

## **Evolución Dirigida en la Generación de Biocatalizadores: Biocatalizadores Hechos a Medida**

Carolina Peña-Montes y Amelia Farrés González-Saravia\*

*Departamento de Alimentos y Biotecnología. Lab. 312, Conjunto "E". Facultad de Química,  
UNAM. E-mail: farres@servidor.unam.mx*

**Palabras clave:** evolución dirigida, PCR propenso a errores, barajado de ADN, biocatalizadores.

**Key words:** directed evolution, DNA-shuffling, biocatalysts, error prone PCR, high-throughput screening.

### **RESUMEN**

Desarrollar biocatalizadores con propiedades que se ajusten a las condiciones de trabajo de los procesos industriales es una necesidad emergente. El uso de la evolución dirigida como una herramienta para la obtención de los mismos se ha incrementado en los últimos años debido al creciente número de éxitos obtenidos. En éste artículo se discuten los métodos actuales para la generación de variantes, así como los ensayos para el aislamiento y selección de las mutantes adecuadas en un proceso de evolución *in vitro*. Se describen algunos ejemplos que muestran que es posible modificar la especificidad por el sustrato, la enantioselectividad o incrementar la actividad de la enzima para las condiciones de proceso deseadas.

### **ABSTRACT**

Biocatalysts development with improved properties that are suitable for industrial processes is an emergent necessity. Directed molecular evolution is a rapidly growing field for the improvement of biocatalysts in the last years due to the growing number of success. This review describes the current methods to create variants and assays for rapid screening and selection of desired mutants in a process of directed evolution. Selected examples show that it is possible to modify the substrate specificity, modulate enantioselectivity and to increase enzyme performance for desired process conditions.

---

### **INTRODUCCION**

Las enzimas o biocatalizadores, presentan propiedades que los catalizadores inorgánicos no poseen, como selectividad por sustrato, regio- y enantioselectividad, temperaturas o presiones de trabajo moderadas, lo cual disminuye los costos de operación de los procesos. Adicionalmente, las enzimas pueden catalizar una variedad de reacciones en rangos de pH y temperatura amplios. Esto explica que en los últimos años hayan surgido un considerable número de procesos industriales que las utilizan como catalizadores (Liese *et al.*, 2000; Panke *et al.*, 2004). Cuando se utilizan

---

enzimas silvestres, en procesos industriales es común encontrar que las condiciones para la reacción enzimática no son las más apropiadas para el proceso a gran escala. Las enzimas suelen ser inestables; pueden tener baja especificidad por el sustrato o no presentar la enantioselectividad requerida. Esto obliga a buscar o desarrollar enzimas con las propiedades requeridas, es decir, hechas a la medida del proceso.

Los métodos tradicionales para identificar nuevas enzimas están basados en el aislamiento de nuevos microorganismos a partir de muestras ambientales o de colecciones de cepas. Sin

embargo, estos métodos presentan algunas desventajas, por ejemplo, no todos los microorganismos son cultivables con las tecnologías de fermentación comunes, se estima que el número de microorganismos cultivables que se pueden obtener de una muestra de suelo es menor al 1% (Riesenfeld *et al.*, 2004). También es posible aislar directamente el ADN de muestras ambientales (ADN metagenómico), secuenciarlo y, mediante el análisis de las secuencias obtenidas, identificar genes y la posible función de su transcrito. Una vez que se identifica la actividad enzimática deseada, se aísla el gen respectivo y se clona para sobreexpresarlo, lo que permite producir a gran escala la enzima requerida. Con todo, los genes identificados en metagenomas pueden funcionar distinto de lo esperado y, como ya se mencionó, también las enzimas nuevas pueden ser inadecuadas para los procesos requeridos.

Dentro de los métodos para desarrollar nuevas enzimas, una alternativa para mejorar las propiedades catalíticas es el diseño racional. Si se cuenta con el gen y la estructura tridimensional de una enzima, se puede alterar la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, las propiedades catalíticas mediante un diseño racional seguido de mutagénesis sitio-dirigida (Fig. 1). El diseño racional de enzimas exige un amplio conocimiento de la estructura y de las relaciones entre estructura y función. Sin embargo, el conocimiento actual de esta relación no es lo suficientemente profundo y sólo en pocos casos se han obtenido resultados favorables. Por el contrario, la evolución dirigida ha sido una herramienta alternativa poderosa para modificar la función enzimática y, específicamente, para ajustar las propiedades catalíticas a las condiciones deseadas.

