

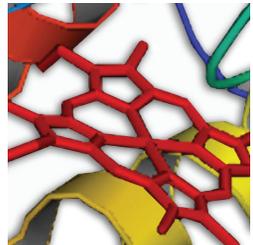
# Biocatálisis ambiental

Raunel Tinoco Valencia y Rafael Vázquez-Duhalt

La biotecnología moderna tiene un papel importante en la restauración de sitios dañados ambientalmente. El reto actual es desarrollar herramientas biotecnológicas que formen parte de procesos limpios y eficientes energéticamente para la prevención, el control y la remediación de contaminaciones ambientales. La investigación en este campo está sustentada en herramientas metodológicas de diferentes áreas del conocimiento, como lo son la bioingeniería, enzimología, ingeniería de proteínas, microbiología aplicada y termodinámica de solventes. El esfuerzo del laboratorio de Biotecnología Ambiental se centra en la modificación enzimática de sustancias contaminantes, principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas. Además de investigaciones con otros compuestos hidrófobos de alto impacto ambiental, como los colorantes industriales, los compuestos azufrados heterocíclicos y los policlorofenoles. Es imperativo que las transformaciones enzimáticas o microbiológicas de dichos contaminantes, conlleven a la reducción o eliminación de su impacto ambiental.

Por otro lado, la búsqueda y diseño de nuevos biocatalizadores se realiza a través del uso de técnicas de mutación sitio-dirigida, tecnología enzimática o modificación química de

proteínas. Se han explorado diversas fuentes de enzimas en la naturaleza. Especialmente, los microorganismos responsables de la degradación de la lignina son productores de una batería de enzimas de baja especificidad y con un alto potencial para su uso en la transformación de compuestos contaminantes y xenobióticos. El desarrollo de nuevos biocatalizadores con mejores propiedades catalíticas, cinéticas o de estabilidad, se ha sustentado en el uso de las técnicas de mutación sitio-dirigida, o en las técnicas de modificación química de proteínas. Esta última permite conjugar nuevos grupos funcionales (acilación, siliación, pegilación, etc.) en los sitios reactivos de los residuos aminoácidos de las proteínas. De esta manera, se ha logrado diseñar y construir biocatalizadores “semisintéticos” que pueden disolverse en solventes orgánicos, que tienen mayor estabilidad y actividad a altas temperaturas o que incrementan el rango de sustratos que reconoce una enzima. Todo este potencial de la biocatálisis se ejemplifica aquí, en la transformación biocatalítica de contaminantes como los colorantes industriales, los plaguicidas y los compuestos derivados del petróleo, como los hidrocarburos policíclico aromáticos y los compuestos organoazufrados.



1  
4  
3

### El citocromo c en la biocatálisis ambiental

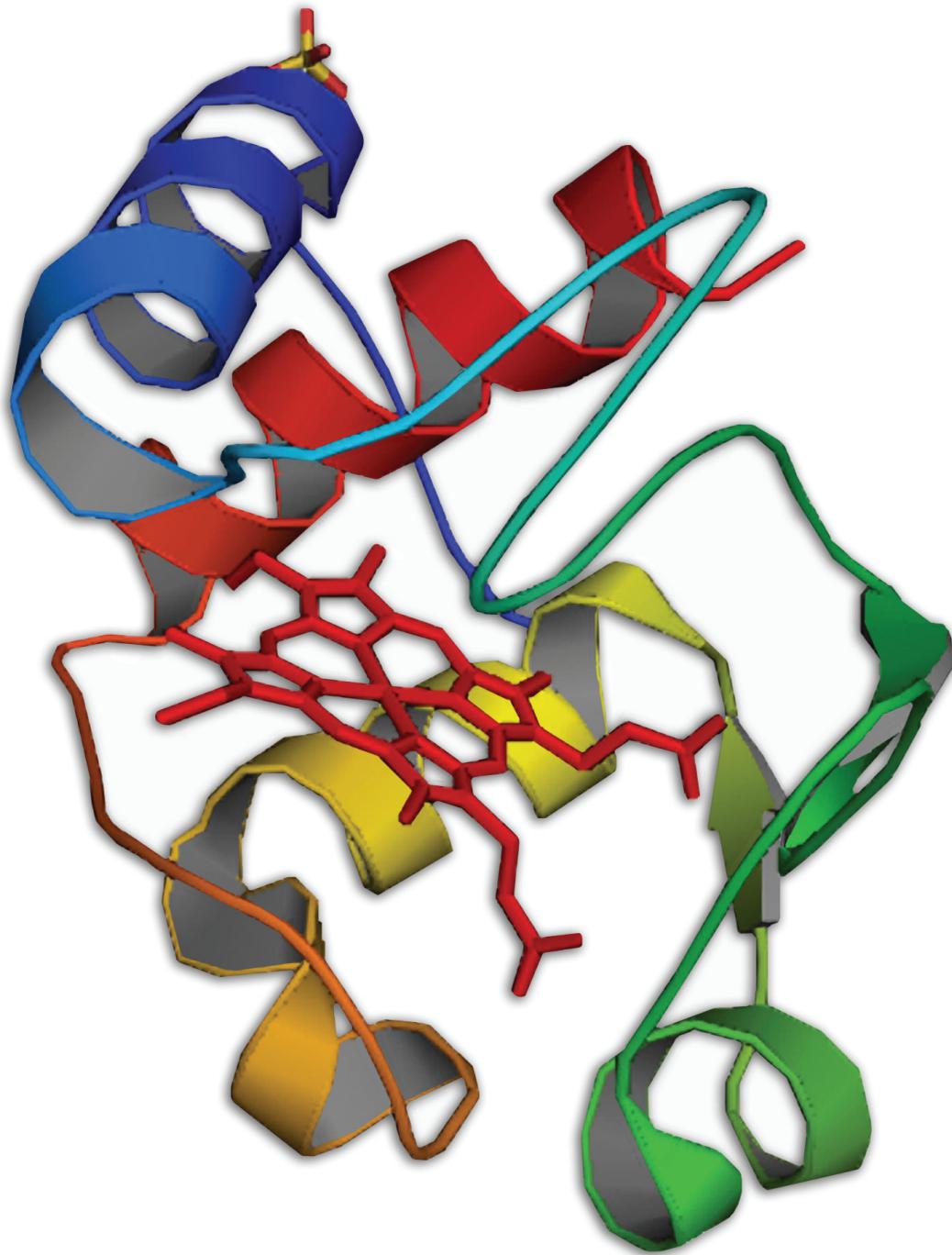
El citocromo c es una proteína que se encuentra como un componente de la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Su función biológica es la de transportar electrones entre los complejos membranales citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa. Sin embargo, esta proteína ha sido utilizada como catalizador biológico en diversas reacciones de oxidación de compuestos tóxicos. Su actividad catalítica es similar a la de las hemoperoxidasas, en tanto que requiere de la presencia de peróxido de hidrógeno, contiene también un grupo hemo en su estructura como sitio catalítico, se inactiva por peróxido en ausencia de un sustrato reductor y, finalmente, su ciclo catalítico está basado en los estados de oxidación del átomo de Fe del grupo prostético hemo.

