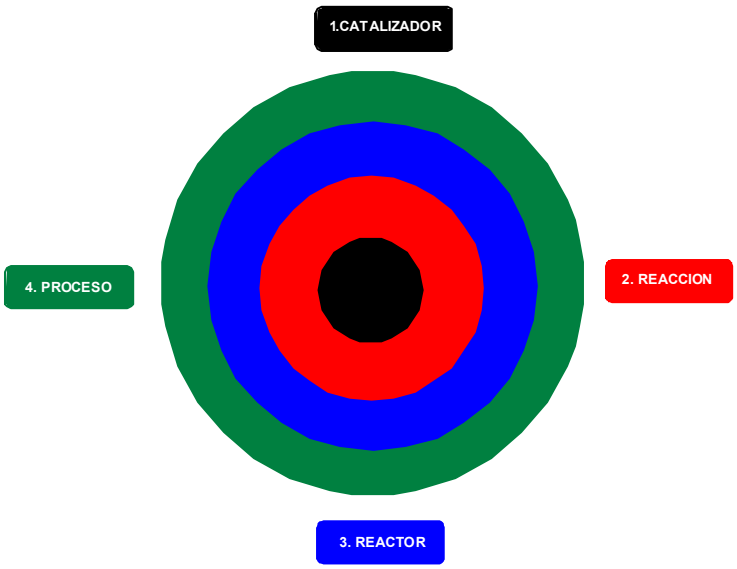


Figura 1.- Representación esquemática de los diferentes modelos aplicados en biocatálisis, en orden creciente de complejidad. Adaptado de Sin, G. *y cols*,. Biotechnol. Progr. 2009, 25 (6), 1529-1538.

Así, progresando desde el nivel molecular, cada nivel sucesivo se construye basándose en el anterior, de manera que todos ellos llevan al modelado global del proceso. Obviamente, la complejidad de los modelos aumenta a medida que nos movemos hacia el exterior de los círculos concéntricos, aunque se pueden usar ciertas simplificaciones para hacer más simple el modelado (por ejemplo, asumir modelos cinéticos tipo Michaelis Menten en el nivel 2). El objetivo del modelado del catalizador (nivel 1), es el conocimiento de la estructura molecular de la enzima, para utilizarlo como base de la predicción de su selectividad. Por su parte, los modelos de reacción, reactor y proceso (niveles 2, 3 y 4), tienen como objetivo la optimización de la reacción global, por lo que presentan un gran interés para los ingenieros a la hora de desarrollar, definir y escalar nuevos bioprocesos. En este sentido, el modelado a niveles 2 y 3 pretende describir la velocidad de la reacción biocatalizada, a partir de las velocidades iniciales obtenidas de los experimentos clásicos de variación de concentraciones relativas de sustrato y

enzima. Finalmente, el modelado del proceso (nivel 4), usa los datos previos para describir todas las unidades físicas que intervienen en la reacción (reservorios, reactor, etc.) y unir estos modelos con otros submodelos que describan otras unidades del proceso, tales como cristalizadores, separadores, destiladores, etc., para de esta manera determinar el comportamiento global de todo el sistema, con el objetivo de cuantificar y predecir el rendimiento final.

A continuación, pasaremos a comentar de manera detallada los diferentes niveles, de manera detallada para el nivel 1, y de manera integrada para los otros niveles.

2. NIVEL 1. MODELOS DEL CATALIZADOR

Al igual que la Química Orgánica, que ha evolucionado a partir de una descripción empírica hasta una disciplina basada en el mecanismo y una ciencia basada en la estructura, la Biocatálisis también está evolucionando hasta un diseño racional de la ciencia basada en la estructura. El comienzo de la Biocatálisis estuvo igualmente marcado por aproximaciones empíricas, tales como el cribado de muestras (conocido con el término *screening*) o simples extrapolaciones a partir de sustratos conocidos. Independientemente de que las técnicas de screening sigan siendo herramientas válidas en Biocatálisis, los recientes avances en el conocimiento de las estructuras tridimensionales de las enzimas abren la posibilidad de realizar un diseño racional de nuevas reacciones y nuevos catalizadores. En este sentido, el Modelado Molecular puede ayudarnos a responder a importantes preguntas que se plantean al llevar a cabo un proceso biocatalizado (7): i) Explicar a nivel molecular el comportamiento, en mucho casos conocido de una enzima. ii) Sugerir cómo cambia la selectividad de una reacción por modificación del sustrato, enzima o condiciones de reacción. iii) Predecir cuantitativamente el grado de estereoselectividad de una reacción catalizada por una enzima.

Las distintas técnicas computacionales, se han ido desarrollando en estos últimos años, en función del conocimiento de la estructura tridimensional tanto del ligando como del receptor, como se recoge en la Tabla I.

TABLA I.- Evolución de las técnicas computacionales en función del conocimiento del receptor

ESTRUCTURA DEL LIGANDO	*ESTRUCTURA DEL RECEPTOR*	
	CONOCIDA	***DESCONOCIDA***
CONOCIDA	Interacciones ligando-receptor	Modelos de farmacóforos
	Dinámica Molecular y Técnicas de *Docking*	Búsquedas 3D basadas en el ligando/ farmacóforo
		QSAR 2D y 3D
DESCONOCIDA	Diseño *de novo*	Generar estructuras en 3D
	Búsquedas 3D basadas en el diseño	Medidas de Similitud y Diversidad Molecular
		Química Combinatoria

Por ejemplo, las dos estrategias seguidas habitualmente en modelado cuando se pretende el diseño de un nuevo fármaco que actúa sobre un determinado receptor (perfectamente extrapolables a la interacción sustrato-enzima) son las denominadas directas e indirectas. En la primera, se requiere el conocimiento de las características tridimensionales de un receptor, y se interpreta la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor. Esto es lo que se conoce por el término de *docking* (podría traducirse como *atraque*, aplicado a un barco que entrase en un puerto, aunque generalmente se emplea el término inglés) o estudios de interacción entre fármaco y receptor. La segunda estrategia, en la que la estructura tridimensional del receptor biológico no es conocida, se basa en el análisis comparativo de las características estructurales de sustancias conocidas activas o inactivas con el fin de definir un farmacóforo apropiado para la actividad biológica estudiada, siendo la aplicación más destacada el conocido como Relaciones Cuantitativas Estructura Actividad en tres

dimensiones (QSAR 3D). Estos avances en ciencias computacionales nos permiten en este sentido describir en detalle la maquinaria del biocatalizador.

No obstante, la predicción cuantitativa *in silico* de la actividad enzimática y la selectividad, sigue siendo un objetivo de gran interés en Biocatálisis. Así, los estudios de las dos últimas décadas han demostrado cómo las enzimas pueden utilizarse adecuadamente, tanto en disolución acuosa como en entornos no convencionales, lo que permite nuevas metodologías por desarrollar, incluso en condiciones experimentales más extremas (8).

Estos avances, han beneficiado en gran medida el desarrollo del Modelado Molecular, al simular algunos de los fenómenos que tienen lugar a nivel molecular durante la Biocatálisis, proporcionando así la base para el diseño de estrategias racionales en la experimentación. Las simulaciones moleculares nos ayudan a la construcción de modelos virtuales de sistemas químicos. El principal interés del Modelado Molecular en Biocatálisis, es el conocimiento a nivel molecular de las interacciones enzima-sustrato, generalmente, tal y como comentamos anteriormente, persiguiendo como meta la predicción de la actividad y selectividad. Hay distintos algoritmos que nos sirven para predecir el *docking* de un sustrato en el centro activo de una enzima, así como para calcular su energía de interacción y para la simulación de su energía de solvatación. La aplicación de estos métodos a la Biocatálisis está basada en el cálculo de la energía libre de la reacción que a su vez deriva de la simulación del estado de transición, como veremos más adelante.

Cuando los fenómenos son demasiado complejos para ser simulados, puede servir de ayuda otros métodos de cálculo, tales como la Quimiometría, porque son capaces de extraer información relevante a partir de datos experimentales y, finalmente, permiten la construcción de modelos de predicción del comportamiento de la enzima. Definimos la Quimiometría, como la ciencia de las mediciones realizadas sobre un sistema o proceso químico por aplicación de métodos matemáticos o estadísticos. Consta de una serie de técnicas heterogéneas, entre las cuales el diseño estadístico de experimentos y análisis estadísticos multivariante son los más importantes para la aplicación en la Biocatálisis.

Hemos de señalar, que los métodos quimiométricos y el Modelado Molecular utilizan aproximaciones radicalmente opuestas a la hora de construir modelos predictivos; así, mientras los primeros establecen relaciones empíricas entre los parámetros operacionales y la variable medida (actividad, estereoselectividad, estabilidad…), sin ninguna presunción de modelos, el Modelado Molecular utiliza unas bases teóricas previas antes de establecer sus predicciones. No obstante, estas dos estrategias no son excluyentes, sino complementarias (9), como veremos posteriormente (apartado 8).

A continuación, procederemos a exponer de manera algo más detallada algunos aspectos en los cuales el Modelado Molecular ha contribuido al desarrollo de la Biocatálisis.

2.1. Reconocimiento enzima- sustrato y selectividad de la enzima

Las técnicas de Modelado Molecular, se han convertido en herramientas de rutina en la descripción de las interacciones enzima-sustrato. Otros temas de interés, tales como la mejora de la estabilidad de la enzima, o la interpretación racional del efecto del disolvente sobre las reacciones biocatalizadas se han investigado en menor proporción. En el primer caso, esto se debe a que la estabilización de la enzima se consigue más a menudo a través de diferentes rutas (por ejemplo, mediante Evolución Dirigida). El problema del efecto del disolvente sin duda merece una atención especial, por lo que se comentará más adelante (ver apartado 2.6).