La evolución dirigida, “evolución *in vitro*” o “diseño irracional” de enzimas no difiere mucho de la hipótesis evolutiva sugerida por Darwin. En la evolución *in vitro* se aplican **procesos mutagénicos** aleatorios o recombinatorios, o ambos, a un gen, generándose cierta diversidad

representada en una genoteca de mutantes. Esta genoteca de variantes de la secuencia original es sometida a un proceso de **selección**, del cual se obtienen los mejores candidatos que serán nuevamente sometidos al proceso de mutación-recombinación-selección. En contraste con la evolución natural, donde el objetivo de un organismo es sobrevivir, adaptarse y finalmente reproducirse; en la evolución dirigida el objetivo es fijado por el investigador. Los mejores candidatos serán aquellas variantes que, de acuerdo a los criterios de selección, se ajustan a las propiedades catalíticas que deseamos obtener. Una combinación apropiada y repetida de los distintos métodos de generación de variabilidad acoplados a buenos métodos de selección puede producir enzimas con las propiedades catalíticas deseadas o muy parecidas a estas (Arnold & Moore, 1997). El reto de la evolución dirigida es comprimir la escala de tiempo usada por la evolución natural a meses o incluso a semanas (Fig. 1).

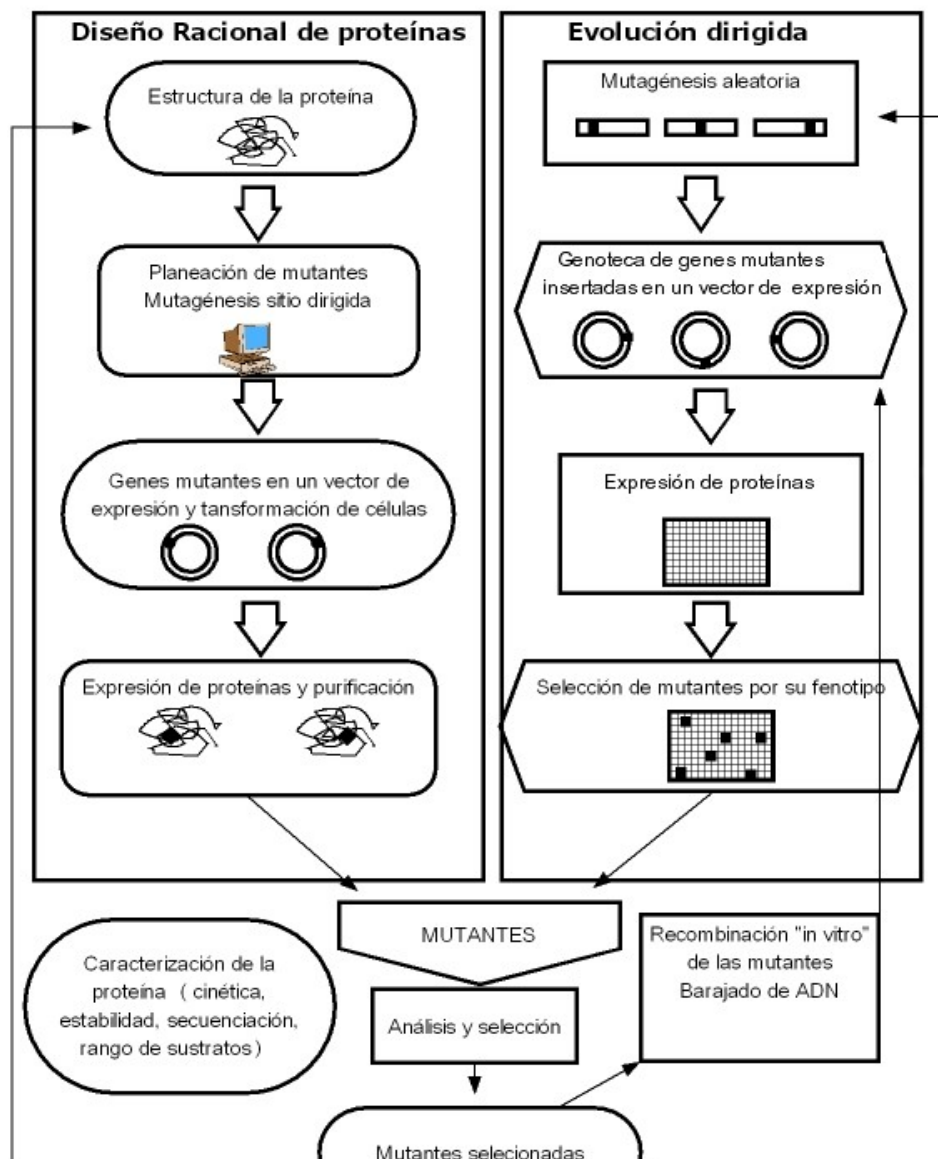
Los requisitos para poder llevar a cabo la evolución *in vitro* de una proteína incluyen la identificación y disponibilidad del gen que codifica ésta, un sistema de expresión conveniente, un método efectivo para generar la genoteca de variantes y un sistema de selección apropiado. A continuación se describen algunos métodos para generar variantes, los sistemas de aislamiento y selección y algunos ejemplos aplicados en el área de biocatálisis.