Los citocromos c son moléculas de proteínas muy pequeñas, constituidas por 103-112 aminoácidos, con pesos moleculares de alrededor de 12 000 Da y puntos isoelectrónicos básicos ( $pI \approx 10$ ). Presentan una alta conservación en la secuencia de aminoácidos, así como de su estructura terciaria. Se ha determinado la conservación de 21 residuos en 91 secuencias de citocromos c de origen eucarionte. También se ha demostrado un contenido de  $\alpha$ -hélices superior a 30% para el citocromo de levadura. Una característica importante es que en el citocromo c, el grupo hemo se encuentra unido covalentemente a la apoproteína por medio de dos enlaces tioéter, y el átomo de Fe se encuentra coordinado axialmente por dos ligandos, la His18 y la Met80. En la **figura 1** se muestra la estructura secundaria del citocromo c de levadura.

Aunque no se ha descrito una actividad catalítica del citocromo c en los organismos vivos, se ha reportado su participación en la peroxidación de lípidos y en el rompimiento de hidropéroxidos. Esto sugiere la participación de estas proteínas en procesos celulares involucrados con el estrés oxidativo, en los cuales la oxidación de biomoléculas en presencia de peróxido de hidrógeno puede realizarse mediante un mecanismo de radicales libres, similar al que llevan

a cabo los sistemas enzimáticos del citocromo P450. Recientemente, el citocromo c se ha utilizado *in vitro* como biocatalizador en reacciones de oxidación de compuestos de estructura química diversa y que representan un problema de contaminación ambiental. En la **tabla 1** se enlistan algunos ejemplos de sustratos y productos generados por biotransformaciones mediadas por esta hemoproteína. Es importante resaltar que el citocromo c es activo catalíticamente en mezclas de reacción que contienen solventes orgánicos en proporciones que van desde 10 hasta el 90%; además, presenta actividad en el rango de valores de pH de 2 a 11. Ambas propiedades en esta proteína son interesantes, ya que facilitan el uso del citocromo c en condiciones de reacción extremas.

La posibilidad de utilizar solventes orgánicos como medios de reacción, permite disolver una mayor cantidad de sustrato. Frecuentemente se han utilizado mezclas de solventes miscibles en agua sin provocar un efecto de inactivación severo al citocromo c. En estos sistemas de reacción, se ha logrado oxidar diferentes compuestos organoazufrados que constituyen parte de los petróleos crudos pesados. Los compuestos azufrados presentes en los combustibles son agentes causantes de la lluvia ácida, ya que se libera dióxido de azufre a la atmósfera como producto de la combustión de los motores. En general, dos terceras partes de las emisiones de dióxido de azufre son liberados por las plantas generadoras de energía eléctrica, como consecuencia del uso de combustibles como el diesel, el combustóleo o el carbón. Algunos estudios señalan que, en la ciudad de México, los vehículos automotores contribuyen con más del 90 por ciento de las emisiones de partículas en general, por lo que muchas de las estrategias ambientales están dirigidas a ese sector. Aparte de la corrosión de monumentos y edificios, la lluvia ácida es causante del empobrecimiento de nutrientes en los ecosistemas acuáticos y terrestres debido a que la acidez provoca la precipitación de minerales y otros nutrientes de los que depende la biota de los ecosistemas. Existe una correlación



**Figura 1.**  
Representación esquemática de la estructura cristalográfica del citocromo c de *Sacharomyces cerevisiae*, tomado del PDB YCC2.

directa entre el contenido de azufre de los combustibles y la emisión de partículas y dióxido de azufre a la atmósfera. Con el fin de evitar estas emisiones, actualmente la tendencia mundial ha establecido como límite máximo el 0.05% de contenido de azufre en el diesel.

Los compuestos aromáticos azufrados han sido oxidados por las hemoproteínas no enzimáticas, como el citocromo c y la hemoglobina, en condiciones de reacción moderadas, como temperatura ambiente, presiones atmosféricas y con un contenido de solventes de 10-20%. Solventes como la dimetilformamida o el acetoni-trilo son adecuados para disolver los compuestos organoazufrados presentes en el diesel, como el dibenzotiofeno, tiantreno, dibencilsulfuro y otros más, de los cuales sus estructuras químicas y de los productos de reacción, que son principalmente sulfonas, se ejemplifican en la **figura 2**. Estas reacciones se llevan a cabo en presencia de 1 mM de peróxido de hidrógeno como donador de electrones.