La mayoría de los estudios computacionales realizados en el campo de la Biocatálisis, se concentran en la predicción de la selectividad de la enzima. Esto implica el cálculo de la constante de especificidad (k_{cat}/K_M), que depende de la energía libre del estado de transición de la reacción. En este sentido, los denominados métodos *ab initio* de la Mecánica Cuántica (QM,) son capaces de reproducir los datos experimentales sin emplear parámetros empíricos. La calidad de un cálculo *ab initio,* depende de la base mínima usada para el cálculo, y por su parte, la decisión del tipo de base que debe aplicarse dependerá del objetivo del cálculo y del tipo de molécula por estudiar. Conviene resaltar, que la utilización de bases de cálculo muy sofisticadas no siempre garantiza una buena concordancia con los datos experimentales. Aunque los

métodos *ab initio* de la QM proporcionan tanto la precisión más alta para la simulación molecular, como la posibilidad de contemplar efectos electrónicos, la complejidad del cálculo restringe sus aplicaciones a dianas químicas a nivel de unas pocas decenas de átomos. Por tanto, la complejidad de un sistema biocatalítico limita drásticamente la posibilidad de aplicar métodos de QM, forzando a la Química Computacional hacia el uso de métodos de Mecánica Molecular Clásica (MM), basados en un conjunto de ecuaciones y parámetros denominados Campos de Fuerza.

Así, la MM considera los átomos de una molécula como un conjunto de masas interaccionando vía fuerzas armónicas o elásticas, donde los átomos son tratados como bolas de diferentes tamaños (según el tipo de átomo) y los enlaces se consideran muelles. Esto permite la simulación de macromoléculas, es decir, proteínas; no obstante, la naturaleza empírica de los campos de fuerza, que deben ser correctamente parametrizados, hace que el tratamiento de cualquier efecto electrónico sea inviable. En este sentido, los Campos de Fuerza más utilizados son MM2 (o sus posteriores versiones MM3 y MM4) para moléculas pequeñas (10), Amber (11) para las proteínas (mejor opción, puesto que contempla las interacciones electrostáticas de una forma más adecuada) o CHARMM (12).

Finalmente, los métodos híbridos de QM-MM tratan la parte reactiva de los sistemas biocatalíticos, relativamente pequeña, a nivel de QM y todo lo demás por MM, ofreciendo una buena alternativa de cálculo. En este sentido, en la Figura 2 se representa los resultados obtenidos en el *docking* de los confórmeros de mínima energía del *S*-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa de *C. rugosa*, enantiómero preferentemente reconocido en la hidrólisis estereoselectiva a partir de la mezcla racémica (13).

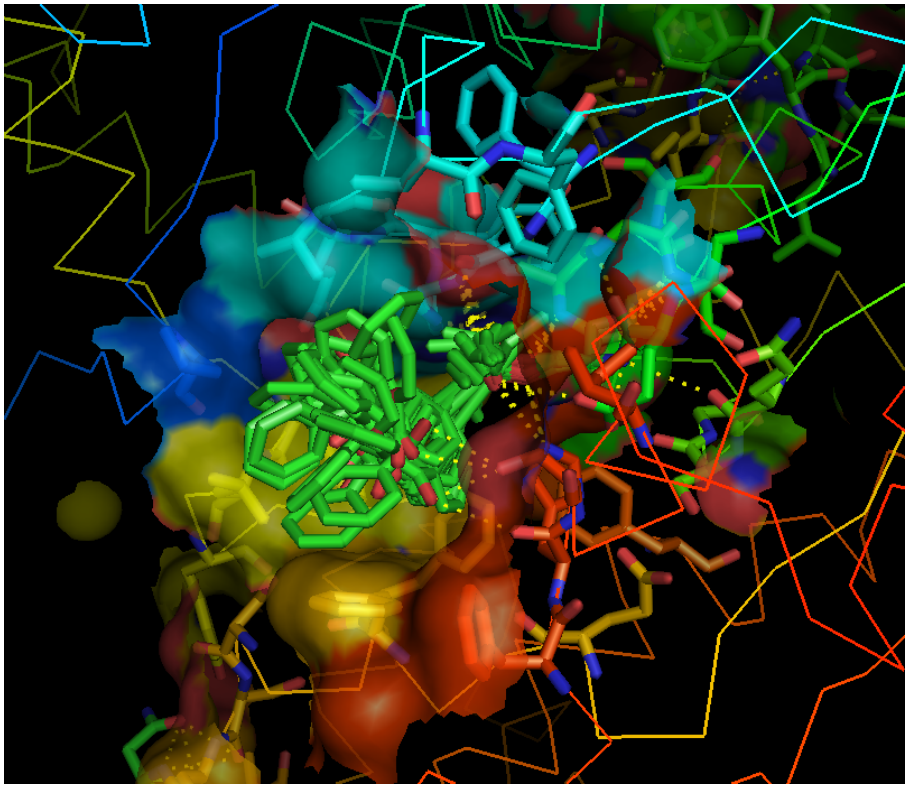


Figura 2.- Confórmeros de mínima energía del *S*-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa de *C.rugosa* (13).

2.2. Simulación de análogos del estado de transición

La cinética de las reacciones biocatalizadas, depende de la energía libre de sus estados de transición, en los cuales las especies químicas no son estables. Sin embargo, los métodos de MM solo pueden usarse cuando las estructuras son estables y además son incapaces de simular los procesos de ruptura y formación de enlaces. Así, la estrategia más común para modelar *in silico* las interacciones entre las enzimas hidrolíticas (las más empleadas en Biotransformaciones (14) y sus sustratos, a nivel de MM, es la simulación del intermedio tetraédrico, que es una especie química estable donde un donador de acilo se encuentra unido covalentemente al residuo catalítico de la proteína, y que mimetiza el estado de transición de la reacción (15). Un ejemplo típico, consiste en emplear fosfonatos como análogos del estado de transición en la hidrólisis de ésteres (16). No obstante, el problema radica en que estos análogos únicamente se aproximan al verdadero estado de transición (7). Para intentar solventar este problema, los métodos mixtos QM-MM suelen emplear, en primer lugar, QM para modelar el estado de transición en fase gaseosa, y posteriormente este modelo se traslada al interior de la enzima, realizando el

resto de cálculos mediante MM (17). No obstante, hoy día, con los avances en la capacidad de cálculo de los ordenadores actuales, es posible utilizar QM para el cálculo de los estados de transición no en fase gaseosa, sino directamente en el centro activo (18). Con esta opción, la distribución de las cargas parciales cambia significativamente, de manera que los cálculos posteriores permiten una descripción más adecuada de los resultados experimentales.

2.3. Descripción grid de la naturaleza química del centro activo

La descripción GRID de la capacidad de unión del centro activo, proporciona una información valiosa que complementa la simulación de análogos del estado de transición anteriormente mencionada. El GRID, es un protocolo computacional para detectar sitios de unión energéticamente favorables entre moléculas de estructura tridimensional conocida, desarrollado por Goodford en 1985 (19), en función de la estimación de las energías de interacción entre grupos químicos pequeños (llamados sondas) y una zona determinada de la enzima, generalmente el centro activo. El enfoque GRID, permite una descripción más precisa de la interacción enzima-sustrato y fue aplicado por Gardossi *y cols*. (20), en el estudio de la selectividad de la penicilina G amidasa (PGA). Además de proporcionar directrices para el acoplamiento de los sustratos en el centro activo de la enzima, la visualización de los campos de interacción molecular (MIF) generados por diferentes sondas (hidrofóbicas, donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno y grupos cargados), permitió una exploración fácil y rápida de la naturaleza química del centro activo, consiguiendo así un esquema completo de los requerimientos estructurales del sustrato para su reconocimiento óptimo. Además, el estudio estableció las normas generales para la enantiodiscriminación, ilustrando cómo los enantiómeros tienen diferentes interacciones con dos zonas químicamente distintas del centro activo (20b). Las velocidades de acilación determinadas experimentalmente, fueron posteriormente utilizadas para validar el modelo, el cual proporciona sólo una predicción cualitativa del reconocimiento diferencial de los enantiómeros. No obstante, este modelo se aplicó posteriormente para un estudio de optimización en la resolución enzimática a partir de una mezcla de multicomponentes de sustratos en un proceso Diels-Alder, permitiendo

desarrollar una estrategia de ingeniería del sustrato y la predicción de los sustituyentes en el anillo de ciclohexeno que conduce a la más alta enantiodiscriminación (E> 200) (21).

Aunque en los ejemplos expuestos hasta ahora se alcanzaron buenos resultados en la racionalización de las estrategias experimentales, todos fallan en hacer una predicción cuantitativa de la selectividad de la enzima, incluso cuando el análisis GRID se combina con aproximaciones al análogo al estado de transición. Esta limitación, se debe a que todos los enfoques descritos se basan en varias aproximaciones significativas (7); así, el primer problema se puede atribuir a la naturaleza simplificada de los cálculos del campo de fuerza empleado. Por otra parte, el segundo gran problema viene del hecho de que las pequeñas diferencias de energía originan grandes variaciones en la selectividad, que pueden ser enmascaradas por las grandes fluctuaciones causadas por el movimiento normal de las proteínas. Esta cuestión, ha sido contemplada en los estudios de Hult *y cols*. (22) al intentar explicar la enantioselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica*.

Otro tipo de limitaciones en la aproximación al análogo al estado de transición, se derivan de la dificultad de evaluar la contribución entrópica a la energía libre de las reacciones. Se ha demostrado, que la entropía puede tener un papel principal en la selectividad de la enzima, en particular cuando los intermedios tetraédricos de los dos enantiómeros difieren en rigidez estructural y en el tipo de interacción con el disolvente, aunque la relación de compensación de los mecanismos entropía-entalpía no ha sido completamente aclarada (23).

2.4. Predicción de la enantioselectividad de la enzima por métodos de mecánica cuántica y/o mecánica molecular

Para tener en cuenta todas las contribuciones a la energía libre de las reacciones biocatalizadas, deben emplearse enfoques más sofisticados.

El primer y más clásico estudio sobre la predicción cuantitativa de la diferencia de energía libre entre los dos intermedios tetraédricos (véase el apartado 2.3) de dos enantiómeros fue descrito por Colombo *y cols*. (18a) en la resolución de una mezcla racémica de 1-feniletanol por acilación catalizada por

subtilisina. El enfoque consistió en un modelo con todos los átomos con solvatación explícita completa, energía libre de perturbación (FEP), simulaciones de MD (dinámica molecular) y cargas atómicas derivadas de metodologías de QM y/o MM. Los resultados en ese estudio de 1999, probablemente representan la mejor predicción cuantitativa de la enantioselectividad descrita hasta ahora en la bibliografía, pero a pesar de todo, la tasa de error aún puede considerarse como elevada.