### **Métodos para generar variantes**

Es importante definir inicialmente el tamaño de la genoteca de mutantes que se va a generar, lo cual depende del número de mutantes que se pueden analizar de acuerdo a la infraestructura disponible. Se recomienda trabajar con velocidades de mutación bajas que generen un número reducido de mutantes, lo ideal sería obtener un solo aminoácido mutado en cada generación (Voigt *et al.*, 2001a; Voigt *et al.*, 2001b).

Actualmente existen diferentes metodologías para producir variantes, es tarea del científico

determinar cuáles y en qué orden serán aplicadas.



**Fig. 1.** Esquema general de los métodos empleados para generar nuevas proteínas: diseño racional (derecha) y evolución dirigida (izquierda). En el diseño racional se requiere un conocimiento previo de la estructura de la proteína para la planeación de las mutantes que se generan por mutagénesis sitio-dirigida. En la evolución dirigida, el gen de interés es sometido a un proceso para generar variantes (mutaciones puntuales ó recombinación), los genes resultantes se utilizan para construir una genoteca en un vector de expresión. Las mutantes son seleccionadas por la propiedad que deseamos mejorar y éstas a su vez se utilizan como punto de inicio para un nuevo proceso, generalmente por recombinación.

De manera general, estos métodos se pueden dividir en asexuales y sexuales. Decimos que un método es asexual cuando este tiene un solo progenitor y es sexual cuando tiene dos o más progenitores (Arnold, 1998). Los métodos asexuales, a su vez, se subdividen en métodos que generan mutaciones al azar a lo largo de la secuencia completa de un gen y métodos que generan mutaciones al azar en una región específica de un gen (Tabla 1).

Uno de los métodos asexuales mas usados es la **PCR con predisposición a errores** (ep-PCR), donde las condiciones utilizadas permiten la introducción de una mutación por 1000 pares de bases. La PCR propensa a errores es un método sencillo basado, como su nombre lo indica, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este método, el gen de interés es amplificado con una ADN polimerasa en condiciones que favorecen que la enzima adicione nucleótidos equivocados de manera aleatoria a lo largo de toda la secuencia del

gen y en las copias generadas durante los ciclos de replicación. La fidelidad de la ADN polimerasa se

puede afectar por variación de la concentración de

**Tabla 1.** Métodos para generar variantes por evolución dirigida.

<b>METODOS ASEXUALES</b>	Métodos que generan mutaciones al azar a lo largo de la secuencia completa de un gen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR con propensión a errores (ep-PCR)</li> <li>• Cepas que generan mutaciones</li> <li>• Mutagénesis de inserción/eliminación aleatoria (RID)</li> <li>• Mutagénesis secuencia saturante (SeSam).</li> </ul>
	Métodos que generan mutaciones al azar en una región específica de un gen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutagénesis sitio específica saturante</li> <li>• Método MAX</li> </ul>
<b>METODOS SEXUALES</b>	Barajado o mezclado de ADN ("DNA shuffling" o "gene shuffling")	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recombinación por cebado al azar ("Random-priming recombination", RPR)</li> <li>• Extensión vacilante ("staggered extension process", StEP)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generación de híbridos de ADN (heterodúplex) <i>in vitro</i> y reparación de ADN <i>in vivo</i></li> <li>• Generación aleatoria de secuencias quiméricas sobre un templado transitorio ("Random chimeragenesis on transient templates", RACHITT)</li> <li>• Truncado gradual para crear enzimas híbridas ("Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes", ITCHY).</li> <li>• Método CLERY ("Combinatorial libraries enhanced by recombination in yeast")</li> </ul>	

MgCl<sub>2</sub>, la presencia de Mn<sup>2+</sup>, una alta concentración o concentraciones asimétricas de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y altas concentraciones de cebadores (Cadwell & Joyce, 1992; Jaeger *et al.*, 2001), (Fig. 2, panel A). Una desventaja del ep-PCR es que debido a la degeneración del código genético, un tercio de las mutaciones que se generan, no producen un cambio de aminoácido (Wong *et al.*, 2006). Aunado a esto, cualquier molécula copiada en los primeros pasos de la reacción se encuentra sobre-representada en la genoteca que se genera debido a la amplificación de la misma, esto puede corregirse llevando a cabo reacciones separadas de ep-PCR con reducción del número de ciclos de amplificación y utilizando todas las copias

generadas en las reacciones separadas para la construcción de la genoteca final (Neylon, 2004).

