

Ingeniería de enzimas para una mejor biorremediación.

Esfuerzos para identificar y manipular estos agentes bioquímicamente activos y hacerlos más efectivos para aplicaciones de biorremediación.

Jenne Trombly*



Animados por el creciente número de éxitos en la biorremediación, los investigadores ahora se concentran en identificar y optimizar a los agentes bioquímicos activos involucrados en este proceso: las enzimas. El conocimiento acerca de las enzimas con capacidad de degradación que se usan en proyectos de biorremediación –provenientes de bacterias, hongos o plantas– pueden convertirse en conocimientos tan importantes como el pH del suelo, la temperatura, la humedad y la biodisponibilidad de los contaminantes. “Nosotros permanecemos varios años en la oscuridad acerca del conocimiento de la ingeniería de procesos, hasta que identificamos a las enzimas”, dijo Steve McCutcheon, investigador en Ingeniería Ambiental de la EPA, del Laboratorio de Investigaciones Ambientales en Athero, GA.

Muchos investigadores piensan que los proyectos de biorremediación pueden ser más exitosos si se estudia el mecanismo catalítico de las enzimas. El primer paso de este proceso es identificar las enzimas críticas; después los científicos pueden tomar este conocimiento e incorporar los genes que expresan las enzimas en otros organismos. Las enzimas que dan buenos resultados pueden ser incorporadas en plantas y microorganismos comunes en los sitios contaminados, que toleren las frecuentes condiciones extremas de ambientes contaminados mejor que otros organismos no comunes en dichos sitios.

Con base en esta idea, algunos investigadores están utilizando ingeniería de proteínas para resaltar las habilidades cinéticas de las enzimas, mediante el rediseño de la catálisis y el incremento de su capacidad degradativa y velocidad de transformación. “Si nosotros pudiéramos transformar fácilmente las enzimas para la remediación del ambiente, podríamos vivir en un mundo completamente distinto”, observó Peter Huk Nelson, vicepresidente de *Copenhagen Based Novo Nordisk*, la compañía productora de enzimas más grande a nivel mundial.

Los científicos esperan que el crecimiento de las investigaciones y aplicaciones de las enzimas no sólo incremente el éxito de los proyectos de biorremediación, sino también que haga posible la limpieza del

* Trombly, Jeanne, “Ingeniería de enzimas para una mejor biorremediación”, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 29, No. 12, 1995.

Traducido por: Dra. Ma. del Rosario Peralta Pérez, profesora investigadora en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.



ambiente en sitios donde otros métodos han fallado. “Rediseñar las enzimas puede dar la posibilidad de remediar ciertos lugares, como aquellos donde la contaminación se encuentre en zonas muy profundas, esté muy dispersa o los contaminantes sean recalcitrantes, como los hidrocarburos halogenados”, dijo Rick Oinstein, líder del grupo técnico del Departamento de Energía del Laboratorio del Noroeste del Pacífico.

Una visión crítica sobre la identificación, mejora y rediseño de las enzimas para degradar desechos tóxicos, revela un nuevo mercado. Los costos de este proceso son difíciles de calcular, debido a que sólo pocas empresas nuevas están ofreciendo estos servicios comerciales. Algunas compañías señalan que la biorremediación *ex situ* con enzimas mejoradas, puede tener un costo competitivo.

Identificación de las enzimas

Las enzimas son generalmente responsables de las transformaciones químicas que tienen lugar en la biorremediación. Dichas transformaciones ocurren cuando la enzima encuentra a su sustrato, el cual sufre una transformación o ruptura. Las enzimas se clasifican en: hidrolíticas, reductoras u oxidantes, dependiendo del tipo de reacciones que catalicen.

Para una mejor comprensión y control de estos procesos, los científicos comenzaron por identificar las enzimas. Reconocen una enzima con características deseables utilizando microorganismos aislados de muestras de agua o suelo; posteriormente, los microorganismos productores de dichas enzimas son cultivados con el fin de incrementar la producción del extracto de enzimas y darles una aplicación.

Esta forma de aprovecharlas es la tradicionalmente usada para encontrar enzimas efectivas de uso industrial. Por ejemplo, una enzima descubierta en una muestra de suelo de un templo en Indonesia, es ahora usada para hidrolizar el almidón a azúcares; otra enzima que se encontró en un cementerio de Copenhague, ahora se usa en detergentes para ayudar a remover manchas.