Otros estudios, han utilizado métodos *ab initio* de QM y de dinámica molecular-energía libre de perturbación (MD-FEP), para intentar cuantificar la enantioselectividad de la α-quimotripsina en procesos de hidrólisis (24). En este enfoque, los cálculos *ab initio* para la parte reactiva del complejo enzima-sustrato se combinaron con el tratamiento clásico de la interacción de la energía libre entre el sistema mecano cuántico y el entorno de mecánica molecular. Este estudio, presenta una descripción detallada de enantioreconocimiento enzimático, así como del efecto de solvatación en la catálisis enzimática, pero sólo a nivel cualitativo.

Sin duda, la principal dificultad a la hora de llevar a cabo una predicción cuantitativa adecuada de la enantioselectividad deriva del hecho de que, aunque se pueda establecer de una forma muy precisa cual es la energía libre del estado de transición del enantiómero preferentemente reconocido dentro del centro activo (ver apartado 2), el otro enantiómero puede tener diferentes tipos de orientaciones, que implican interacciones distintas con diferentes zonas del centro activo (7,25).

2.5. Correlación entre la selectividad de la enzima y descriptores moleculares

Dado que el cálculo preciso de la energía libre de una reacción biocatalizada sigue siendo una tarea difícil, el desarrollo de las alternativas más simples y directas es hoy en día un área activa de investigación. Cabe señalar, que para que una herramienta de predicción sea atractiva, debe ser competitiva con el tiempo empleado en el laboratorio para realizar un experimento. En general, no hay motivos para esperar dos meses para la predicción de una medida que puede ser realizada experimentalmente en dos semanas (9).

En este sentido, los métodos de MD, FEP, y QM no son probablemente los más apropiados para el desarrollo de modelos de predicción, al menos a la luz de los instrumentos de cálculo comúnmente disponibles. Como consecuencia, se han desarrollado varias estrategias alternativas encaminadas a simplificar cálculos y evitar el cálculo de la energía del estado de transición de la reacción.

Estas ideas se han aplicado en el estudio de enantioreconocimiento de alcoholes terciarios por carboxilesterasas (26), demostrando cómo una predicción cuantitativa de la enantioselectividad se puede realizar evitando el cálculo de la energía libre del estado de transición. En este sentido, el análisis geométrico de los intermedios tetraédricos, construido por *docking* manual y simulaciones de MD, puso de manifiesto la correlación cuantitativa entre la enantioselectividad y un descriptor geométrico único, definida como la distancia entre el nitrógeno de la histidina catalítica y uno de los átomos de oxígeno del sustrato. Aunque la validez de este tipo de descriptores no se puede asumir como general, la identificación de correlaciones similares en diferentes sistemas biocatalíticos representa una ruta original y sencilla para la predicción de la enantioselectividad en un plazo razonable de tiempo.

Como ejemplo realizado en nuestro grupo de investigación, comentaremos el estudio que se ha realizado para explicar la regio y estereoselectividad encontrada en la acilación de diferentes (1,*n*)-alcanodioles empleando la lipasa de páncreas porcino (27); mediante la realización de un *docking* manual de los diferentes sustratos en la estructura descrita del centro activo, ilustrado en la Figura 3 para el 2-fenil-1,3-propanodiol, donde se postuló como importante el posible papel del residuo Phe216 para el correcto reconocimiento del sustrato, ajustando las dimensiones de los sustratos a un triángulo cuyas dimensiones coinciden con los residuos Ser153, His264 (correspondientes a la tríada catalítica) y la mencionada Phe216.

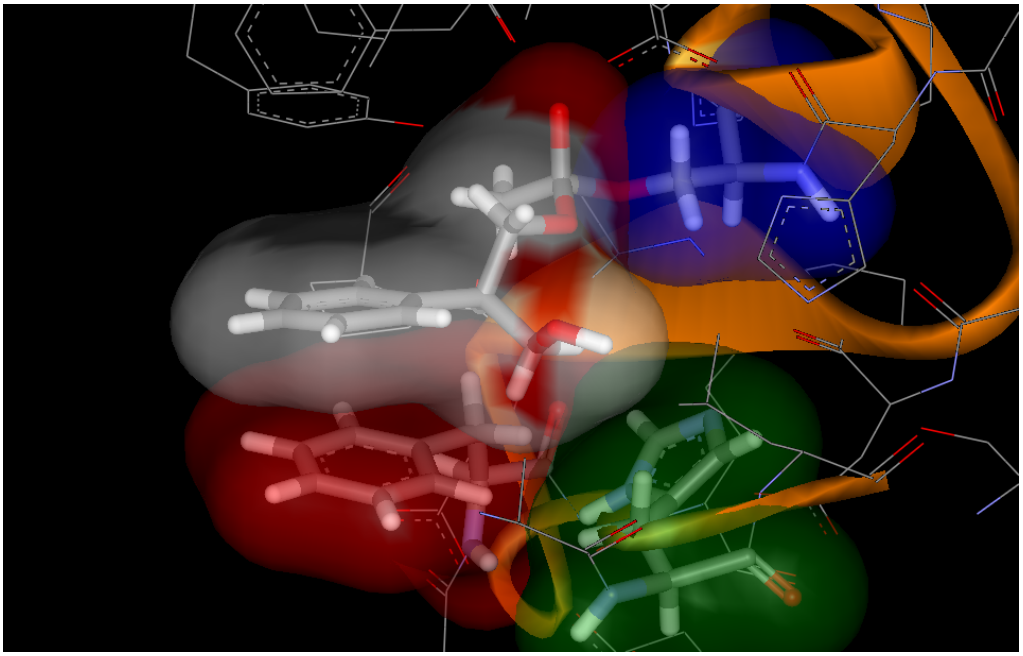


Figura 3.- *Docking* manual del 2-fenil-1,3-propanodiol (gris) en el centro activo de la lipasa de páncreas porcino (PPL) (27), con simulación del estado de transición. Residuos implicados: Ser 153 (azul), His264 (verde) y Phe 216 (rojo).

Un estudio más refinado de *docking* (13) ha confirmado dicha hipótesis, al confirmarse las distancias previstas y las interacciones propuestas (Figura 4).

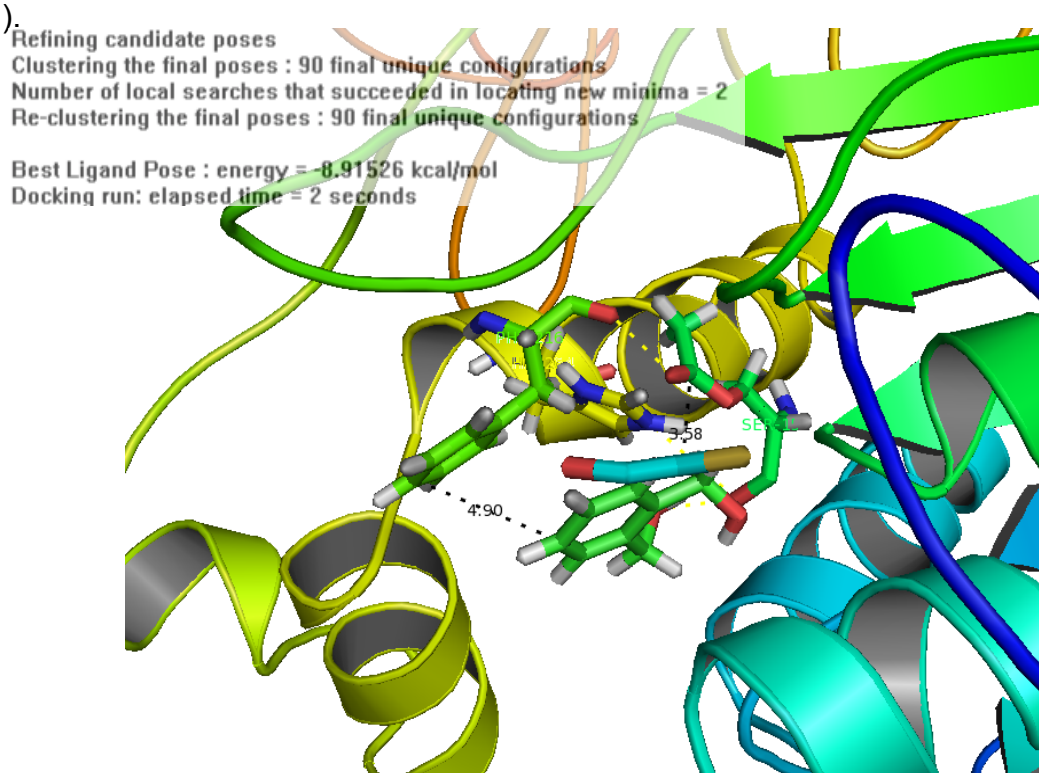


Figura 4.- Docking automático del 1-fenil-1,2-etanodiol en el centro activo de la lipasa de páncreas porcino (PPL) (13), realizado con el Software ArgusLab.

2.6. Estudio del efecto de los disolventes

Como se mencionó anteriormente, es muy importante considerar que, puesto que el Modelado Molecular debe intentar interpretar y predecir resultados experimentales, los procesos biocatalíticos se llevan a cabo en presencia de disolventes, por lo que el efecto de la solvatación debe ser estudiado.

Inicialmente, la mayoría los cálculos de modelado incluyen las moléculas de agua que se encuentran en la estructura de cristal, pero no las moléculas de agua adicionales del disolvente, cuyo efecto generalmente se simula utilizando un parámetro dieléctrico dependiente para intentar imitar la solvatación (7). Ke *y cols*.(28), utilizaron un método mejorado para simular el agua disolvente, un modelo electrostático continuo, pero los resultados fueron similares a los obtenidos del modelo más simple. Este tratamiento incompleto de solvatación es claramente una aproximación. Está claro que el disolvente puede cambiar la selectividad de la enzima, aunque existe aún desacuerdo sobre por qué esto ocurre.

Una de las posibles explicaciones propuesta, atribuye la capacidad de estereodiscriminación a la diferente solvatación de los complejos diastereoisoméricos enzima-sustrato. En este sentido, Ke y Klibanov (29) estudiaron la enantioselectividad de la quimotripsina en la acilación de un diol proquiral, encontrando que el estado de transición que conducía hacia la acilación en el hidroxilo *pro-R* colocaba un resto de 3,5-dimetoxifenilo en un bolsillo de la enzima, mientras que el estado de transición conducente a la acilación en el hidroxilo *pro-S* dejaba este resto arilo expuesto hacia el disolvente. La propuesta de estos autores correlacionaba la enantioselectividad observada con los coeficientes de actividad termodinámica de la zona aromática expuesta, no como una predicción cuantitativa, sino como una correlación directa en el sentido de mejor solvatación de las partes expuestas, traduciéndose en una mayor enantioselectividad. Sin embargo, este método no pudo ser extrapolado a otros sustratos.

