

# HERRAMIENTAS Y ESTRATEGIAS PARA DISEÑAR RUTAS ENZIMÁTICAS LIBRES DE CÉLULAS

por MARÍA BECERRA REGUERA<sup>1</sup>, ALEJANDRO PEÑA TRABALÓN<sup>1</sup> Y JOSÉ MORA PERUJO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GRADO EN INGENIERÍA DE LA SALUD, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA. <sup>2</sup> GRADO EN BIOQUÍMICA, MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

MERYBECE21@GMAIL.COM; ALEJANDROPT98@GMAIL.COM; JOSEMORPER96@GMAIL.COM

Enviado: 12/11/2019

Aceptado: 18/02/2020

## Introducción

El campo de la tecnología de enzimas y la biocatálisis se ha convertido en el foco principal de la síntesis orgánica «verde» de productos químicos debido a la mayor demanda de producción química sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Las enzimas son catalizadores sobresalientes debido a su alta especificidad, lo que puede traducirse en una generación de productos con poca cantidad de moléculas secundarias derivadas de dicha síntesis.

La industria se ha basado en gran medida en los catalizadores químicos tradicionales, como metales de transición o adición de disolventes orgánicos o ácidos; ya que son más baratos, más robustos y se pueden evaluar rápidamente. Sin embargo, cuando se desea una alta pureza, condiciones de reacción moderadas y operaciones respetuosas con el medio ambiente, es preferible la aplicación de enzimas a los catalizadores químicos convencionales, particularmente en el caso de la síntesis de fármacos donde dicha pureza es un objetivo clave. La elección de las enzimas para la catálisis se debe a su especificidad, ya que estas son capaces de distinguir incluso entre dos isómeros cuyos átomos están dispuestos espacialmente de manera distinta (estereoisomería)<sup>[1]</sup>.

El uso de las reacciones enzimáticas con fines industriales se ha servido tradicionalmente de células vivas (síntesis *in vivo*). Sin embargo, el uso de la síntesis *in vivo* al tratarse de vías multienzimáticas se vuelve un desafío que, a menudo, produce un bajo rendimiento debido a la complejidad metabólica del huésped, donde los sustratos y productos pueden desviarse hacia otras rutas metabólicas celulares, o bien actuar como tóxicos para la propia célula, provocando una reducción del rendimiento en la producción del compuesto deseado.

Como consecuencia, se han intentado ensamblar, cada vez más, vías multienzimáticas sin células, permitiendo generar una construcción de varias enzimas

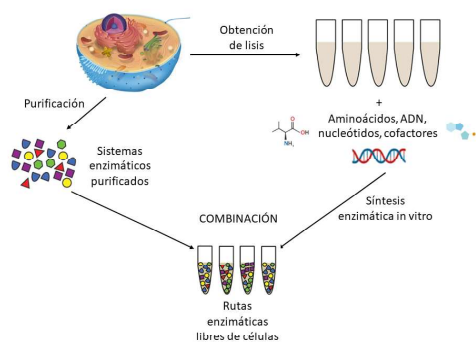
procedentes de distintas rutas metabólicas para producir una serie de moléculas concretas, sin necesidad de modificaciones genéticas del organismo huésped y soslayando la posible interferencia de procesos regulatorios intracelulares. En consecuencia, este enfoque proporciona una gran flexibilidad y control para optimizar y depurar el sistema de producción de compuestos de interés industrial<sup>[2]</sup>.

## Biología sintética y biocatálisis sin células

La biocatálisis sin células se ha convertido en un procedimiento adecuado recientemente, con amplias posibilidades cuando se vincula al campo de la biología sintética. La expresión «libre de células» requiere de la traducción *in vitro* del ARN mensajero codificante de las enzimas deseadas, usando todos los componentes celulares y moleculares necesarios para ello. Esta opción acarrea consigo problemas como son un alto coste de los reactivos, bajos rendimientos de las reacciones y reducción de la actividad enzimática como consecuencia de un plegamiento inadecuado, debido a la maquinaria intracelular responsable de la conformación nativa de las enzimas, situación en la que estas son biológicamente activas<sup>[1]</sup>.

Por lo tanto, la alternativa para conseguir las enzimas necesarias para el ensamblaje de rutas multienzimáticas sería la purificación a partir de células u otras fuentes que las contengan, mediante, por ejemplo, procesos cromatográficos.

La biocatálisis libre de células es un socio atractivo para la biología sintética, ya que muchas de las restricciones ejercidas por las células se eliminan, lo que significa que, en teoría, pueden crearse multitud de rutas enzimáticas *in silico*, por lo que el concepto de ingeniería metabólica libre se hace aún más patente.



**Figura 1.** Mecanismo de obtención de rutas enzimáticas. Imagen de elaboración propia.

## Estrategias de diseño de la ruta

Las distintas rutas multienzimáticas libres de enzimas pueden generarse siguiendo principalmente dos puntos de partida: ensamblaje a partir de ciertas rutas metabólicas presentes en la naturaleza o bien tomar enzimas de distintas rutas para crear una nueva [2].

**Rutas sintéticas derivadas de rutas metabólicas naturales.** Son versiones modificadas o combinaciones de rutas metabólicas preexistentes, que en ocasiones son capaces de producir cantidades similares o superiores que las rutas naturales, pero con un consumo reducido, lo que implica una vía más económica de biocatálisis.