Otro mecanismo es identificar la actividad enzimática deseada en un organismo conocido que la exprese en forma adecuada. Jean Marc Bollag, codirector del Centro Penn de Biorremediación y Detoxificación, está utilizando plantas de todo el mundo que expresan adecuadamente la actividad de lacasas y tirosinasas, enzimas que planea usar para remover fenoles en agua de desecho. Bollag ha conducido exitosamente experimentos de laboratorio aplicados, usando peróxido como cofactor y

plantas de rábano, que expresan la actividad de la enzima peroxidasa en aguas contaminadas con fenol.¹ Con base en sus resultados, él piensa que las lacasas serán más efectivas en presencia del cofactor.

En contraste, otro grupo de científicos están descubriendo y estudiando sucesos por primera vez identificados, tanto en plantas como en microorganismos, que se encuentran naturalmente degradando desechos tóxicos; posteriormente identificaron las enzimas responsables de la biotransformación.

Hace cinco años, el grupo dirigido por Lee Wolfe, químico investigador de la EPA, se dedicó a buscar por qué algunas familias de compuestos orgánicos tóxicos son degradados más rápidamente bajo ciertas condiciones. Un miembro del grupo asumió que es debido a las enzimas y buscaron descubrir de dónde provenían. Laura Carreira, investigadora en Bioquímica, fue contratada por la EPA para detectar dichas enzimas usando la prueba estándar de ELISA, una técnica de anticuerpos originalmente utilizada para pruebas médicas. “La primera noticia fue que sí se presentaba la degradación, después había que imaginar cómo ocurría dicha degradación. Actualmente se tienen herramientas para hacer esto”, dijo Carreira.

Usando pruebas de ELISA, el grupo de investigación verificó que las enzimas responsables de la biodegradación eran producidas por las plantas y no por los microorganismos.² Este fue el primer ejemplo de éxito de fitorremediación de compuestos orgánicos –un paso significativo para hacer más común el uso de plantas para eliminar, por ejemplo, metales del suelo.– “En cualquier parte encontramos significativas actividades enzimáticas, que ocurren en forma natural para la biotransformación de mezclas de contaminantes en sedimentos y suelo. Tenemos que aislar las enzimas de las plantas que causan dicha transformación”, indicaron los investigadores. Los científicos piensan que el desarrollo de las técnicas innovadoras de fitorremediación, serán revolucionarias una vez que se logre descubrir los sistemas enzimáticos que degradan los compuestos químicos involucrados.

Una filosofía similar es guiada por el grupo de investigadores del Servicio de Remediación Ambiental de Dupont. “Siempre se asume que las enzimas están trabajando en nuestros servicios de biorremediación; sin embargo, no siempre conocemos cuáles son”, dijo Dove Ellis, líder del grupo de biorremediación de Dupont que ha desarrollado un proceso, cuya licencia se tiene ahora disponible, en el cual hay bacterias que deshalogenan solventes clorinados en aguas subterráneas. Su colega Martín Oden, monitoreó

un grupo de investigación en Alemania para tratar de identificar las enzimas que se expresaban en bacterias sulfato-reductores. "Una vez que sepamos más, podremos aplicar la enzimología a la biorremediación", dijo Oden. De acuerdo con Steven Aust, profesor de Bioquímica de la Universidad de UTA, la identificación de las enzimas es uno de los pasos más importantes adoptados por su compañía. "Si tú no quieres entender los procesos bioquímicos de las enzimas, tus posibilidades de fallar en un proceso de biorremediación son muy altas", comentó Aust. Su trabajo como líder en el desarrollo de una pequeña compañía, *Intech One-Eighty*, la cual cuenta con una licencia de patente en el proceso de degradación para una amplia variedad de contaminantes tóxicos, usando hongos de la pudrición blanca, dichos contaminantes incluyen TNT y otros explosivos, creosote, así como hidrocarburos poliaromáticos, bifenilos policlorinados (PCBs), y DDT.¹