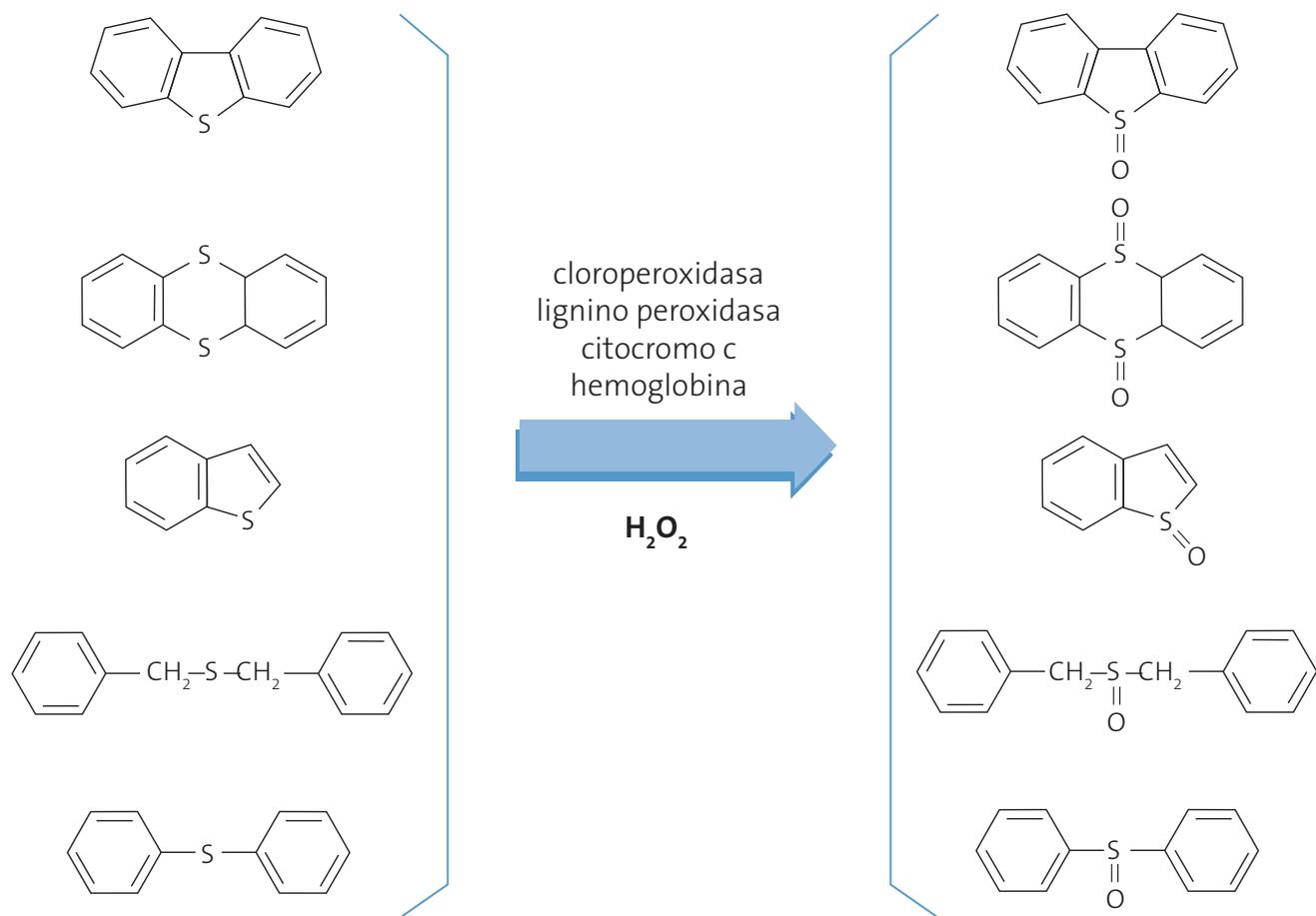
En el mismo sistema de reacción, el citocromo c y la hemoglobina también han sido utilizados como biocatalizadores en la oxidación

de hidrocarburos policíclico aromáticos. Como productos de la reacción se generan las quinonas correspondientes, de la misma manera como se ha descrito para las enzimas peroxidasa (**figura 3**). Esto sugiere que el mecanismo de reacción es similar para estos biocatalizadores. La oxidación enzimática, seguida de la adición de microorganismos endógenos, puede ser una estrategia de remediación efectiva de suelos contaminados, debido a que la biodegradación de los hidrocarburos policíclicos y sus metabolitos incrementa con su estado de oxidación. Adicionalmente, las quinonas resultantes son significativamente menos mutagénicas. Por ejemplo, el benzo(a)pireno, un potente carcinógeno, mostró una concentración mínima mutagénica de 14 ng/ml, mientras que ninguna de sus quinonas fue mutagénica. Esto nos indica que una transformación enzimática de los hidrocarburos policíclicos aromáticos es suficiente para reducir su impacto ambiental.