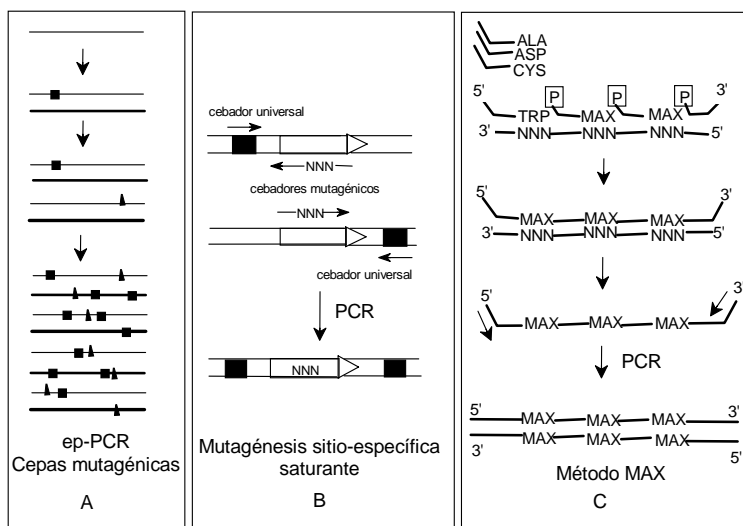
Una alternativa al método anterior es el uso de **cepas que generen mutaciones** (*Epicurian coli* XL1-Red). Dicha cepa se encuentra afectada en el mecanismo de reparación. Al introducir el plásmido con el gen de interés se producen mutaciones durante la replicación (Bornscheuer, 1998; Bornscheuer *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque la metodología es bastante simple, el número de cambios generados en cada ronda (de 1 a 2 nucleótidos por gen) es muy bajo por lo que se requieren múltiples transformaciones de la cepa. Adicionalmente, se generan también mutaciones en el plásmido, si el cambio es

generado en el promotor se puede afectar la expresión de la variante generada.

Otro método asexual para generar mutaciones puntuales es la **mutagénesis sitio-específica saturante**. En este proceso, es necesario identificar el aminoácido relacionado con la propiedad que nos interesa, con el fin de someter a las bases del códon correspondiente a un ciclo de mutagénesis donde se generan variantes que sustituyen dicho aminoácido por alguno de los 20 aminoácidos posibles. Se identifica cual de los 20 aminoácidos favorece esta propiedad. Es necesario diseñar cebadores mutagénicos superpuestos en el sitio que se desea mutar a saturación, con un sitio para cebadores universales que se encuentran de un solo lado del gen de interés. Los cebadores mutagénicos y los universales producen fragmentos

del gen que se superponen y que son extendidos en los pasos siguientes de la PCR (Urban *et al.*, 1997) (Fig. 2, panel B). Una variante de este protocolo es el creado recientemente por Hughes *et al.* (2003), el **método MAX**, en el que se sustituye el aminoácido deseado por cada uno de los posibles 20 aminoácidos o los que se deseen en múltiples posiciones de la secuencia de la proteína. Se modifican varias secuencias aleatorias, por lo que se utiliza un grupo de cebadores mutagénicos, los cuales hibridan en las regiones homólogas del templado y son posteriormente ligados. Se remueve el templado que no se modificó y una segunda hebra es completada por PCR (Fig. 2, panel C).

Un método que tiene la ventaja de poder mutagenizar en una secuencia blanco cada posición de un nucleótido es la **mutagénesis**



**Fig. 2.** Métodos asexuales para generar mutaciones puntuales. A) La ep-PCR y las cepas mutagénicas introducen errores en posiciones aleatorias a lo largo de la secuencia del gen. B) Mutagénesis sitio específica saturante. El gen a mutar esta insertado junto a un sitio para un cebador universal (negro), los cebadores mutagénicos están superpuestos en el sitio que se desea mutar a saturación (NNN), se realiza una PCR. Se obtiene un gen completo con el codón modificado. C) Método MAX. Se modifican varias secuencias aleatorias, por lo que se utiliza un grupo de cebadores mutagénicos, los cuales hibridan en las regiones homólogas del templado.

**secuencia saturante (SeSam).** Incluye las siguientes etapas: a) Generar fragmentos de ADN de manera aleatoria de diferente tamaño, b) Adicionar con una transferasa terminal en el extremo 3' de cada fragmento, una base universal

(deoxiinosina), c) Elongar los fragmentos de ADN por PCR hasta completar el gen original usando como templado una sola hebra y d) Reemplazar las bases universales por nucleótidos estándar. De esta manera se introducen mutaciones aleatorias

en los sitios donde se encuentran las bases universales debido a que la deoxiinosina forma pares de bases con cualquier nucleótido. Este método adicionalmente permite introducir substituciones de nucleótidos consecutivas y también incrementa la diversidad en las genotecas de mutantes (Wong *et al.*, 2004).