Para complicar aún más la situación, también debe considerarse que ciertos aminoácidos que no están en contacto directo con el sustrato pueden

influir de manera decisiva en la selectividad, tal y como sucede con el residuo 225 en la trombina, que nunca contacta con el sustrato, pero ejerce su influencia en la forma y disposición del canal de agua que se localiza en la proximidad del centro activo (30).

La capacidad de ciertas enzimas para trabajar de manera eficiente en medios no acuosos es ampliamente conocida. Entre estos medios, no convencionales podemos considerar disolventes orgánicos (8,31), líquidos iónicos (32) o fluidos supercríticos (33). En este sentido, las lipasas son enzimas especialmente interesantes (34), dado su excepcional actividad en disolventes orgánicos, por lo que el estudio mediante Modelado Molecular de su comportamiento en dichos medios constituye un campo de trabajo muy habitual. Especialmente estudiado ha sido el movimiento de la tapadera, hélice α de carácter anfipático próxima al centro activo; cuando la enzima está en conformación cerrada dicha tapadera cubre completamente el centro activo, mientras que cuando se activa la enzima, en un proceso denominado activación superficial, dicha tapadera se mueve, por lo que deja expuesto el centro activo al sustrato (35), por lo que su influencia en la actividad catalítica es considerable (36). La conformación cerrada predomina en medio acuoso, mientras que en medio orgánico o en presencia de interfase agua/lípido, prevalece la conformación abierta. Existen muchos trabajos que han abordado el estudio del movimiento de la tapadera mediante técnicas de Dinámica Molecular (MD), con el objetivo de comprender los cambios conformacionales asociados a dicho movimiento, y las posibles influencias sobre el mismo (disolvente, pH, temperatura, etc.) (37). No obstante, la mayoría de ellos han abordado el estudio centrándose en las propiedades dinámicas de los dos estados del equilibrio (lipasa cerrada y lipasa abierta), usando simulaciones de MD a corto tiempo (<10ns) para intentar encontrar cuáles son los principales átomos y residuos involucrados en el movimiento. En este sentido, Guieysse *y cols*., siguiendo unos estudios previos (38) han estudiado muy recientemente (39) de forma exhaustiva el movimiento de la tapadera de la lipasa de *Burkholderia cepacia*, tanto en medio acuoso como en tolueno. De acuerdo con sus observaciones, basadas en simulaciones de MD a largos tiempos, estos autores describen importantes modificaciones conformacionales en la enzima,

que efectivamente expone o protege su centro activo frente al sustrato dependiendo del entorno disolvente (agua, octano, interfaz de agua/octano). Así, la interconversión de la conformación abierta hasta la cerrada en agua, y de ésta última hasta la primera en octano se observa espontáneamente en simulaciones de MD de 20 ns, lo que indica que las barreras de energía entre ambos estados deben reducirse por efecto del disolvente. De manera más precisa, se observa un desplazamiento de aproximadamente 13Å de la tapadera, la cual abarca unos 40 residuos, y que está compuesta por dos hélices α separadas por un bucle corto.

2.7. Modelado molecular e ingeniería racional de enzimas

Algunos de los logros más relevantes de las técnicas computacionales en Biocatálisis provienen de la Ingeniería Racional de enzimas, entendiendo por este término la mutación selectiva de algunos aminoácidos en la estructura de la proteína para lograr un efecto determinado (aumento de actividad, estereoselectividad, estabilidad, etc.) (40).

Como ejemplo clásico de esta metodología, citaremos el trabajo de Scheib *y cols*. (41), en el cual el Modelado Molecular pudo predecir que la sustitución del residuo Leu258 en la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) por una fenilalanina, permitiría el (finalmente comprobado experimentalmente) aumento en la enantioselectividad en la hidrólisis de triglicéridos. En otro ejemplo, el Modelado Molecular permitió predecir la mutagénesis de 3 aminoácidos en la apolipoproteína C-III (apoC-III) y así alterar la unión de la misma a diferentes lípidos (42) o a la lipoproteina lipasa (LPL) (43). Por su parte, Botta *y cols* (44) utilizaron técnicas de Modelado Molecular para estudiar la importancia de los residuos Phe344 y Phe345 sobre el reconocimiento del éster metílico del Ketoprofeno en su hidrólisis enantioselectiva por parte de la lipasa de *Candida rugosa*. Por último, citaremos el estudio publicado por los grupos de Jaeger y Thiel (45), en el cual se utilizaron técnicas de Modelado simulando la estrategia del escaneo de alanina ("Ala-scan", consistente en la sustitución sistemática de una serie de aminoácidos por alanina, de manera que por la variación observada en una determinada propiedad en el mutante se puede deducir la mayor o menor importancia del aminoácido sustituido), que apuntaban a la importancia vital del residuo His76 en la actividad de la lipasa de *Bacillus*

subtilis. Posteriormente, al construir la biblioteca de mutantes, este hecho quedó plenamente confirmado. Asimismo, comentar que en el estudio del movimiento de apertura de la tapadera de la lipasa de *Burkholderia cepacia* mencionado en el apartado anterior (39), la mutación *in silico* de dos aminoácidos presentes en dicha tapadera (Val138 y Phe142), inicialmente expuestos al disolvente y que terminan enterrados hacia el interior cuando la lipasa se cierra, permite comprobar su papel clave en el equilibrio entre conformaciones, de manera que la mutación de Val138 hasta Ala o Ser impide por completo el cierre de la tapadera y el cambio de la Phe142 por serina hace que la lipasa adopte una conformación intermedia entre abierta y cerrada.

No obstante, esta aproximación a la evolución del biocatalizador es a veces vista como competencia con la metodología de Evolución Dirigida (46). Evidentemente, aunque el modelado molecular es muy adecuado para optimizar tanto las posibles interacciones enzima-sustrato como para dilucidar el mecanismo catalítico de la enzima, hemos de reconocer que en general es mucho menos eficiente para la identificación de los efectos de las mutaciones que se encuentran alejadas del centro activo, que pueden alterar la estructura de la proteína y modificar su comportamiento (47). En este contexto, la Evolución Dirigida puede ofrecer una solución más eficiente al problema.

Por otro lado, el Modelado Molecular también puede ser empleado para racionalizar las bases de la “promiscuidad ” de las enzimas (48), entendiendo por tal concepto, según Hult y Berglund (48d), bien la capacidad de algunas de ellas de trabajar en condiciones experimentales diferentes de las que les son naturales (medios no acuosos, valores extremos de temperatura y/o pH, …), bien la capacidad de reconocer un amplio abanico de sustratos de diferente estructura, o bien su capacidad para catalizar diferentes reacciones químicas con diferentes estados de transición. Estos mismos autores, definen a estas tres habilidades como promiscuidad de condición, de sustrato o catalítica, respectivamente. Así, por ejemplo, Branneby *y cols* (49), mediante el empleo de técnicas de Modelado Molecular (cálculos de mecánica cuántica sobre análogos del estado de transición, ver apartado 2) fueron capaces de explicar de manera eficiente la razón por la cual la mutación Ser105Ala en la lipasa B de *Candida antarctica* convierte esta enzima desde una hidrolasa hasta una

aldolasa, siendo capaz de catalizar la condensación aldólica entre aldehídos. Esa misma mutación, anticipada por cálculos mecano cuánticos, estudios de *docking* y simulaciones de mecánica molecular, permite a esa misma lipasa catalizar adiciones conjugadas de tioles y aminas a compuestos carbonílicos α, β-insaturados (50). Estos dos ejemplos, ilustran perfectamente los tres tipos de promiscuidad: una lipasa funcionando en procesos que no son los naturalmente habituales (promiscuidad catalítica), actuando sobre aldehídos o aminas y tioles (promiscuidad de sustrato), y en disolventes orgánicos (promiscuidad de condición).

2.8. Modelado molecular combinado con quimiometría: qsar 3d para la predicción de la enantioselectividad

Los métodos QSAR 3D (relaciones cuantitativas estructura-actividad en tres dimensiones) utilizan los datos provenientes de simulaciones moleculares como entrada para el análisis estadístico multivariante y representan la fusión entre el Modelado Molecular y la Quimiometria. Aunque el uso de QSAR 3D está bien establecido en el diseño de fármacos, la aplicación de estos métodos en Biocatálisis se ha llevado a cabo no hace muchos años. Los trabajos pioneros de Tomić *y cols* (51), representan un ejemplo de como las predicciones cuantitativas de k_{cat}/K_M son viables a través de un enfoque QSAR 3D, que correlaciona los descriptores sistema químico con los datos experimentalmente medibles. La predicción cuantitativa de la enantioselectividad de la lipasa de *Bulkholderia cepacia,* se logró mediante el desarrollo de un método en el que la energía libre de unión se calcula de manera aproximada a través de una combinación lineal de la energía de interacción del complejo enzima-sustrato y la superficie polar y no polar accesible al disolvente. El peso de cada parámetro se calculó por análisis PLS, y el alto coeficiente de correlación de predicción (Q2= 0,84) confirma la validez de la aproximación (51b). Posteriormente, estos autores disminuyeron el tiempo de cálculo adoptando el método Monte Carlo de análisis conformacional, de manera que lograron unos buenos resultados en la predicción cuantitativa de los valores de enantioselectividad de una nueva serie de sustratos (51c).

Por otra parte, la aplicación de la técnica de QSAR 3D para la predicción cuantitativa de la selectividad enzimática de la Penicilin G-Acilasa, empleando dos metodos QSAR derivados de GRID (GRIND (52) y Volsurf (53)), ha sido descrita por Braiuca *y cols* (54). Los valores medidos experimentalmente de k_{cat}/K_M fueron utilizados como variable respuesta para la construcción de un modelo de regresión múltiple, basado en descriptores moleculares puramente geométricos calculados por el método de GRIND y Volsurf. La gran ventaja de esta aproximación es que, una vez que se dispone de un conjunto de datos experimentales, se puede construir un modelo completo de predicción en unas pocas horas. Muy recientemente, estos mismos autores (55) han descrito el uso de la metodología de QSAR 3D para diseñar un modelo predictivo que describe la enantioselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica* en la resolución de alcoholes y aminas quirales. En este caso, el descriptor molecular utilizado, también basado en GRID, denominado DIMFs (acrónimo en inglés de *Campos Diferenciales de Interacción Molecular*), ha permitido la creación de un modelo predictivo fiable y robusto.