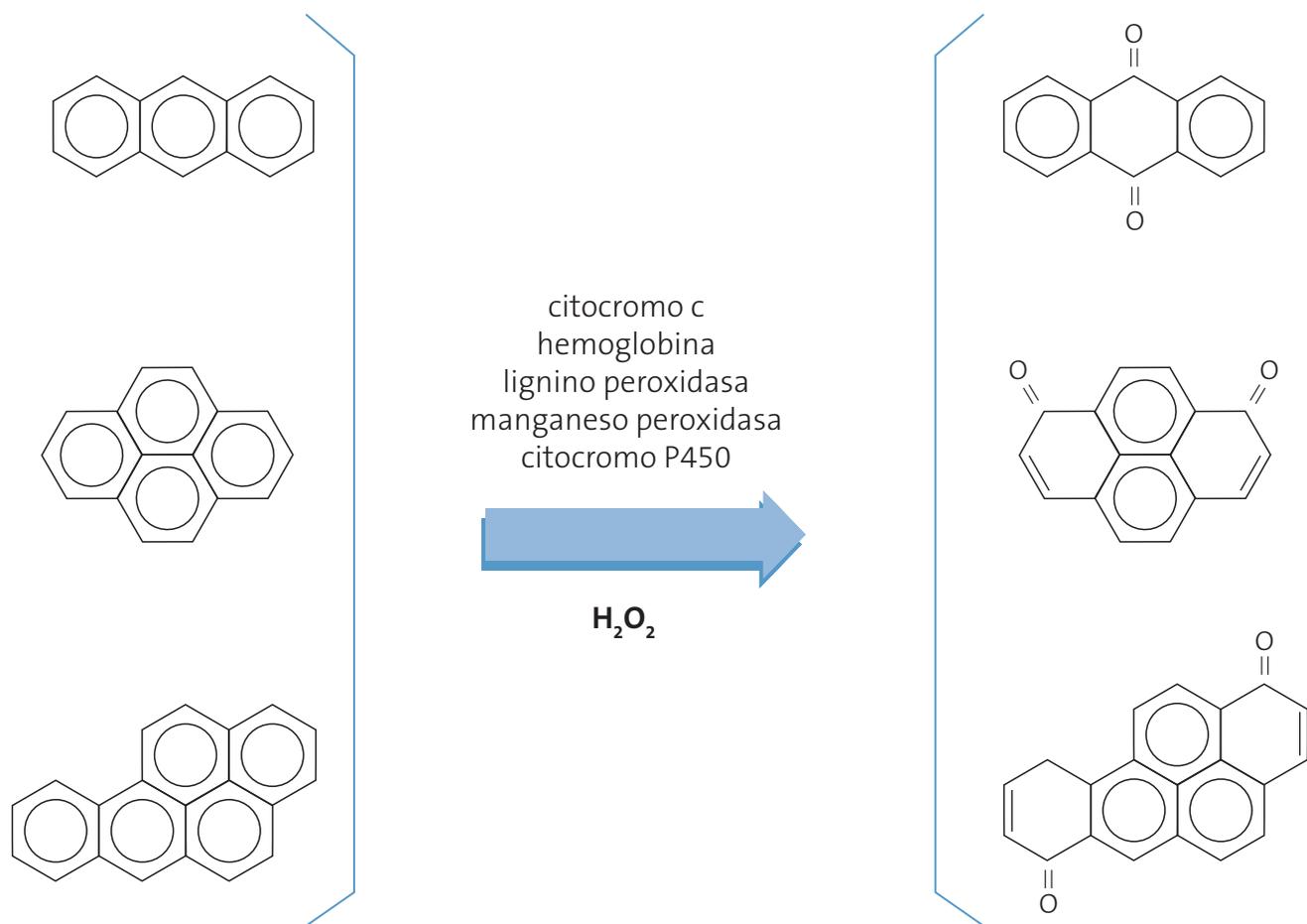
Los hidrocarburos policíclicos aromáticos son componentes del petróleo crudo, la creosota y el carbón. Este tipo de compuestos está ampliamente distribuido en el ambiente como

**Tabla 1.** Biotransformaciones con citocromo c (Vázquez-Duhalt, R., en *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 7, 1999).

Sustratos	Productos
<i>Hidrocarburos aromáticos policíclicos</i>	
Antraceno	9,10-Antraquinona
Benceno	Fenol
Benzo(a)pireno	1,6-Benzo(a)pirenodiona
Pireno	1,8-Pirenodiona
<i>Compuestos organoazufrados y heterocíclicos</i>	
Benzotiofeno	Sulfóxido de benzotiofeno
Carbazol	Desconocido
Dibenzotiofeno	Sulfóxido de dibenzotiofeno
Sulfuro de dibencilo	Sulfóxido de dibencilo
Sulfuro de difenilo	Sulfóxido de difenilo
N-methyl carbazol	N-Hidroximetil carbazol
Tiantreno	Disulfóxido de tiantreno
Tioanisol	Metilfenil-sulfóxido
<i>Otros sustratos</i>	
ABTS	ABTS (radical catiónico)
Guayacol	Tetraguayacol
Ácido linolénico	Peróxido de linoleato
Luminol	Quimioluminiscencia
Metionina	Etileno
Estilbeno	Epóxido de estilbeno



**Figura 2.**  
 Estructuras moleculares de los compuestos organoazufrados y los productos de reacción en la biocatálisis con hemoproteínas.



**Figura 3.**  
 Oxidación de hidrocarburos policíclicos aromáticos con di-  
 ferentes hemoproteínas.

consecuencia del uso extensivo de los combustibles derivados del petróleo. Su persistencia en el ambiente se debe a su alta hidrofobicidad y baja solubilidad en agua, lo que hace muy lenta su biodegradación. Muchos de ellos tienen propiedades tóxicas, mutagénicas o carcinogénicas, por lo que es prioritaria su remoción del ambiente.

La biocatálisis con el citocromo c ha sido mejorada por mutaciones sitio dirigidas. Se han diseñado y obtenido variantes estables a la inactivación por peróxido de hidrógeno a través de la mutación de los residuos susceptibles de oxidación en la proteína. Se obtuvo una variante del iso-1 citocromo c de *Sacharomyces cerevisiae* con las sustituciones: N52I, W59F, Y67F, K79A, F82G, la cual, conservó la capacidad catalítica de la proteína parental, pero mostró un incremento de 15 veces en el número total de recambio en la reacción de oxidación del colorante cloruro de pinacianol. Esta proteína variante está siendo estudiada como biocatalizador de la oxidación de compuestos fenólicos de diferente potencial redox.

Por otro lado, se han modificado químicamente los grupos amino de la superficie de la molécula del citocromo c de corazón de caballo, con compuestos anfifílicos como el polietilenglicol y en los grupos carboxilo con radicales metilo, los cuales otorgan mayor hidrofobicidad en el sitio activo como son los propionatos del grupo hemo. La doble modificación química (pegilación en la superficie y metilación del grupo hemo) mejoró las propiedades biocatalíticas del citocromo c en los sistemas de reacción con solventes orgánicos. El citocromo doblemente modificado (PEG-Cyt-MET) fue capaz de oxidar 16 de 20 compuestos ensayados, mientras que el citocromo no modificado fue capaz de oxidar sólo ocho de estos compuestos (tabla 2). De tal manera, la modificación química de proteínas puede ser una herramienta importante para diseñar nuevos biocatalizadores que puedan aplicarse para resolver problemas de contaminación ambiental.