La inserción y eliminación de aminoácidos en la estructura de la proteína es una estrategia interesante para generar diversidad que no ha sido muy recurrida. El método de **mutagénesis de inserción/eliminación aleatoria** (RID) introducido por Murakami *et al.* (2002) se basa en la eliminación y subsiguiente inserción de un número arbitrario de bases, de manera aleatoria, a lo largo de la secuencia de un gen. En este método, el ADN molde de una sola hebra y en forma circular, se somete a un tratamiento con un complejo formado por Cerio con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), denominado Ce(IV)-EDTA, para generar el rompimiento en una región aleatoria del gen. Posteriormente se hace la ligación de un fragmento de doble hebra en cada uno de los extremos del ADN molde, el cual contiene sitios de restricción y una secuencia de eliminación o inserción. La segunda hebra es completada por PCR utilizando cebadores dentro del casete. Se eliminan en cada extremo de la doble hebra las partes del fragmento ligado que contienen los sitios de restricción, quedando solo la secuencia de eliminación o inserción. La construcción de doble hebra de ADN en forma circular que contiene ahora la modificación, puede utilizarse para la construcción de la genoteca (Murakami *et al.*, 2003). Las principales desventajas de éste modo son su complejidad, su alto costo y el enorme consumo de tiempo.

La desventaja de los métodos anteriores es que la obtención de un biocatalizador nuevo con las propiedades deseadas requiere varios ciclos repetitivos de mutagénesis e identificación de las mejores variantes. Por lo tanto, estas metodologías se utilizan normalmente como punto de partida y

una vez seleccionadas las mejores variantes, éstas se someten a un proceso de recombinación “in vitro” (métodos sexuales).

El primer método sexual desarrollado es el **barajado o mezclado de ADN** (“DNA shuffling” o “gene shuffling”). El método consiste en la digestión de un gen con DNAsa I, enzima que corta ADN en forma inespecífica, con el fin de generar fragmentos que son reensamblados posteriormente por PCR. En este proceso los mismos fragmentos sirven como templados y cebadores (Stemmer, 1994). El barajado de ADN es similar al proceso de recombinación natural y ha sido una herramienta muy efectiva para la creación de biocatalizadores nuevos (Shibuya *et al.*, 2000; Sun Fong *et al.*, 2000; Giver *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 2008). Recientemente se ha introducido una variante de esta metodología, en la que se utilizan familias de genes (identidad >70%) para generar los fragmentos y crear genotecas de secuencias quiméricas. A esta variante se le ha denominado barajado de familias de ADN (“DNA family shuffling” o “molecular breeding”). La ventaja de esta es que se genera mucha diversidad en genotecas relativamente pequeñas (Fig. 3, panel A).

El grupo de Arnold (Zhao *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 1998), ha desarrollado también otras dos variantes del barajado de ADN: la **extensión vacilante** (“staggered extension process”, StEP) y la **recombinación por cebado al azar** (“Random-priming recombination”, RPR). La StEP se basa en un protocolo de PCR modificado, donde se utilizan dos o más genes homólogos como templados, un grupo de cebadores (específicos para cada gen) y tiempos cortos para las reacciones de hibridación y extensión. Los pequeños oligómeros generados en una primera reacción se disocian del templado original y cambian a otro templado aleatoriamente extendiendo otro gen nuevamente en tiempos cortos de hibridación y extensión. Varias repeticiones permiten la recombinación y formación de genes completos, con los que se construye una

genoteca de variantes y después se someten al proceso de selección (Zhao *et al.*, 1998) (Fig. 3, panel B).

A diferencia de la StEP, en la recombinación por cebado al azar se utilizan cebadores no específicos con introducción de mutaciones puntuales adicionales los cuales pueden hibridar con los genes homólogos de interés para generar fragmentos aleatorios de ADN. Estos fragmentos sirven como cebadores de su propio gen y de los otros genes, generando así un gen completo del mismo modo en que ocurre en las técnicas descritas para StEP. La frecuencia de mutación se puede modificar variando la concentración y tamaño de los cebadores, el tiempo de reacción y la temperatura de hibridación (Shao *et al.*, 1998).

Volkov *et al.* (1999) desarrollaron un nuevo método para la formación de **híbridos de ADN (heterodúplex) *in vitro* y reparación de ADN *in vivo***. La metodología consiste en digerir con una enzima de restricción plásmidos que contienen los genes homólogos que se desean recombinar. Los plásmidos se mezclan y se someten a una temperatura de 96°C para desnaturalizar el ADN. Se deja que las cadenas de ADN formen híbridos de manera poco específica tras una incubación a 4°C. Se hace la transformación de células de *E. coli* con la mezcla anterior y el ADN es reparado por las enzimas encargadas de los procesos de reparación y recombinación de la bacteria. La eficiencia de transformación y recuperación de genes mutantes aumenta considerablemente si la mezcla se liga previamente. Una característica importante de este método es que permite la recombinación de genes enteros e incluso regiones mayores, como pueden ser operones.