En otro orden de cosas, el QSAR 3D también puede emplearse en Biocatálisis en sistemas en los cuales no se conoce la estructura tridimensional del biocatalizador, mediante el empleo de estudios CoMFA (acrónimo de Comparative Molecular Field Analysis (56)); aplicando esta metodología, se pudo predecir la estructura del sustrato modelo en la biorreducción de diferentes cetonas empleando células enteras de *G. candidum* y *S. octosporus,* representados en la Figura 5 (57). El código de colores es el que sigue: i) *Zonas de bajo impedimento estérico* (verde). Son zonas donde la presencia de restos químicos del sustrato favorece la interacción enzima-sustrato. ii) *Zonas de alto impedimento estérico* (amarillo). Son zonas donde la presencia de grupos en el sustrato disminuye la afinidad de la ADH por el sustrato. iii) *Zonas electrostáticas:* rojas, donde una elevada densidad electrónica favorece la interacción y azules donde una elevada densidad de carga negativa desfavorece la interacción. La principal ventaja de esta metodología para modelar el centro activo de una enzima desconocida es que estamos ante un método puramente químico que permite predecir, sin conocer la estructura primaria de la enzima y sin siquiera haberla aislado.

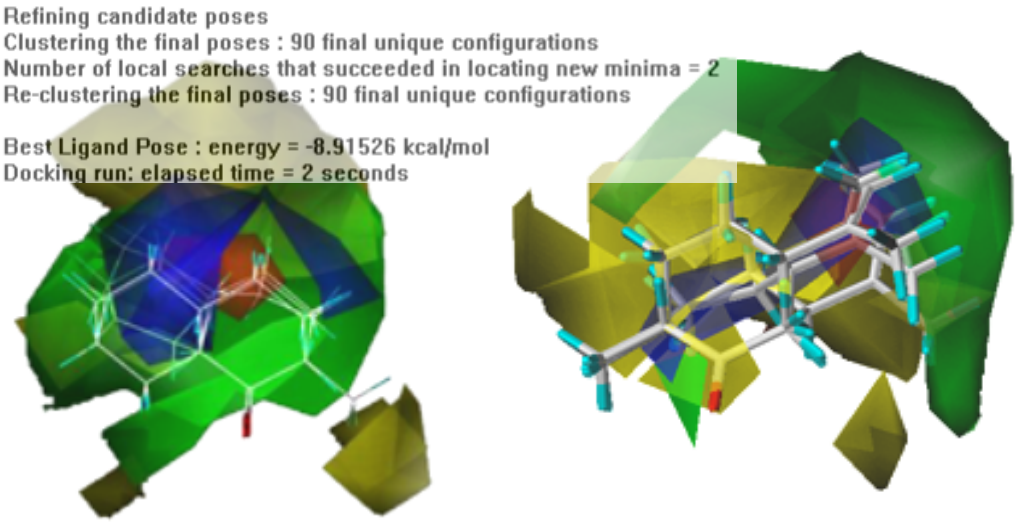


Figura 5.- Metodología QSAR-3D/ CoMFA para la predicción de los requerimientos de diferentes sustratos para ser reducidos empleando células de *G. candidum* (izquierda) y *S. octosporus* (derecha). Ver código de colores en el texto.

3. NIVELES 2,3 Y 4

Los modelos de reacción, reactor y proceso tienen como objetivo común la optimización, diseño o análisis, y por tanto resultan herramientas muy útiles para los ingenieros a la hora de desarrollar, definir y ampliar la aplicabilidad de nuevos bioprocesos. Mientras que los modelos para el biocatalizador tienen que ver con la naturaleza de la enzima, los modelos de reacción y el reactor (niveles 2 y 3) son en su mayoría cinéticos, y se basan en la descripción de la velocidad observada en el proceso biocatalítico, generalmente obtenidos a partir de la velocidad inicial medida en diferentes experimentos variando tanto la concentración de enzima como de sustrato. Por su parte, los modelos de proceso (nivel 4), utilizan el modelado de reactor para describir las diferentes unidades operacionales involucradas en la reacción (biorreactores y/o fermentadores, reservorios de sustratos y productos) y posteriormente unir estos modelos así construidos con otros submodelos que describan otras unidades de proceso también involucrados en el esquema de flujo, tales como cristalizadores y separadores, por ejemplo. Los modelos integrados de procesos, en última instancia, tienen por objeto evaluar la interacción entre las diferentes unidades de proceso para estimar de forma realista los parámetros de respuesta deseados, generalmente el rendimiento global del producto (5a).

Además, en algunos casos, puede resultar ventajoso combinar las operaciones de la unidad en las llamadas operaciones híbridas para mejorar, por ejemplo, *in situ* la eliminación del producto (58). En estos casos, un análisis de costo-beneficio debe llevarse a cabo, ya que bajo ciertas condiciones algunos índices métricos pueden ser mejorados, pero generalmente a expensas de otros, por lo que la evaluación de los pros y contras juegan un papel muy importante para el modelado óptimo del proceso.

A la hora de presentar de forma sistemática algunos ejemplos, utilizaremos los siguientes criterios:

- el propósito del modelo,
- el proceso que se ha modelado y las unidades que se han tenido en cuenta (bien todo el proceso, bien solo una unidad),
- la estructura del modelo (cinética), y
- el procedimiento de identificación del modelo (por ejemplo, los datos experimentales, la estimación de parámetros, la estimación del error de dichos parámetros (intervalo de confianza), y la incertidumbre en las predicciones del modelo).

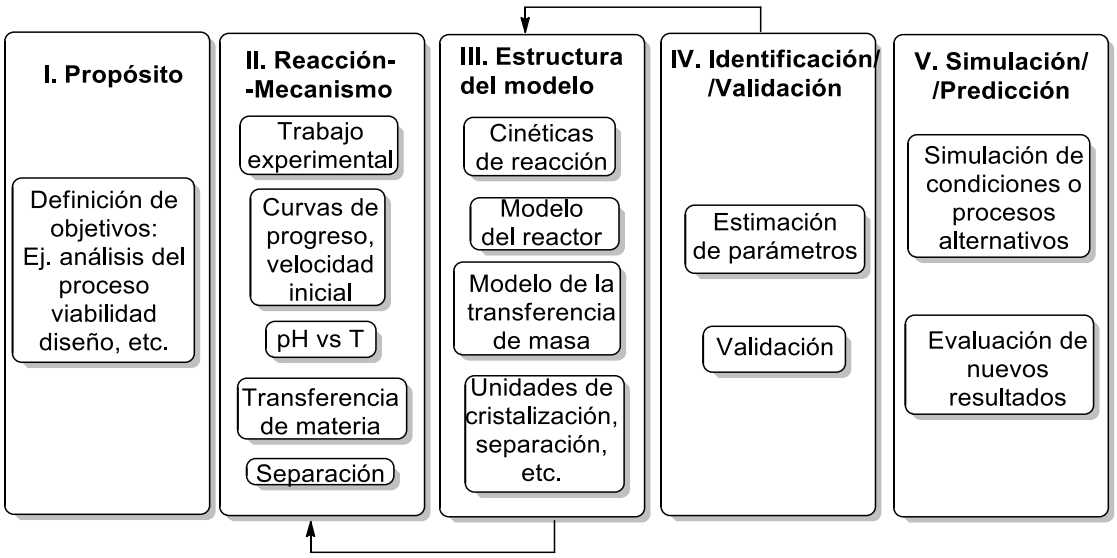


Figura 6.- Pasos típicos seguidos en un modelado: las flechas indican retroalimentación, donde se producen iteraciones. Adaptado de Sin *y cols* (5a).

Por lo que respecta al procedimiento general seguido durante la construcción del modelo, éste consiste básicamente en un proceso en 5 etapas, tal y como se indica en la Figura 6.

Es interesante señalar, que la mayoría de los modelos están construidos teniendo en mente un objetivo determinado (aunque a veces el propósito del estudio de modelado es más implícito que explícito). Después de haber especificado el objetivo (Paso 1), el estudio por lo general pasa a caracterizar el mecanismo de la reacción y otras unidades relevantes del proceso, por ejemplo la transferencia de masa o separación/extracción del producto (Paso 2). En este paso, el objetivo del modelado determina realmente el alcance y la dirección experimental de la investigación requerida, por ejemplo, si se tiene en cuenta el pH o no, o si es preciso revisar los efectos de la temperatura. Después de haber recogido los datos experimentales relevantes para la elucidación del mecanismo de reacción, el Paso 3 formula la estructura del modelo que puede implicar la definición de la cinética de reacción así como otras características de proceso tales como el modelo de reactor empleado, el tipo de mezcla (mezcla ideal vs modelos hidrodinámicos 2D o 3D), de transferencia de masa, modelo de separación, etc. En el Paso 4, se estiman los parámetros del modelo a partir de datos experimentales y/o adaptados de la literatura más relevante. Es importante mencionar, que en este paso la estimación de parámetros debería ser complementada con estudios de validación adecuados para determinar una cierta fiabilidad del modelo, fiabilidad que se debe vincular a la finalidad del estudio. Por último, en el Paso 5 el modelo se utiliza para el propósito para el que ha sido construido, por ejemplo, para simular las condiciones alternativas o procesos de regímenes de flujo. En general, se piensa que, siguiendo un procedimiento normalizado y sistemático durante la construcción del modelo (como el que se presenta en la Figura 6) se logran ciertas ventajas, puesto que se contribuye a una mayor transparencia del proceso de construcción del modelo, y se ayuda a modificar la construcción de modelos a partir de una base *ad hoc* a un método más basado en el modo general. Por último, los procedimientos estandarizados pueden facilitar la evaluación del modelo resultante y promover la transferencia de conocimiento con respecto al modelo de estudio y sus resultados entre

pares en el campo de la Biocatálisis. Para ello, sería altamente recomendable que los investigadores que trabajan en modelado desarrollen de común acuerdo directrices de modelado.