### Otros biocatalizadores muy poderosos: las enzimas ligninolíticas de hongos

Los hongos ligninolíticos sintetizan un sistema enzimático extracelular muy particular y no específico. El mecanismo de estos sistemas responsables de degradar la lignina está basado en la formación de radicales libres, lo cual hace que estas enzimas sean activas catalíticamente sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. Debido a esto, los hongos ligninolíticos poseen un uso potencial muy atractivo en la biorremediación de ambientes contaminados con mezclas complejas de contaminantes peligrosos. Estos hongos tienen la capacidad de mineralizar completamente a CO<sub>2</sub> los contaminantes muy recalcitrantes, como los bifenilos policlorados, los explosivos aromáticos, los hidrocarburos policíclico aromáticos, los plaguicidas clorados y organofosforados. Asimismo, pueden decolorar efluentes contaminados con colorantes de origen industrial. Todo esto resalta la versatilidad de los sistemas enzimáticos de los hongos ligninolíticos, ya que son enzimas de poca especificidad que pueden reconocer sustratos con estructuras moleculares muy diversas.

En la literatura pueden encontrarse muchos ejemplos de tratamientos de contaminantes por medio del uso de hongos degradadores de lignina o sus sistemas enzimáticos. Se ha demostrado la oxidación de efluentes derivados del blanqueo del papel con *Phanerochaete chrysosporium*, cuya manganeso peroxidasa es la enzima responsable. De la misma manera, las lacasas de *Trametes versicolor* se han identificado como enzimas muy eficientes en la decoloración de estos efluentes. Las peroxidases dependientes de manganeso obtenidas de *Bjerkandera adusta* y de *Pleurotus eryngii*, así como las isoenzimas de lacasas de *Corioloopsis gallica*, han sido utilizadas en la degradación de colorantes sintéticos tipo azo, o de diversos colorantes industriales. Por otro lado, se ha observado la mineralización de 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, guayacoles policlorados, diversas vainillinas policloradas y

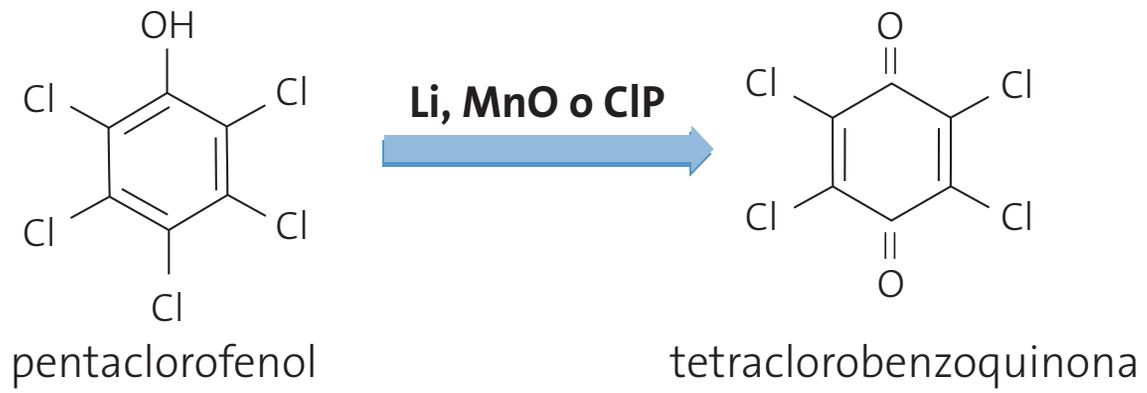
**Tabla 2.** Oxidación de compuestos contaminantes por el citocromo c modificado químicamente (Tinoco y Vázquez-Duhalt, en *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 1998).

Compuesto aromático	Actividad específica (min <sup>-1</sup> )	
	No modificado	PEG-Cyt-Met
7,12-Dimetilbenzantraceno	24.59 (± 1.52)	80.33 (± 3.83)
1,2:3,4-Dibenzantraceno	NR	16.60 (± 2.24)
Azuleno	2.26 (± 0.29)	14.32 (± 0.57)
3-Metilcolantreno	1.88 (± 0.07)	10.96 (± 0.54)
7-Metilbenzo(a)pireno	NR	7.56 (± 0.42)
1,2:5,6-Dibenzantraceno	NR	5.70 (± 0.31)
Trifenileno	NR	5.27 (± 1.05)
Dibenzotiofeno	0.67 (± 0.06)	4.73 (± 0.05)
Antraceno	0.33 (± 0.06)	3.09 (± 0.32)
Tiantreno	0.49 (± 0.06)	1.41 (± 0.08)
Pireno	0.51 (± 0.05)	0.97 (± 0.03)
Fluoroantreno	NR	0.65 (± 0.09)
Acenafteno	NR	0.40 (± 0.01)
Benzo(a)pireno	0.22 (± 0.02)	0.39 (± 0.06)
Fluoreno	NR	0.22 (± 0.01)
Fenantreno	NR	0.17 (± 0.02)
Criseno	NR	NR
9,10-Dimetilantraceno	NR	NR
Naftaleno	NR	NR
Bifenilo	NR	NR