Manipulación genética

La manipulación de las enzimas, a futuro, podrá ser creativa y ayudar a que estos catalizadores sean empleados para la limpieza del ambiente. Los proyectos pueden incluir: extraer las enzimas y aplicar extractos libres de células; insertar el material genético de las enzimas en otros organismos; proponer cómo las enzimas pueden dar mejores resultados que en el organismo original. "Hemos tenido éxito mejorando la capacidad degradativa de un organismo mediante la alteración de la enzima encargada de degradar PCB", dijo Frank Mandella, uno de los líderes del grupo del centro de Investigación y Desarrollo de Energía General (Nueva York). Después de descubrir que dos enzimas degradadoras de PCB eran casi idénticas, pero mostraron dramáticas diferencias en el rango de ataque de los PCB, Mandella y sus colaboradores alteraron específicamente los aminoácidos en los que diferían dichas enzimas. "Esta modificación dio como resultado una nueva cepa que muestra mejores actividades que ambas enzimas, la cual ataca a una gran variedad de PCB, incluso mayor que la mostrada por las cepas similares aisladas del medio ambiente."

Con el tiempo, Mandella espera realizar nuevas investigaciones sobre mutagénesis y estudios de suelo en laboratorio para probar la efectividad de esta nueva cepa. "La actividad del microorganismo es buena, pero hay que evaluar que realmente pueda trabajar en suelos contaminados", señaló Mandella. Este mismo optimismo mostró John Glaser, líder del equipo la EPA para la Biorremediación de Suelos del Laboratorio Nacional de Investigación y Manejo de Riesgo en Cincinnati, OH. Glaser resaltó que las enzimas algunas veces pueden no

expresarse después de insertar el material genético en otro organismo.

Junto con esta metodología de expresar material genético en diferentes organismos huésped, los científicos han usado otros métodos para ayudar a la degradación enzimática de desechos tóxicos. En el Departamento de Energía de Savannah, se monitoreó un proceso de remediación patentada para rescatar el Río Savannah tratando aguas contaminadas con tricloroetileno (TCE). Un equipo dirigido por Terry Hazen, microbiólogo ambiental, reconoció que la inyección de metano en las aguas subterráneas mejoraba las actividades oxidativas de las enzimas metano-monooxigenasas degradadoras de TCE.² Actualmente este equipo constituye una compañía de biorremediación.

Hazen ocupa un programa de computadora que interpreta en tres dimensiones la estructura cristalina de las enzimas, para explorar posibilidades de manipulación y otros factores involucrados en biorremediación con la finalidad de mejorar las actividades de interés. "Existen varios parámetros ambientales—pH, fuerza iónica y temperatura, por ejemplo— que pueden causar cambios significativos en la estructura de las enzimas", dijo Hazen. "Nuestros modelos de predicción por computadora muestran varios escenarios, y permiten observar cómo ocurren dichos cambios estructurales"; Hazen y su colega Ralph Wolf están tratando de descubrir los detalles del mecanismo de reacción oxidativa en los sitios activos de las enzimas. "Una vez que nosotros entendamos bien cómo funcionan las enzimas bajo diferentes variables de control, podremos adaptar mejor los procesos."

El trabajo de Hazen podrá algún día beneficiarse de las investigaciones que han llevado a la identificación de otras enzimas metano-monooxigenasas que oxidan TCE 50 veces más rápido que otras enzimas.³ Thomas Wood, profesor asistente de Bioquímica e Ingeniería Ambiental de la Universidad de California, ha identificado una prometedora enzima metano-monooxigenasa que se expresa en bacterias de lento crecimiento. Además ha explorado la opción de insertar las expresiones enzimáticas en microorganismos de rápido crecimiento, Wood admite que el proceso es "probablemente comercializable en cinco años."

Rediseño de enzimas

Mientras algunos científicos impulsan las metodologías de selección de organismos vivos, que expresan adecuadamente enzimas de interés, otros intentan rediseñar enzimas basándose en el uso directo de la relación estructura-función-dinámica. Rick Ornstein del Labora-

torio del Pacífico Noreste, está motivado por la idea de rediseñar una enzima y encontrar las respuestas a problemas ambientales que aparentemente no tienen solución. Si tiene éxito el trabajo de Ornstein podría brindar un método para degradar hidrocarburos recalcitrantes halogenados en suelos profundos o bajo condiciones ambientales difíciles para cualquier microorganismo dehalogenador conocido.