A modo de ejemplo, citaremos algunos casos recogidos en la bibliografía de lo que corresponde a modelados globales de procesos biocatalíticos, y que aparecen reflejados en la Tabla II.

Si consideramos los objetivos que se persiguen en el modelado (Paso 1), podernos distinguir los siguientes casos a partir de los ejemplos indicados en dicha Tabla II:

- Análisis cinéticos, en los cuales el modelo (construido basándose en el mecanismo de la reacción, p.e., mecanismos ping-pong bi-bi) se usa para identificar la velocidad de reacción y la cinética del proceso.
- Análisis del proceso, en los cuales se emplea un modelo validado para la evaluación continua de diferentes parámetros y configuraciones, y de esta forma simular todo el proceso, en un modelo netamente predictivo, y;
- Diseño; en este caso, el modelo se emplea para dimensionar las unidades implicadas en el proceso, para llegar a un rendimiento final deseado y así poder evaluar la viabilidad económica global.

Como puede observarse en la Tabla II, la mayoría de los modelos desarrollados se centran en el objetivo 1, el análisis cinético., lo que no deja de ser necesario como un primer paso para entender el mecanismo intrínseco, la velocidad y las limitaciones inherentes al proceso (inhibición, limitaciones difusionales, etc). En este sentido, Paiva *y cols* (59) realizaron un estudio detallado de las cinéticas y los mecanismos de Bioprocesos catalizados por lipasas, concluyendo que los datos cinéticos y los termodinámicos no pueden considerarse de una manera aislada sino integrada.

Tabla II.- Ejemplos de Modelos de reacción, reactor y proceso aplicados a biotransformaciones.

Propósito	*Proceso*	*Estructura del modelo*	*Identificación del modelo*			
			Parámetros	***Variables***	***datos***	***Ref.***
Análisis cinético	Hidrólisis de adipil-7-ADCA hasta 7-ADCA usando glutaril acilasa inmovilizada	Modelo termodinámico basado en cálculo de rendimientos y constantes de equilibrio. Cinéticas reversibles de reacción en dos pasos, con correcciones de temperatura tipo Arrhenius	7	3	14 equilibrios 3 velocidades de reacción 12 experimentos a distintas temperaturas	Schroën *y cols*[60]
Análisis cinético	Síntesis de cefalexina usando fenilglicinamida y 7 ADCA catalizada por Assemblase® (Penicilinacilasa inmovilizada)	Cinéticas reversibles de reacción en dos pasos, con correcciones de temperatura tipo Arrhenius	10	¿?	15 experimentos de síntesis e hidrólisis	Schroën *y cols*[61]
Análisis cinético	Biotransformación de benzaldehído en (*R*)-mandelonitrilo catalizada por hidroxinitrilolíasa de *Prunus amygdalus.*	Modelo cinético tipo bi-uni reversible considerando la transferencia de materia entre fase acuosa y fase orgánica, así como balances de materia	10	6	11 curvas de progreso y experimentos de transferencia de materia. 11 experimentos de validación	Willeman *y cols*[62]
Análisis cinético	Acilación de glucosa con ácido láurico en 2-metil-2-butanoil catalizada por lipasa de *Candida antarctica.*	Modelo cinético reversible simplificado tipo ping-pong bi-bi.	3	4	3 velocidades iniciales 1 curva de progreso 1 experimento de equilibrio	Flores *y cols*[63]
Análisis cinético	Transformación de pseudocumeno en dimetilbenzaldehido catalizada por células enteras recombinantes de *E.coli* con actividad xilenomonooxigenasa	Cinéticas de bioconversión, crecimiento celular, transferencia de materia, balances de materia entre las fases acuosas y orgánicas	23	7	4 reactores tipo fed-batch de 2L y de 30L.	Bühler *y cols*[64]

Análisis cinético	Esterificación de ácido propiónico con 1-butanol en un sistema bifásico agua/*n*-decano catalizada por lipasa B de *Candida antarctica.*	Mecanismo ping-pong bi-bi con inhibición competitiva del alcohol	4	3	Experimentos de velocidad inicial de reacción en reactores a escala de laboratorio	Swarts *y cols*[65]
Análisis cinético	Resolución cinética de 1-metoxi-2-propanol por transesterificación con acetato de etilo catalizada por lipasa	Mecanismo extendido tipo ping-pong bi-bi reversible con inhibición (tipo Haldane) acoplado a un modelo de difusión	11	6	6 velocidades iniciales 1 experimento para determinar el exceso enantiomérico	Berendsen *y cols*[66]
Análisis del proceso	Hidrólisis enzimática de adipil-7-ADCA usando glutaril acilasa inmovilizada	Modelo de Schroën *y cols*[60] extendido con velocidad de pseudo-primer orden para la degradación del producto	10	3	1 experimento de validación	Schroën *y cols*[67]
Análisis del proceso	Síntesis de (*R*)-mandelonitrilo en un sistema bifásico orgánico-acuoso	Modelo de Willeman *y cols*[62]	10	6	¿?	Willeman *y cols*[68]
Análisis del proceso	Oxidación tipo Baeyer-Villiguer catalizada por células recombinantes de *E.coli*	Análisis del régimen del proceso usando relaciones lineales con restricciones de desigualdades	3	3	2 experimentos en régimen de planta piloto (50 L)	Law *y cols*[69]
Análisis del proceso	Resolución cinética de 1-metoxi-2-propanol por transesterificación con acetato de vinilo catalizada por lipasa	Modelos 2D (balances de materia y energía) acoplados a modelos cinéticos y difusionales de Berendsen *y cols*[66]	11	6	Validación con datos de exceso enantiomérico y de rendimiento del proceso	Berendsen *y cols*[70]

Análisis del proceso	Creación de enlaces C-C catalizada por transcetolasa usando hidroxipiruvato como donador del sintón cetólico	Mecanismo tipo ping-pong bi-bi con inhibición por exceso de sustrato integrado con variables empíricas del proceso	7	3	Datos bibliográficos	Chen *y cols*[71]
Diseño del proceso	Isomerización enzimática de glucosa hasta fructosa catalizada por glucosa isomerasa inmovilizada.	Modelo integrado de proceso consistente en balances de materia, velocidades de reacción (Michaelis-Menten reversibles), desactivación enzimática y limitaciones de transferencia de materia, debido a la inmovilización	¿?	¿?	Sin información	Illanes *y cols*[72]
Diseño del proceso	Oxidación de *n*-octano a 1-octanol catalizada por células de Pseudomonas oleovorans en un reactor tipo fed-batch y fermentaciones en contínuo + recuperación y purificación de los productos	Balances (en estado estacionario) de materia y energía para cada unidad del proceso (19 en total), desde almacenamiento de materiales de partida hasta fermentación, recuperación de productos	Sin información	Sin información	Sin información	Mathys *y cols*[73]
Diseño del proceso	Producción enzimática de siropes a partir de suero de leche hidrolizado e isomerizado, catalizada por lactasa y glucosa isomerasa inmovilizadas	Modelo de proceso que usa cinéticas enzimáticas con inhibición competitiva, limitaciones despreciables de transferencia de masa, inactivación enzimática y modelo (en estado estacionario) de reactor de lecho empaquetado.	21	4	¿?	Illanes *y cols*[74]

Aparte del propósito del análisis cinético, se ha puesto la atención en el desarrollo de modelos para ser usados para el análisis del proceso (objetivo 2). Por ejemplo, los modelos de Berendsen *y cols* (70) y de Chen *y col.* (71) han empleado simulaciones de modelo y sugieren que éste puede ser empleado para el diseño del proceso (objetivo 3). Asimismo, los modelos de Illanes *y col.* (72), Schroën *y col.* (67) y Willeman *y col.* (68), usan los de procesos

(obtenidos previamente basándose en datos experimentales), para evaluar las diferentes configuraciones del proceso, así como las limitaciones intrínsecas llevando a cabo simulaciones. Estos estudios, son realmente valiosos, pues demuestran cómo las simulaciones modeladas son útiles para evaluar el comportamiento del proceso si se varía el tipo de reactor o la configuración del mismo.

Por lo que respecta al diseño (objetivo 3), el estudio de Mathys *y col.* (73) se diferencia claramente de los otros, puesto que se centra de manera primaria en el uso del modelo para el diseño detallado del proceso, de manera que puede ser utilizado para una estimación del coste del mismo.

En otro orden de cosas, queda claro a la luz de los datos presentados en la Tabla II que la mayoría de los modelos pueden ser clasificados como mecanísticos, es decir, modelos que se construyen asumiendo un mecanismo de reacción determinado. Cuando el enfoque del modelo es el diseño del reactor, los balances de masa deben ser incluidos para describir o comparar diferentes configuraciones de reactores (batch o fed-batch *vs* continuo). Por otra parte, las limitaciones de transferencia de masa se consideran sobre todo cuando se construyen modelos para sistemas de enzimas inmovilizadas (74) así como sistemas bifásicos (por ejemplo, entre fase orgánica y acuosa cuando se utilizan disolventes orgánicos en procesos biocatáliticos (62, 64, 75)). Los efectos de mezcla y la hidrodinámica en reactores no se tienen en cuenta tradicionalmente asumiendo condiciones de mezcla ideales (concentración homogénea en todo el reactor), que se describen con el concepto de reactor de tanque agitado continuo (CSTR). El estudio de Berendsen *y col.* (70) por otra parte, basado en una descripción detallada de la mezcla en el reactor por medio de un modelo 2D, se ha revelado muy útil para capturar el perfil del gradiente de sustrato en un reactor de lecho fluidizado. En resumen, la mayoría de los modelos mecanísticos, describen fenómenos que van desde la cinética (velocidad) a la conservación de la energía/masa a las limitaciones de transferencia de masa y mezcla/hidrodinámica. Sin embargo, no se ha convertido en estándar la práctica de considerar todo al mismo tiempo cuando se construyen modelos de procesos. Para finalizar, hemos de considerar que, en comparación con las reacciones catalizadas químicamente, las

reacciones enzimáticas tienen tres características típicas. La primera característica, es la selectividad de la reacción. La mayoría de las reacciones catalizadas químicamente no son selectivas, es decir, se catalizan reacciones similares con diferentes tipos de sustratos o reactivos. Aunque algunas enzimas se han caracterizado por no ser muy selectivas, la gran mayoría servirá para catalizar una sola reacción que implique sólo a ciertos sustratos. Por lo tanto, a diferencia de las reacciones catalizadas químicamente, que precisan usar ecuaciones diferenciales para ser descritas, los modelos cinéticos biocatáliticos pueden normalmente ser expresados por una única ecuación de velocidad. La segunda característica que las distingue es la sensibilidad a las condiciones operativas. Esto significa que, por ejemplo, la dependencia cinética de pH y la temperatura es siempre necesaria y puede dar lugar a parámetros adicionales en la expresión. Por último, la tercera y más importante diferencia es la presencia de sustrato y de inhibición por producto sobre la actividad de la enzima a altas concentraciones. Esto es un elemento vital de las expresiones velocidad de reacción de bioconversión y hace que los modelos cinéticos de reacción enzimática sean más difíciles de determinar, puesto que requieren de la estimación de muchos parámetros en una sola ecuación diferencial. Esto conduce automáticamente a la cuestión de la identificabilidad, es decir si pueden estimarse los parámetros del modelo de forma fiable a partir de las mediciones disponibles. Para una discusión detallada de estos aspectos, que quedaría fuera de los objetivos de la presente revisión, remitimos al lector al excelente trabajo de Sin *y col.* (5a), en el cual se precisan todos los aspectos que refieren a la identificabilidad de los modelos biocatalíticos, y a la predicción de incertidumbre en los mismos.