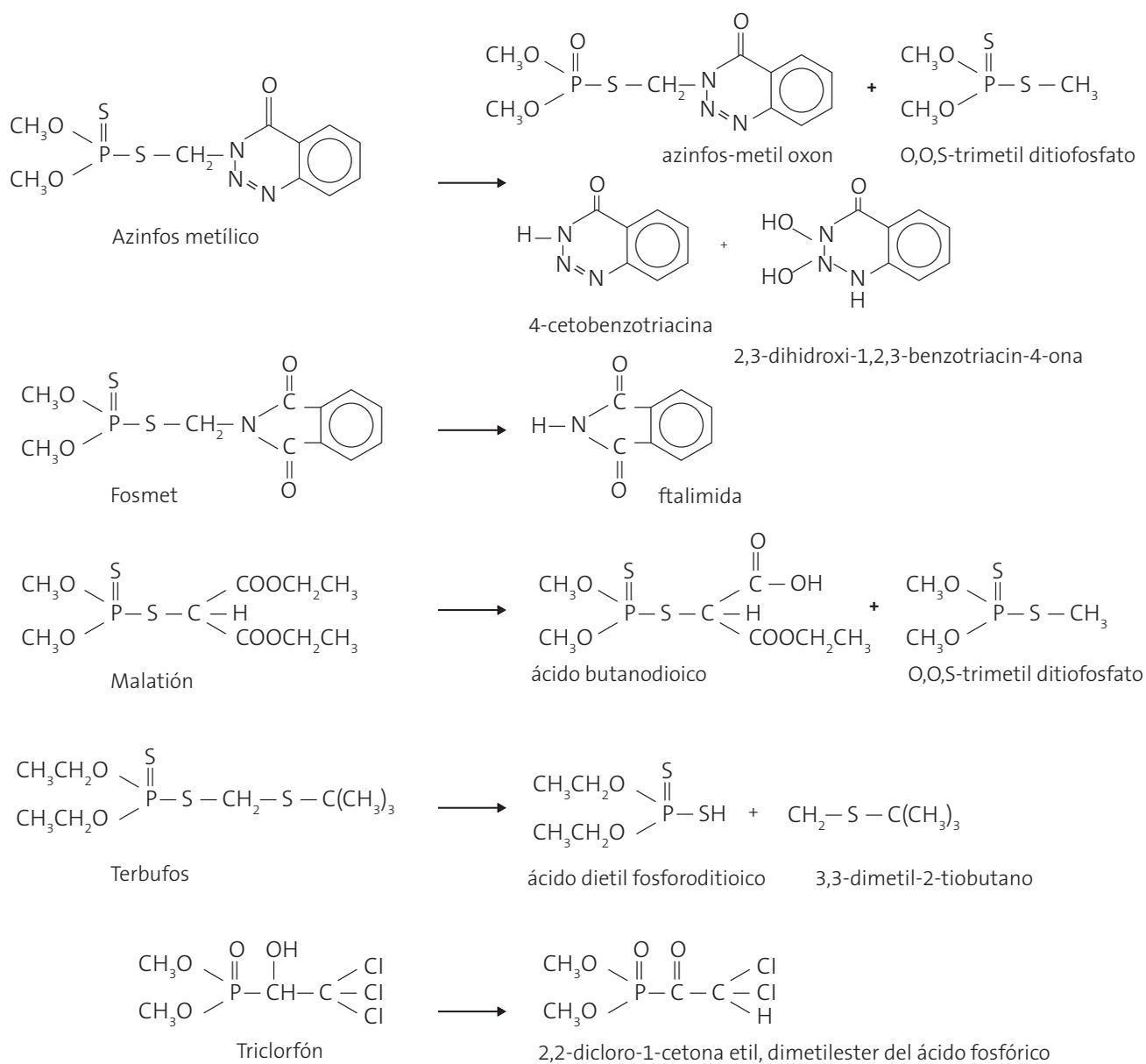
NR: no se detectó la reacción enzimática.

pentaclorofenol por el hongo *P. chrysosporium*, pero también se ha observado que los fenoles policlorados son sustratos de las peroxidasas extracelulares de este hongo, como la lignino peroxidasa y la manganeso peroxidasa. La lignino peroxidasa y la manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium* así como la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* son enzimas capaces de catalizar la deshalogenación en la posición 4 del anillo aromático del pentaclorofenol. Debido a que esta deshalogenación da lugar a la quinona, este proceso se denomina deshalogenación oxidativa, obteniéndose la tetraclorobenzoquinona como producto final (figura 4). La combinación de la acción de estas enzimas con el sistema intracelular reductor en *P. chrysosporium* ha permitido la deshalogenación completa del pentaclorofenol.

Los hongos ligninolíticos también poseen un sistema enzimático intracelular, el sistema de monooxigenasa citocromo P450. Estos sistemas enzimáticos llevan a cabo la degradación de compuestos xenobióticos como el fenantreno, el benzo(a)pireno o el DDT en cultivos de *P. chrysosporium*. El citocromo P450 de *Pleurotus ostreatus* fue capaz de transformar tres plaguicidas organofosforados: Fosmet, Terbufos y Azinfos-metilico, además de otros plaguicidas como el paratión, malatión y triclorfón. En estos estudios se analizó una colección de 18 cepas de hongos, las cuales degradaron *in vivo* al parathion adicionado en los cultivos con un tiempo de incubación de 96 horas. Tres cepas mostraron una elevada actividad degradativa, *Bjerkandea adusta*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*. La eficiencia de de-



**Figura 4.**  
Deshalogenación oxidativa del pentaclorofenol por las lignino, manganeso o cloro peroxidasas de hongos.

**Figura 5.**

Biotransformación de plaguicidas por el sistema de monooxigenasa citocromo P450 de *Pleurotus ostreatus* (Jáuregui *et al.*, en *Biodegradation*, 14, 2003).

gradación fue en el rango de 50 a 96% en 96 horas. En la **figura 5** se muestran las estructuras moleculares de los plaguicidas que fueron transformados por estos sistemas de monooxigenasas y los productos de la biocatálisis, estos últimos, identificados por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases. Estos estudios pudieron comprobar que los productos de la degradación de los plaguicidas son menos tóxicos, ya que no inhibieron la actividad de acetilcolinesterasa *in vitro*, como sucede con los plaguicidas originales. Al igual que los sistemas enzimáticos extracelulares, el sistema de monooxigenasa citocromo P450 es inespecífico y puede reconocer sustratos de una amplia diversidad de estructuras moleculares.