En un proyecto, Ornstein comenzó con un citocromo P450 de una bacteria común en suelos que hidroxila camfor. Sus colaboradores han mostrado recientemente que la enzima nativa y las mutantes pueden romper ciertos etanos pesados halogenados, bajo condiciones anaeróbicas, pero el 1, 1, 1, tricloroetano no se ve afectado. Una serie de simulaciones por computadora, que comenzaron con la estructura de rayos X de los cristales del citocromo P450, han mostrado recientes predicciones donde se espera que una mutante de citocromo P450 incremente al doble la dehalogenación del tricloroetano.⁶ Si esta predicción es exitosa, el gene para el rediseño de la enzima dehalogenadora rediseñada podrá ser insertado en la microflora nativa que puede subsistir en condiciones extremas. "Presumiblemente, como las células regresan a su nicho familiar, podemos tener una razonable oportunidad de que sobrevivan e incrementen la biodegradación de compuestos modelo", dijo Ornstein.⁷

Para la biorremediación *in situ* de un sitio contaminado, una compañía ofreció sus servicios de fitorremediación; al final, la limpieza del lugar fue llevada a cabo por dos compañías estadounidenses que comercializaban sistemas a base de hongos para la limpieza ambiental. La capacidad de estos organismos para degradar compuestos tóxicos orgánicos se incrementará en el futuro, una vez que los mecanismos de bioconversión enzimática se entiendan mejor. Pero el debate fundamental continúa para investigaciones y aplicaciones futuras.

Limitaciones de las enzimas

Los investigadores reconocen que la especificidad extrema que caracteriza a muchas enzimas es a la vez una debilidad y una fortaleza. La unión precisa del sustrato con la enzima la hace operar con rapidez y eficiencia. "El problema es que los compuestos tóxicos son desechados en corrientes de agua limpias", dijo Nielsen de *Novo Nordisk*, "pero donde exista un contaminante peligroso, las enzimas pueden atacarlo."

Muchos investigadores comparten este punto de vista. McCutcheon y su equipo han identificado algunas enzimas no específicas, especialmente relacionadas con

plantas viejas, que se piensa pueden atacar mezclas de compuestos químicos como el TNT en forma eficiente. "Una vez que se tengan plantas que contengan tres o más sistemas enzimáticos específicos que degraden los compuestos deseados, éstas podrán ser empleadas." Carreira estuvo de acuerdo, y encontró enzimas nitroreductasas, presentes en el 20% de las plantas que probó, y capaces de reducir cualquier grupo nitro unido a la mayoría de anillos aromáticos de compuestos aminados. "Un consorcio de enzimas puede trabajar en sitios con múltiples contaminantes", aseveró Carreira.

Otro cambio importante en este campo, es entender el análisis de las vías y estar seguro de que las enzimas completen su trabajo. "Si un sistema enzimático transforma un compuesto en productos que son más tóxicos que la sustancia original, estás más equivocado que al principio", dijo Glaser de la EPA.

Mientras los debates continúan, algunos científicos están ansiosos de poner en los aparadores de las tiendas, enzimas que degraden compuestos biológicos. "Bacterias vs plantas vs hongos no es lo mejor. Estos sistemas no tienen que venir exclusivamente de alguno de estos organismos", dijo Milton Gordon, profesor de Bioquímica de la Universidad de Washington. Gordon está trabajando con Petróleo Occidental como modelo para remediar una gran área contaminada con TCE utilizando álamos.

Otros investigadores, sin embargo, piensan que las fuentes pueden ser mejores si primero se entienden los principios básicos de la remediación con enzimas. "Con un costo para remediación empleando un superfondo de un trillón de dólares, nosotros simplemente no podemos proporcionar una elaborada investigación en ingeniería genética para cada problema que tengamos", insistió McCutcheon. ☺

Referencias

1. Bollag, J.; Dec, J. (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 1132-1139.
2. Schnoor, J. et al. (1995), *Environ. Sci. Technol.*, 29 (7), 318A.
3. Barr, D.; Aust, S. (1994), *Environ. Sci. Technol.*, 28(2), 78A.
4. Hazen, T. (1995), *Environmental Protection*, 12.
5. Janhg, D.; Wood, T. (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (7), 2473.
6. Manchester, J. L., Ornstein, R. L. J., *Biol. Struct. Dyn.*
7. Ornstein, R., *Structural Biology: The State of the Art.*, Sarma R. H., Eds. Adenine Press: Albania, N.Y. Vol. 1, pp. 59-76.