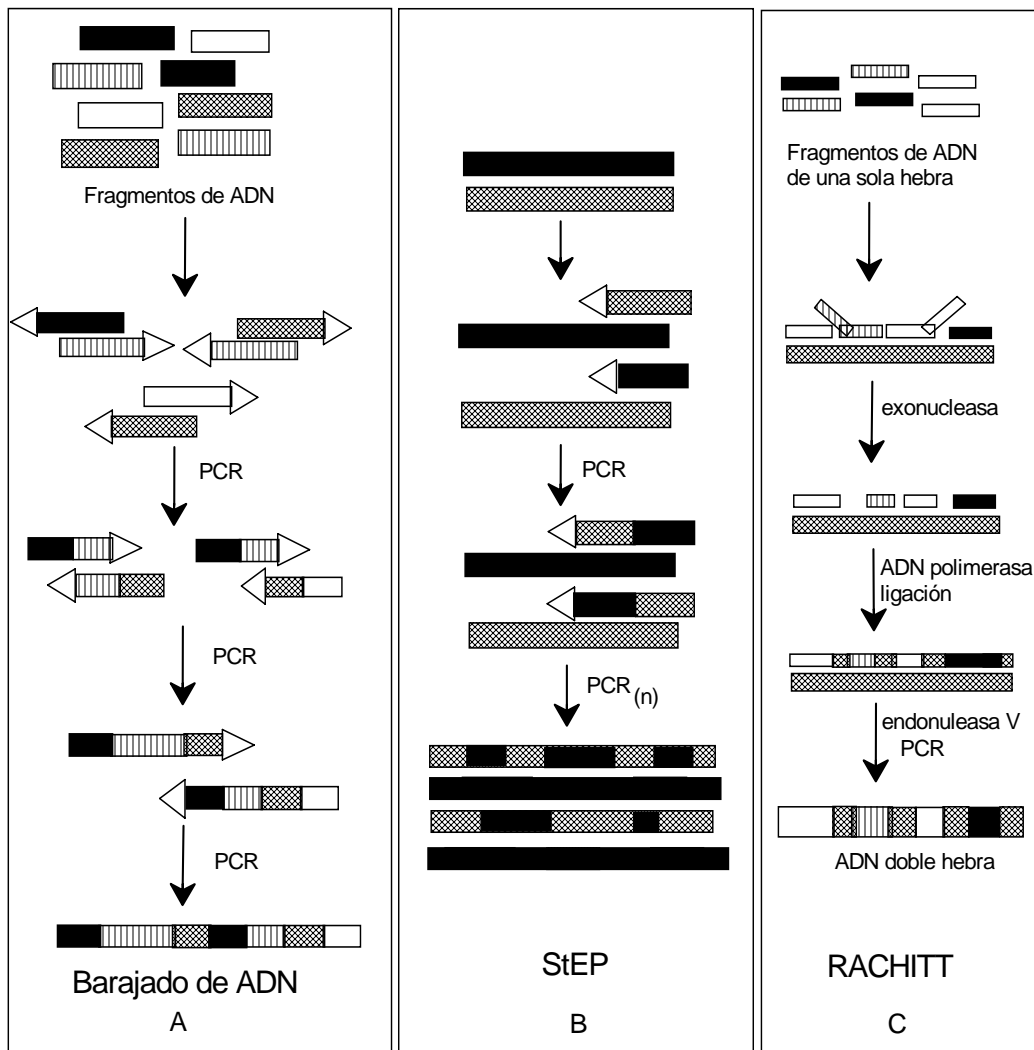
Un método reciente es la **generación aleatoria de secuencias quiméricas sobre un templado transitorio** ("Random chimera genesis on transient templates", RACHITT). En este método, se generan fragmentos aleatorios provenientes de 1 sola hebra de ADN de las dos posibles de cada uno de los

genes homólogos. Estos fragmentos son reensamblados posteriormente usando como templado la otra hebra complementaria que no se fragmentó. Las regiones que no ensamblaron se remueven por digestión con una exonucleasa, y los huecos generados se completan con una DNA polimerasa para finalmente ligarse. El templado se remueve con endonucleasa V de forma que quede solo la hebra que contiene los fragmentos ligados y a partir de esta se genera una doble hebra de ADN. Este método genera un gran número de recombinaciones (Coco, 2003; Farinas *et al.*, 2001). La desventaja del método es el enorme número de pasos requeridos (Fig. 3, panel C).

Finalmente, otro método para generar genotecas de genes mezclados es el denominado **Truncado gradual para crear enzimas híbridas** ("Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes", ITCHY). La ventaja de este procedimiento es que no requiere que los genes sean homólogos para realizar la recombinación. En esta técnica, dos genes seleccionados se cortan de forma gradual con exonucleasa III en condiciones controladas que permitan obtener genes truncados con diferencia de una sola base. Los extremos 5' de un gen y los extremos 3' del otro gen se ligan de forma aleatoria para generar una genoteca de secuencias quiméricas que incluye todas las posibles combinaciones de fragmentos de distintos tamaños de uno y otro gen (Fig. 4), (Ostermeier *et al.*, 1999; Petrounia & Arnold, 2000).