**Rutas sintéticas *de novo*.** Se diseñan rutas *de novo* cuando las rutas naturales o derivadas de la naturaleza todavía no permiten la síntesis del compuesto deseado de una manera eficiente. Se trata de un enfoque *in silico* limitado por la disponibilidad de enzimas, sus propiedades cinéticas y las reacciones que catalizan.

**Retrosíntesis biocatalítica.** Se utiliza para el diseño de rutas de enzimas *de novo* de forma efectiva. Sugiere una vía para la interconversión de un producto objetivo en los materiales de inicio disponibles en función de las reacciones catalizadas por enzimas y la termodinámica. Es un enfoque *in silico* usando modelos de restricción.

## Sustratos renovables

Los sustratos más comunes utilizados en la biocatálisis con múltiples enzimas son los suministrados por la refinera (glucosa) o los costosos procesos de fermentación, por ejemplo, láctica (glucosa-6-fosfato).

El uso de residuos renovables representa una fuente de sustratos más atractiva. Las fuentes potenciales incluyen desechos agrícolas, industriales y municipales, ya que sus componentes principales incluyen biopolímeros como la celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón, todos los cuales se han identificado como sustratos potencialmente útiles, por ejemplo, para la producción de biocombustibles [3].

La disponibilidad y el precio de la biomasa como sustrato es crucial para la viabilidad económica y la sostenibilidad de una producción (bio) química a gran escala.

## Factores de la biocatálisis

A la hora de estructurar una futura ruta multienzimática hay que tener en cuenta una serie de elementos claves para ensamblar eficientemente dicha ruta metabólica. De entre estas pueden destacarse:

**Enzimas.** Pueden ser de una amplia gama de fuentes naturales. Se combinan de forma óptima las enzimas para conseguir una alta eficiencia. En las rutas libres de células, las enzimas deben tener una afinidad ( $K_M$ ) baja para que los productos puedan desligarse eficientemente una vez finalizada la reacción, y deben tener una constante catalítica alta ( $k_{cat}$ ) que da cuenta de lo procesiva que es dicha enzima. Esta relación  $k_{cat}/K_M$  da cuenta de la eficiencia de la enzima. Otras características deseadas son una alta estabilidad y condiciones similares de temperatura y pH entre enzimas de la misma ruta.

**Regeneración de cofactores para una biocatálisis rentable.** Los cofactores son moléculas necesarias por ciertas enzimas para realizar su función catalítica. Como ejemplo, las enzimas que realizan reacciones de oxidación-reducción precisan de  $NAD(P)^+$  o  $NAD(P)H$ , por lo que es deseable que en la misma ruta en la que se consuman, posteriormente se recuperen. Por lo tanto, la integración de vías de regeneración del cofactor en el proceso biocatalítico para minimizar la dependencia y los costos del cofactor es algo importante.

**Coinmovilización de las vías multienzimáticas.** Las enzimas inmovilizadas suelen ser más estables en condiciones físicas y químicas extremas, se pueden eliminar fácilmente de la mezcla de la reacción, lo que permite su reciclaje, purificación simplificada y, por tanto, menores costos. Se dividen las enzimas en compartimentos separados para prevenir la formación de reacciones secundarias indeseables. Puede

ser mediante atrapamiento físico (mediante esterificación con polímeros como el alginato, por ejemplo) o por afinidad (uniéndose a otras moléculas, como anticuerpos).

**Modelado cinético *in silico* para mejorar el rendimiento de las vías.** Se trata de una modelización de la ruta usando distintas enzimas de diversa procedencia, por lo que puede ayudar a ajustar la enzima inicial, el sustrato y cargas de cofactor y determinación de otros parámetros óptimos.

**Análisis de metabolitos de alto rendimiento para la optimización del sistema.** Los principales fallos pueden ser la acumulación de intermediarios de reacción que causen inhibición enzimática y la formación de subproductos inesperados a través de la acción enzimática promiscua. Existen estrategias para monitorizar los flujos en la biocatálisis multienzimática.

En conclusión, estos son tiempos emocionantes para la biocatálisis con múltiples enzimas libres de células y el progreso se está realizando a un ritmo considerable, ya sea para la producción de biocombustibles, fármacos<sup>[4]</sup> o para reemplazar pasos individuales en la síntesis orgánica clásica<sup>[2]</sup>.

El diseño de rutas de enzimas más sofisticadas es una tarea desafiante, pero crucial para el éxito de la biocatálisis en entornos académicos e industriales. Se prevé que el progreso en la retrosíntesis biocatalítica y el diseño de rutas computacionales acelerará el desarrollo de vías novedosas y ampliará aún más el repertorio de rutas de síntesis impulsadas por enzimas, con el objetivo final de reemplazar rutas no económicas o generar nuevas rutas aún no viables.

Los logros futuros en el diseño de rutas, el descubrimiento de enzimas, la ingeniería y la inmovilización beneficiarán sustancialmente la aplicación de biocatálisis multienzimática en la fabricación industrial y ampliarán la cartera de procesos de biomanufactura renovables y sostenibles.

## Referencias

- [1] Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6(6): 189-242, 2013.
- [2] Petroll, K., Kopp, D., Care, A., y otros. Tools and strategies for constructing cell-free enzyme pathways. *Biotechnology Advances*. 1 (37): 91-108, 2019.
- [3] Pleissner D., y Lin CSK. Valorisation of food waste in biotechnological processes. *Sustainable Chemical Processes*. 1:21, 2013.
- [4] Arroyo, M.; Acebal, C. y de la Mata, I. Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*. 190 (768):156, 2014.