4. CONCLUSIÓN Y PROGNOSIS

La aplicación del modelado matemático en procesos enzimáticos se ha desarrollado de manera considerable a lo largo de los últimos 20 años, y pensamos que su importancia irá en aumento en un futuro no muy lejano. El diseño integrado del proceso biocatalítico, considerando todos los niveles reseñados (Catalizador, Reacción, Reactor y Proceso) y la interacción entre los mismos constituye pues una buena estrategia de abordaje del problema del modelado de una reacción biocatalítica. En este sentido, quizá en el nivel del

catalizador exista una mayor información disponible hoy día; en efecto, el Modelado Molecular constituye una herramienta de gran utilidad para la Biocatálisis aplicada, pues permite interpretar de manera racional el proceso de interacción entre una enzima y su sustrato, y proporciona datos fiables que permiten predecir el comportamiento del sistema.

Sin duda, los grandes avances en el campo de la Bioinformática, asociados al empleo de medios computacionales cada vez más sofisticados, auguran que en poco tiempo nuestra capacidad de extraer conclusiones racionales de los procesos biocatalizados debería aumentar de forma considerable, por lo que, en nuestra modesta opinión, creemos que en los próximos años este área de investigación debería experimentar un considerable aumento en la cantidad de estudios realizados, así como en la calidad de los mismos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. (a) Meyer, H.-P.; Ghisalba, O.; Leresche, J. E., *Biotransformations and the Pharma Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2010; (b) Rajagopalan, A.; Kroutil, W., Biocatalytic reactions: selected highlights. *Mater. Today* **2011,** *14* (4), 144-152; (c) Nestl, B. M.; Nebel, B. A.; Hauer, B., Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011,** *15* (2), 187-193; (d) Gotor, V.; Flitsch, S., Increasing the diversity of biocatalytic reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011,** *15* (2), 185-186.

2. Tao, J.; Xu, J.-H., Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009,** *13*, 1-8.

3. (a) Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,: Weinheim, 2007; (b) Sheldon, R. A.; van Rantwijk, F., Biocatalysis for sustainable organic synthesis. *Aust. J. Chem.* **2004,** *57* (4), 281-289; (c) Sanchez, S.; Demain, A. L., Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. *Organic Process Research & Development* **2011,** *15* (1), 224-230.

4. (a) Tucker, J. L., Green Chemistry: Cresting a Summit toward Sustainability. *Organic Process Research & Development* **2010,** *14* (2), 328-331; (b) Anastas, P.; Eghbali, N., Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010,** *39* (1), 301-312.

5. (a) Sin, G.; Woodley, J. A.; Gernaey, K. V., Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective. *Biotechnol. Progr.*

2009, *25* (6), 1529-1538; (b) Tufvesson, P.; Fu, W.; Jensen, J. S.; Woodley, J. M., Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* **2010,** *88* (1), 3-11.

6. Glassey, J.; Gernaey, K. V.; Clemens, C.; Schulz, T. W.; Oliveira, R.; Striedner, G.; Mandenius, C. F., Process analytical technology (PAT) for biopharmaceuticals. *Biotechnology Journal* **2011,** *6* (4), 369-377.

7. Kazlauskas, R. J., Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* **2000,** *4* (1), 81-8.

8. Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **2001,** *409* (6817), 241-246.

9. Braiuca, P.; Ebert, C.; Basso, A.; Linda, P.; Gardossi, L., Computational methods to rationalize experimental strategies in biocatalysis. *Trends Biotechnol* **2006,** *24* (9), 419-425.

10. Nevins, N.; Allinger, N. L., Molecular mechanics (MM4) vibrational frequency calculations for alkenes and conjugated hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry* **1996,** *17* (5-6), 730-746.

11. Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J., The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **2005,** *26* (16), 1668-1688.

12. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M., CHARMM - A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* **1983,** *4* (2), 187-217.

13. Sanchez-Montero, J. M. In *Modelado molecular como herramienta en el diseño racional de fármacos.*, Mesa Redonda sobre innovación farmacéutica, 2008; Real Academia Nacional de Farmacia: 2009.

14. Bornscheuer, U.; Kazlauskas, R. J., *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations.* 2nd ed.; WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2006.

15. (a) Pleiss, J.; Scheib, H.; Schmid, R. D., The His gap motif in microbial lipases: a determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochimie* **2000,** *82* (11), 1043-52; (b) Mittal, S.; Khanna, S.; Roy, A.; Bharatam, P. V.; Chawla, H. P. S., Candida rugosa lipase mediated multigram synthesis of acid part of S(+)-atliprofen, a new NSAID and molecular modeling studies aimed at predicting selectivity of the enzyme. *Enzyme Microb Tech* **2005,** *36* (2-3), 232-238.

16. (a) Gascoyne, D. G.; Finkbeiner, H. L.; Chan, K. P.; Gordon, J. L.; Stewart, K. R.; Kazlauskas, R. J., Molecular basis for enantioselectivity of lipase from Chromobacterium

viscosum toward the diesters of 2,3-dihydro-3-(4'-hydroxyphenyl)-1,1,3-trimethyl-1H-inden-5-ol. *Journal of Organic Chemistry* **2001,** *66* (9), 3041-3048; (b) Luic, M.; Stefanic, Z.; Ceilinger, I.; Hodoscek, M.; Janezic, D.; Lenac, T.; Asler, I. L.; Sepac, D.; Tomic, S., Combined X-Ray Diffraction and QM/MM Study of the Burkholderia cepacia Lipase-Catalyzed Secondary Alcohol Esterification. *J. Phys. Chem. B* **2008,** *112* (16), 4876-4883.

17. Zuegg, J.; Honig, H.; Schrag, J. D.; Cygler, M., Selectivity of lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1997,** *3* (1-4), 83-98.

18. (a) Colombo, G.; Toba, S.; Merz, K. M., Rationalization of the enantioselectivity of subtilisin in DMF. *J. Am. Chem. Soc.* **1999,** *121* (14), 3486-3493; (b) Otte, N.; Bocola, M.; Thiel, W., Force-Field Parameters for the Simulation of Tetrahedral Intermediates of Serine Hydrolases. *Journal of Computational Chemistry* **2009,** *30* (1), 154-162.

19. Goodford, P. J., A computational-procedure for determining energetically favorable binding-sites on biologically important macromolecules

J. Med. Chem. **1985,** *28* (7), 849-857.

20. (a) Basso, A.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P.; Benedetti, F., GRID/tetrahedral intermediate computational approach to the study of selectivity of penicillin G acylase in amide bond synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2002,** *1601* (1), 85-92; (b) Basso, A.; Braiuca, P.; Clementi, S.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P., Computational analysis of the aminic subsite of PGA explains the influence of amine structure on enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002,** *19-20*, 423-430.

21. Strübing, D.; Neumann, H.; Klaus, S.; Jacobi von Wangelin, A.; Gördes, D.; Beller, M.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Kragl, U., Enzymatic resolution of 4-*N*-phenylacetylamino-derivatives obtained from multicomponent reactions using PenG amidase and in silico studies. *Tetrahedron* **2004,** *60* (3), 683-691.

22. Raza, S.; Fransson, L.; Hult, K., Enantioselectivity in Candida antarctica lipase B: a molecular dynamics study. *Protein Sci* **2001,** *10* (2), 329-38.

23. Ottosson, J.; Fransson, L.; Hult, K., Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: an experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science* **2002,** *11* (6), 1462-71.

24. Felluga, F.; Pitacco, G.; Valentin, E.; Coslanich, A.; Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Pricl, S., Studying enzyme enantioselectivity using combined ab initio and free energy calculations: [alpha]-chymotrypsin and methyl cis- and trans-5-oxo-2-pentylpirrolidine-3-carboxylates. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003,** *14* (21), 3385-3399.

25. (a) Kazlauskas, R., Modeling - A tool for experimentalists. *Science* **2001,** *293* (5538), 2277-+; (b) Park, J.-H.; Ha, H.-J.; Lee, W. K.; Généreux-Vincent, T.; Kazlauskas, R. J.,

Molecular Basis for the Stereoselective Ammoniolysis of *N*-Alkyl Aziridine-2-Carboxylates Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Chembiochem* **2009,** *10* (13), 2213-2222.

26. Henke, E.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, R. D.; Pleiss, J., A molecular mechanism of enantiorecognition of tertiary alcohols by carboxylesterases. *Chembiochem* **2003,** *4* (6), 485-493.

27. (a) Borreguero, I.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.; Rumbero, A.; Hermoso, J. A.; Alcántara, A. R., Regioselective resolution of 1,n-diols catalysed by lipases: a rational explanation of the enzymatic selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001,** *11* (4-6), 1013-1024; (b) Borreguero, I.; Sinisterra, J. V.; Rumbero, A.; Hermoso, J. A.; Martínez-Ripoll, M.; Alcántara, A. R., Acyclic phenylalkanediols as substrates for the study of enzyme recognition. Regioselective acylation by porcine pancreatic lipase: a structural hypothesis for the enzymatic selectivity. *Tetrahedron* **1999,** *55* (52), 14961-14974.