Otro grupo de compuestos de interés ambiental son los colorantes industriales. La complejidad y la diversidad de sus estructuras químicas dificultan más los procesos para su biotransformación. El problema es mayor cuando se considera que los efluentes contaminados contienen siempre mezclas complejas de colorantes industriales. Se ha estudiado la decoloración *in vivo* en laboratorio de 27 colorantes de uso textil, por 15 diferentes cepas de hongos de los géneros *Pleurotus*, *Trametes*, *Phanerochaete*, *Caldaromyces*, *Bjerkandera*, *Trametes* y *Sporotrichum*. La capacidad para decoloración de estas cepas se incrementó considerablemente cuando se cultivaron en condiciones ligninolíticas, es decir, cuando se cultivaron en material lignocelulósico como la cascarilla de granos de avena. También se observó que los extractos extracelulares de cepas de *P. ostreatus* y de *T. hispida* obtenidos por fermentación en estado sólido, provocaron la mayor actividad decolorante para los compuestos Azul reactivo Oriosol 185, Azul ácido 185 y el Negro ácido 194. Estos estudios condujeron a la conclusión de que las lacasas producidas por estas cepas son las responsables de la actividad de decoloración. Las lacasas de *T. hispida* y de *Corioloopsis gallica* han sido ampliamente utilizadas para llevar a cabo biotransformaciones de efluentes contaminados generados por la industria textil.

La peroxidasa versátil obtenida de *Bjerkandera adusta* también es capaz de catalizar la decoloración de estos compuestos. Esta enzima presenta ambas actividades de lignino peroxidasa y de manganeso peroxidasa. En la **tabla 3** se muestran las velocidades de decoloración de 27 compuestos que son colorantes artificiales. Se estudió la actividad de la enzima en dos diferentes condiciones de reacción: en presencia de manganeso y condiciones reportadas como óptimas para su actividad de manganeso peroxidasa y la otra en ausencia de manganeso y bajo las condiciones de lignino peroxidasa. La capacidad de decoloración de esta enzima se incrementó al adicionar intermediarios en la reacción. Los intermediarios en estas reacciones son compuestos orgánicos pequeños de origen natural como el alcohol veratrílico, la acetosin-gona o el siringaldehído.

A pesar de la imperiosa necesidad de desarrollar procesos más limpios y eficientes, la utilización de enzimas como catalizadores industriales se ha rezagado por dos importantes razones: inicialmente por la falta de las actividades idóneas, y en algunos casos en los que se cuenta con la enzima apropiada, por la inestabilidad intrínseca de las proteínas a las condiciones industriales de reacción. Existen de momento tres poderosas estrategias integradoras encaminadas a resolver estas limitaciones: la bioprospección, la evolución *in vitro* y la modificación sobre diseño.

Muchas líneas de evidencia, desde la microscopía óptica hasta el análisis de ácidos nucleicos, indican que las técnicas de cultivo existentes descubren solamente una minúscula fracción (menos de 1%) de la microflora de un suelo normal, que puede llegar a contener de 5000 a 10000 diferentes especies bacterianas. El universo de actividades enzimáticas por descubrir es todavía más vasto si consideramos que del millón y medio de especies de hongos predichas, solamente se han descrito 72000. Las limitaciones de la microbiología han conducido a que solamente 3000 actividades enzimáticas hayan sido caracterizadas a la fecha, mientras que se prevé existen por

**Tabla 3.** Velocidad de decoloración de diferentes colorantes industriales por la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*. (Tinoco R. et al., 2007 *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 46: 1-7)

### Velocidad de decoloración ( $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$ )

Colorante (C.I.)	Absmax	H 4 sin Mn(II)	pH 3 con Mn(II)
Acid black 194	570	2.05( $\pm 0.19$ )	0.19( $\pm 0.14$ )
Acid blue 185	620	12.98( $\pm 0.55$ )	12.5( $\pm 0.74$ )
Acid red 51	525	1.17( $\pm 0.09$ )	NR
Direct black 22	485	0.31( $\pm 0.02$ )	0.43( $\pm 0.05$ )
Direct blue 199	620	25.64( $\pm 0.81$ )	6.90( $\pm 0.13$ )
Direct blue 2	570	2.14( $\pm 0.11$ )	2.57( $\pm 0.09$ )
Direct green 6	620	1.24( $\pm 0.14$ )	0.19( $\pm 0.07$ )
Direct orange 26	495	1.76( $\pm 0.21$ )	1.93( $\pm 0.05$ )
Direct red 23	510	3.79( $\pm 0.14$ )	1.55( $\pm 0.09$ )
Direct yellow 58	415	0.08( $\pm 0.01$ )	NR
Disperse blue 79	560	0.21( $\pm 0.01$ )	NR
Disperse red 60	535	0.01( $\pm 0.003$ )	NR
Reactive black 5	595	5.36( $\pm 0.26$ )	5.95( $\pm 0.50$ )
Reactive blue 18	605	2.19( $\pm 0.26$ )	1.17( $\pm 0.10$ )
Reactive blue 19	590	1.81( $\pm 0.19$ )	3.05( $\pm 0.17$ )
Reactive blue 38	20	10.78( $\pm 0.07$ )	20.57( $\pm 0.86$ )
Reactive blue 72	665	0.47( $\pm 0.07$ )	1.43( $\pm 0.14$ )
Reactive blue 198	625	2.67( $\pm 0.05$ )	NR
Reactive green 19	610	1.05( $\pm 0.12$ )	0.69( $\pm 0.05$ )
Reactive orange 16	485	0.27( $\pm 0.01$ )	NR
Reactive red 4	540	1.35( $\pm 0.08$ )	NR
Reactive red 141	540	1.02( $\pm 0.12$ )	NR
Reactive red 180	540	0.52( $\pm 0.04$ )	NR
Reactive yellow 2	400	0.14( $\pm 0.02$ )	NR
Reactive yellow 84	410	0.07( $\pm 0.01$ )	NR
Reactive violet 5	555	2.25( $\pm 0.03$ )	2.87( $\pm 0.21$ )
Vat blue 7	605	0.03( $\pm 0.00$ )	

**Tabla 4.** Constantes cinéticas del citocromo c de levadura nativo y variantes en la oxidación del pireno (Vázquez-Duhalt, en *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 7, 1999).