Para el caso de genes de origen eucariote que no se pueden expresar en bacterias, el **método CLERY** ("Combinatorial libraries enhanced by recombination in yeast") es una alternativa. Esta metodología combina el barajado de DNA "*in vitro*" y el barajado "*in vivo*" en levaduras (Farinas *et al.*, 2001; Abecassis *et al.*, 2000). Este método también es muy útil para la evolución dirigida de vías metabólicas (Chatterjee *et al.*, 2006).

Miller *et al.* (2006) reportó un método que involucra la generación de células artificiales para la



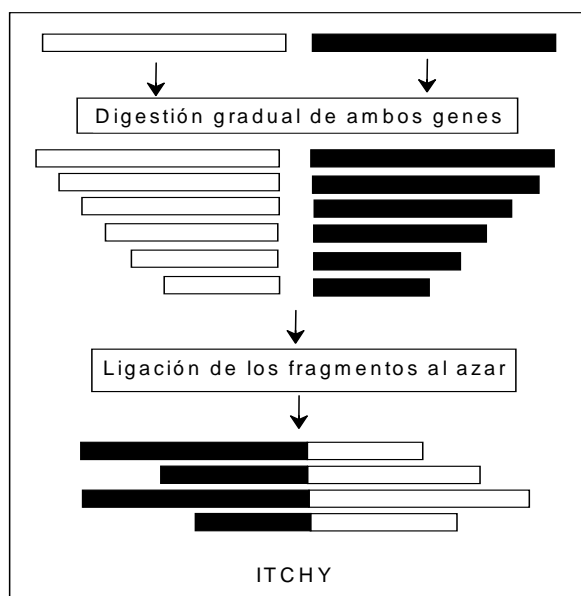
**Fig. 3.** Métodos sexuales o recombinantes. A) Barajado de ADN. Se parte de una familia de genes homólogos que se digieren con DNAsa I para generar fragmentos. Se someten a una PCR donde los fragmentos funcionan como cebadores y templados. Se generan fragmentos de mayor tamaño conforme transcurren los ciclos de amplificación, hasta generar genes completos y se construye una genoteca de genes quiméricos. B) Extensión vacilante (StEP). Dos o más genes se extienden a partir de cebadores específicos durante un periodo de tiempo muy corto. Los fragmentos pequeños se someten a una PCR donde los tiempos de hibridación y extensión son muy cortos, lo cual obliga a los fragmentos a cambiar de templado y seguir extendiendo al otro gen. Después de varias repeticiones se logran obtener genes híbridos completos. C) Método RACHITT. Los fragmentos generados provienen de 1 sola hebra de ADN. Estos son reensamblados usando como templado la otra hebra complementaria. Las regiones que no ensamblaron se remueven con una exonucleasa, los huecos generados se llenan con una DNA polimerasa y se ligan. El templado se remueve con endonucleasa V de forma que quede solo la hebra que contiene los fragmentos ligados y a partir de esta se genera una doble hebra de ADN.



evolución dirigida de proteínas (“**In Vitro Compartmentalization**”, **IVC**). Se genera previamente una genoteca de variantes y las células artificiales son generadas con una emulsión agua-aceite, cada gota contiene un gen con toda la maquinaria molecular necesaria para expresarlo.

Se siguen desarrollando nuevas metodologías considerando las limitaciones que presentan cada una y la necesidad de desarrollar mejores técnicas de recombinación. Muchas son derivadas o combinan las anteriormente descritas. Tal es el caso de barajado de ADN sintético (Ness *et al.*, 1999), una combinación de los métodos ITCHY y

barajado de ADN, “SCRATCHY” (Lutz *et al.*, 2001), recombinación de proteínas independiente de la homología entre secuencias, “SHIPREC” (Sieber *et al.*, 2001), mutagénesis combinatorial ortogonal (Gaytan *et al.*, 2001), ingeniería de proteínas combinatorial basada en la estructura, “SCOPE” (O’Maille *et al.*, 2002), ensamble de oligonucleótidos diseñados, “ADO” (Zha *et al.*, 2003), barajeo de codones (Rao *et al.*, 2005) y barajeo de ADN *In vivo* (Xu *et al.*, 2006).



**Fig. 4.** Truncado gradual para obtener enzimas quiméricas (ITCHY). Dos genes no homólogos se cortan de forma gradual con una exonucleasa. Los genes truncados generados son ligados y se construyen genotecas de genes quiméricos.

### Métodos de aislamiento y selección de mutantes

Uno de los mayores retos en evolución dirigida es el contar con un sistema de selección adecuado y eficiente. Las características más importantes del método son la rapidez, exactitud y que esté dirigido a la identificación del biocatalizador esperado dentro de la numerosa genoteca de mutantes ( $10^4$ - $10^{12}$ ). En principio podemos distinguir dos enfoques: selección y tamizado, los cuales pueden combinarse o usarse consecutivamente.