28. Ke, T.; Tidor, B.; Klibanov, A. M., Molecular-modeling calculations of enzymatic enantioselectivity taking hydration into account. *Biotechnol. Bioeng.* **1998,** *57* (6), 741-745.

29. Ke, T.; Klibanov, A. M., Insights into the solvent dependence of chymotryptic prochiral selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **1998,** *120* (18), 4259-4263.

30. Guinto, E. R.; Caccia, S.; Rose, T.; Futterer, K.; Waksman, G.; Di Cera, E., Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999,** *96* (5), 1852-1857.

31. Adlercreutz, P., Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents. In *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, Carrea, G.; Riva, S., Eds. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008; pp 3-24.

32. Itoh, T.; Tomoko, M., Biotransformation in ionic liquid. In *Future Directions in Biocatalysis*, Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2007; pp 3-20.

33. Matsuda, T.; Harada, T.; Nakamura, K.; Ikariya, T., Asymmetric synthesis using hydrolytic enzymes in supercritical carbon dioxide. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005,** *16* (5), 909-915.

34. Reetz, M. T., Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **2002,** *6* (2), 145-150

35. (a) Schmid, R. D.; Verger, R., Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998,** *37* (12), 1609-1633; (b) Miled, N.; Beisson, F.; de Caro, J.; de Caro, A.; Arondel, V.; Verger, R., Interfacial catalysis by lipases'. *J Mol Catal B-Enzym* **2001,** *11* (4-6), 165-171.

36. (a) Overbeeke, P. L. A.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Jongejan, J. A.; Heijnen, J. J., Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *J Mol Catal B-Enzym* **2000,** *10* (4), 385-393; (b) Secundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; Brocca, S.; Lotti, M., Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated Candida rugosa lipase isoform 1 in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **2004,** *86* (2), 236-240; (c) Secundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; Gatti-Lafranconi, P.; Brocca, S.; Lotti, M.; Jaeger, K. E.; Puls, M.; Eggert, T., The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J Mol Catal B-Enzym* **2006,** *39* (1-4), 166-170.

37. (a) Peters, G. H.; vanAalten, D. M. F.; Edholm, O.; Toxvaerd, S.; Bywater, R., Dynamics of proteins in different solvent systems: Analysis of essential motion in lipases. *Biophys J* **1996,** *71* (5), 2245-2255; (b) Jaaskelainen, S.; Verma, C. S.; Hubbard, R. E.; Linko, P.; Caves, L. S. D., Conformational change in the activation of lipase: An analysis in terms of low-frequency normal modes. *Protein Science* **1998,** *7* (6), 1359-1367; (c) Peters, G. H.; Bywater, R. P., Computational analysis of chain flexibility and fluctuations in Rhizomucor miehei lipase. *Protein Eng* **1999,** *12* (9), 747-754; (d) Peters, G. H.; Bywater, R. P., Influence of a lipid interface on protein dynamics in a fungal lipase. *Biophys J* **2001,** *81* (6), 3052-3065; (e) Jensen, M. O.; Jensen, T. R.; Kjaer, K.; Bjornholm, T.; Mouritsen, O. G.; Peters, G. H., Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations. *Biophys J* **2002,** *83* (1), 98-111; (f) Peters, G. H.; Bywater, R. P., Essential motions in a fungal lipase with bound substrate, covalently attached inhibitor and product. *J Mol Recognit* **2002,** *15* (6), 393-404; (g) Tejo, B. A.; Salleh, A. B.; Pleiss, J., Structure and dynamics of Candida rugosa lipase: the role of organic solvent. *J Mol Model* **2004,** *10* (5-6), 358-366; (h) Cherukuvada, S. L.; Seshasayee, A. S. N.; Raghunathan, K.; Anishetty, S.; Pennathur, G., Evidence of a double-lid movement in Pseudomonas aeruginosa lipase: Insights from molecular dynamics simulations. *Plos Comput Biol* **2005,** *1* (3), 182-189; (i) James, J. J.; Lakshmi, B. S.; Seshasayee, A. S. N.; Gautam, P., Activation of Candida rugosa lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study. *FEBS Lett.* **2007,** *581* (23), 4377-4383.

38. (a) Guieysse, D.; Sandoval, G.; Faure, L.; Nicaud, J. M.; Monsan, P.; Marty, A., New efficient lipase from Yarrowia lipolytica for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron-Asymmetr* **2004,** *15* (22), 3539-3543; (b) Guieysse, D.; Cortes, J.; Puech-Guenot, S.; Barbe, S.; Lafaquiere, V.; Monsan, P.; Simeon, T.; Andre, I.; Remaud-Simeon, M., A structure-controlled investigation of lipase enantioselectivity by a path-planning approach. *Chembiochem* **2008,** *9* (8), 1308-17.

39. Barbe, S.; Lafaquière, V.; Guieysse, D.; Monsan, P.; Remaud-Siméon, M.; André, I., Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2009,** *77* (3), 509-523.

40. Cedrone, F.; Ménez, A.; Quéméneur, E., Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000,** *10* (4), 405-410.

41. Scheib, H.; Pleiss, J.; Stadler, P.; Kovac, A.; Potthoff, A. P.; Haalck, L.; Spener, F.; Paltauf, F.; Schmid, R. D., Rational design of Rhizopus oryzae lipase with modified stereoselectivity toward triradylglycerols. *Protein Eng* **1998,** *11* (8), 675-82.

42. Liu, H.; Talmud, P. J.; Lins, L.; Brasseur, R.; Olivecrona, G.; Peelman, F.; Vandekerckhove, J.; Rosseneu, M.; Labeur, C., Characterization of recombinant wild type and site-directed mutations of apolipoprotein C-III: lipid binding, displacement of ApoE, and inhibition of lipoprotein lipase. *Biochemistry* **2000,** *39* (31), 9201-12.

43. Razzaghi, H.; Day, B. W.; McClure, R. J.; Kamboh, M. I., Structure-function analysis of D9N and N291S mutations in human lipoprotein lipase using molecular modelling. *J Mol Graph Model* **2001,** *19* (6), 487-94, 587-90.

44. Manetti, F.; Mileto, D.; Corelli, F.; Soro, S.; Palocci, C.; Cernia, E.; D'Acquarica, I.; Lotti, M.; Alberghina, L.; Botta, M., Design and realization of a tailor-made enzyme to modify the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by Candida rugosa lipase. *Bba-Protein Struct M* **2000,** *1543* (1), 146-158.

45. Funke, S. A.; Otte, N.; Eggert, T.; Bocola, M.; Jaeger, K. E.; Thiel, W., Combination of computational prescreening and experimental library construction can accelerate enzyme optimization by directed evolution. *Protein Engineering Design & Selection* **2005,** *18* (11), 509-514.

46. Jaeger, K. E.; Eggert, T., Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004,** *15* (4), 305-13.

47. (a) Bolon, D. N.; Voigt, C. A.; Mayo, S. L., De novo design of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002,** *6* (2), 125-129; (b) Morley, K. L.; Kazlauskas, R. J., Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* **2005,** *23* (5), 231-237.

48. (a) Müller, M., Chemical diversity through biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004,** *15* (6), 591-598; (b) Kazlauskas, R. J., Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005,** *9* (2), 195-201; (c) Khersonsky, O.; Roodveldt, C.; Tawfik, D. S., Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006,** *10* (5), 498-508; (d) Hult, K.; Berglund, P., Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.* **2007,** *25* (5), 231-238.

49. Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125* (4), 874-875.

50. Carlqvist, P.; Svedendahl, M.; Branneby, C.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., Exploring the active-site of a rationally redesigned lipase for catalysis of Michael-type additions. *Chembiochem* **2005,** *6* (2), 331-336.

51. (a) Tomic, S.; Dobovicnik, V.; Sunjic, V.; Kojic-Prodic, B., Enantioselectivity of Pseudomonas cepacia lipase towards 2-methyl-3(or 4)-arylalkanols: An approach based on the stereoelectronic theory and molecular modeling. *Croat Chem Acta* **2001,** *74* (2), 343-357; (b) Tomic, S.; Kojic-Prodic, B., A quantitative model for predicting enzyme enantio selectivity: application to Burkholderia cepacia lipase and 3-(aryloxy)-1,2-propanediol derivatives. *J Mol Graph Model* **2002,** *21* (3), 241-252; (c) Tomic, S.; Bertosa, B.; Kojic-Prodic, B.; Kolosvary, I., Stereoselectivity of Burkholderia cepacia lipase towards secondary alcohols: molecular modelling and 3D QSAR approach. *Tetrahedron-Asymmetr* **2004,** *15* (7), 1163-1172.

52. Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S., GRid-INdependent descriptors (GRIND): A novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *J. Med. Chem.* **2000,** *43* (17), 3233-3243.

53. Cruciani, G.; Pastor, M.; Guba, W., VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur J Pharm Sci* **2000,** *11*, S29-S39.

54. Braiuca, P.; Boscarol, L.; Ebert, C.; Linda, P.; Gardossi, L., 3D-QSAR applied to the quantitative prediction of penicillin G amidase selectivity. *Adv Synth Catal* **2006,** *348* (6), 773-780.

55. Braiuca, P.; Lorena, K.; Ferrario, V.; Ebert, C.; Gardossi, L., A Three-Dimensional Quanititative Structure-Activity Relationship (3D-QSAR) Model for Predicting the Enantioselectivity of Candida antarctica Lipase B. *Adv Synth Catal* **2009,** *351* (9), 1293-1302.

56. Carballeira, J. D.; Quezada, M. A.; Alvarez, E.; Sinisterra, J. V., High throughput screening and QSAR-3D/CoMFA: Useful tools to design predictive models of substrate specificity for biocatalysts. *Molecules* **2004,** *9* (8), 673-693.

57. Sanchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V., Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **2007,** *73* (4), 1199-1236.

58. Woodley, J. M.; Bisschops, M.; Straathof, A. J. J.; Ottens, M., Future directions for in-situ product removal (ISPR). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008,** *83* (2), 121-123.

MONOGRAFÍAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

RANF



INSTITUTO DE ESPAÑA

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE EDUCACIÓN