Variante	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{M,app}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_{M,app}$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )
Ala87;Thr102	0.39	3.9	99
Ala52;Thr102	0.18	4.7	39
Ala73;Thr102	0.28	7.5	38
Ala86;Thr102	0.17	4.0	33
Ala72;Thr102	0.13	4.0	33
Ala79;Thr102	3.28	101.8	32
Phe82;Cys102 (Nativa)	0.31	9.7	32
Phe67;Thr102	0.10	3.3	32

lo menos otras 10 000 esperando ser identificadas. En estos momentos, el reto a vencer es cómo tener acceso a esta rica fuente de recursos naturales. Dada la impredecible diversidad de especies que habitan un sitio en particular, la alternativa más explorada a la fecha se fundamenta en la amplificación masiva de ácidos nucleicos a partir de muestras ambientales, llamada bioprospección. Algunos casos exitosos que han aplicado esta estrategia son el aislamiento de genes que codifican para nuevos antibióticos, la identificación de actividades enzimáticas con nuevas propiedades, por ejemplo  $\alpha$ -amilasas más termoestables, la utilización de sustratos novedosos, o inclusive la recuperación de vías metabólicas completas.

Como alternativa al uso de la biodiversidad natural, se han desarrollado métodos *in vitro* que permiten la generación acelerada de variantes sobre una secuencia en particular. Estos métodos se basan en simular la evolución Darwiniana en un tubo de ensayo, e involucran la generación y selección de una biblioteca molecular con suficiente diversidad como para que la función alterada requerida se encuentre representada. Esta diversidad molecular se puede crear típicamente mediante mutagénesis al azar. Aquellas variantes funcionalmente mejoradas son identificadas de manera preliminar mediante métodos de selección o de escrutinio de alto desempeño y entonces utilizadas como

padres de la siguiente ronda de evolución. La gran ventaja de la evolución *in vitro* es que solamente requiere de la secuencia del gene que codifica para la enzima de interés y no de la resolución de su estructura tridimensional, aunque un conocimiento más profundo del mecanismo de reacción permite tomar mejores decisiones sobre la estrategia de selección.

El diseño racional de proteínas está emergiendo como la técnica idónea para estudiar los principios generales que rigen la estructura y la función de las proteínas. La meta de muchos de estos estudios ha sido la generación de proteínas con nuevas funciones, incluyendo el aumento de la tasa catalítica de algunas reacciones. De manera muy especial, la habilidad para diseñar una enzima para llevar a cabo una reacción química específica tiene potenciales aplicaciones ambientales. La utilización de las herramientas moleculares para el diseño de biocatalizadores más eficientes en la degradación de compuestos contaminantes ha abierto un nuevo panorama en la aplicación ambiental de las enzimas. La mutación sitio dirigida de algunos residuos específicos del citocromo c ha permitido aumentar la eficiencia catalítica en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (tabla 4).

Dos factores limitan la aplicación a gran escala de las enzimas: su actividad y sobretodo, su estabilidad en condiciones de proceso. Las peroxidases y en general la hemoproteínas se

**Tabla 5.** Estabilidad catalítica e integridad del hemo de variantes del citocromo c de levadura en presencia de 1 mM de peróxido de hidrógeno.

Variante de citocromo c de levadura	Estabilidad catalítica. Tiempo de vida media (min)	Banda Soret. Tiempo de vida media (min)	kcat (seg-1)	KM H2O2 (M)	Eficiencia catalítica (kcat/KM)
WT 16 (T-5A, C102T)	8.3	17.2	11.4	$6.97 \times 10^{-2}$	163
Y46F, Y48F, Y67F, Y74F, Y97F	0.7	45.5	8.7	$5.50 \times 10^{-3}$	1592
N52I, Y67F	0.5	estable	0.01	$2.76 \times 10^{-3}$	6
N52I, Y67F, M80A	12.1	40.0	0.19	$3.91 \times 10^{-2}$	5
N52I, W59F, Y67F	0.4	estable	8.6	$8.14 \times 10^{-3}$	1062
N52I, W59F, Y67F, F82G	91.3	estable	8.4	$4.12 \times 10^{-2}$	205
N52I, W59F, Y67F, K79A, F82G	estable	170	10.1	$7.26 \times 10^{-2}$	139

inactivan en la presencia de un exceso de su sustrato, el peróxido de hidrógeno, o en ausencia de un sustrato reductor (por ejemplo un contaminante). Por medio de un diseño racional y mutaciones sitio específicas se ha podido obtener un biocatalizador estable a las condiciones de reacción (tabla 5).

Finalmente, muchos aspectos de nuestras vidas han sido mejorados gracias a la industria química. Uno de los más importantes es el aumento en la esperanza de vida, que pasó de 47 años en 1900, a 75 años en 2000. Gran parte de este aumento se debe a la mejora en los servicios de salud, incluyendo el desarrollo y uso de medicinas. También la industria química ha contribuido a tener acceso, en general, a agua y comida de mejor calidad. Cada una de las actividades humanas se ha hecho más eficiente y más segura.

Sin embargo, no hay que olvidar que la industria química también es responsable del deterioro ambiental, el cual ha llegado en nuestros días a niveles que claramente pueden afectar la salud del planeta y del ser humano. Como se ha analizado en estas páginas, una de las prioridades del ingenio humano es continuar con el desarrollo tecno-

lógico y con la mejora de las condiciones de vida pero sin alterar el ambiente. En nuestro país aún abundan pobladores que no tiene acceso a los satisfactores mínimos que todo habitante de este siglo debería tener. Esto implica que aún tenemos que producir una gran cantidad de satisfactores adicionales para esa parte de la población. El reto estará en incrementar nuestra producción industrial sin incrementar el impacto de esta actividad sobre el ambiente.

Por otro lado, si bien el petróleo y en general los combustibles fósiles han sido el motor de este cambio dramático de la forma de vida, estas fuentes energéticas no son renovables e inexorablemente se agotarán. Tendremos que producir una gran cantidad de productos que ahora dependen de la disponibilidad del petróleo como materia prima, y además producir aquellos que no necesitan del petróleo como materia prima, pero que dependen de él como fuente de energía.

Las dos grandes fuerzas promotoras e inductoras para el cambio tecnológico en los próximos años son la energía y el ambiente. Sin duda la biocatálisis ambiental tiene un nicho importante en este inevitable cambio. ●