Los sistemas basados en la selección se han utilizado tradicionalmente para enriquecer ciertos microorganismos, así como para la identificación de los productos de clonación deseados. En ellos se puede ver a simple vista la característica de interés que se desea seleccionar. Aunque este enfoque permite un análisis más rápido de una genoteca numerosa, su aplicación está limitada debido a la falta de sistemas de selección cuantitativos y aplicables.

Los sistemas basados en el tamizado permiten separar las variantes deseadas de acuerdo a sus propiedades. Estos métodos nos permiten

cuantificar la propiedad deseada con técnicas analíticas reproducibles, automatizadas y en escala de volúmenes reducidos.

### *Sistemas basados en la selección*

En el área de la evolución dirigida hay pocos ejemplos en los que se ha usado únicamente la selección para la identificación de biocatalizadores, ya que estos requieren actividades enzimáticas de lo más variadas. Algunos ejemplos son: a) A partir de una genoteca de mutantes de cefalosporinas obtenida por barajado de ADN, se seleccionaron variantes por crecimiento en placas de agar con cantidades crecientes de moxalactama (Cramer *et al.*, 1998) y b) Selección por crecimiento en placas con adipil-leucina ó adipil-serina, de mutantes de acilasa capaces de actuar sobre ácido adípico en lugar de ácido glutámico en cefalosporinas (Otten *et al.*, 2002).

La selección también puede ser utilizada fácilmente para la evolución de enzimas donde la sobrevivencia de la célula y la actividad enzimática están estrechamente ligadas. Un ejemplo de esto es el desarrollado por Naki *et al.* (1998), donde una subtilisina es sometida a un proceso de evolución dirigida; posteriormente las células son adheridas a fibras (una célula por fibra) y las mutantes son seleccionadas por su crecimiento utilizando albúmina sérica bovina como única fuente de nitrógeno. Las mutantes que secretan más subtilisina o que expresan una subtilisina con mayor actividad obtienen más fácilmente nitrógeno y por tanto crecen más rápido (Naki *et al.*, 1998; Arnold & Volkov, 1999).

En la expresión "*in vitro*", la estrategia de selección se basa en la modificación del gen por su producto. Un ejemplo de esto es la evolución de una metiltransferasa, la cual cataliza la metilación específica de ADN. El templado de ADN además de contener el gen de la metiltransferasa contiene la secuencia de metilación. La genoteca de mutantes es distribuida en la emulsión (un gen por gota acuosa) y expresada "*in vitro*". Las gotas de

agua dispersas en la fase hidrofóbica permiten que la selección se lleve a cabo dentro de este compartimiento que contiene el material genético (templado de ADN con la secuencia de metilación) y la enzima expresada (metiltransferasa). Las variantes activas de la enzima modifican el templado de ADN con el cual se encuentran protegiéndolo de ser cortado con la endonucleasa *HaeIII*. La emulsión se rompe y los templados de ADN metilados son aislados y seleccionados. El ciclo se puede repetir cuantas veces sea necesario (Tawfik & Griffiths, 1998).

Existen otros métodos mucho más familiares como la prueba de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) pero desafortunadamente los anticuerpos específicos para todas las posibles proteínas no están disponibles.

### *Sistemas basados en el tamizado*

Dado el gran número de variantes que se generan por evolución dirigida, las herramientas analíticas comunes como cromatografía de gases y HPLC no son útiles (implican costo elevado y mucho tiempo). Se desarrollan entonces los métodos espectrofotométricos, especialmente los colorimétricos y fluorométricos en formatos de microplaca (volúmenes de  $\mu\text{L}$ ) como una alternativa necesaria. Tanto el color como la fluorescencia son señales que se pueden medir fácilmente cuando se cuenta con el equipo adecuado. Se utilizan sistemas automatizados que pueden tomar cientos de muestras simultáneamente y someterlas a un tratamiento que nos permita cuantificar la actividad de la enzima que nos interesa. Este tipo de instrumentos reduce enormemente el tiempo dedicado a la exploración y selección de mutantes. Así mismo, mejora la reproducibilidad de las mediciones y puede hacerse en escalas que resulten económicamente atractivas. Ahora se han desarrollado sistemas que utilizan electroforesis capilar en paralelo, arreglos de termistores (componentes electrónicos cuya resistencia cambia con la temperatura) y la termografía de infrarrojo

para seguir el desarrollo de las reacciones (Wahler & Reymond, 2001). Recientemente se han automatizado también tecnologías de espectrometría de masas como “Electrospray Ionization Mass Spectrometry” (ESI-MS) y “Matriz Assisted Laser desorption-ionization Mass Spectrometry” (MALDI-MS) para la identificación de intermediarios, sustratos y productos de bajo peso molecular en una mezcla de reacción (Liesener *et al.*, 2005; Chen, *et al.*, 2003, Bolbach, 2005).

Las metodologías que se han empleado para tamizado de biocatalizadores enantioselectivos involucran un estudio adecuado de los estereoisómeros para diseñar análogos cuantificables. Un ejemplo es el aislamiento de mutantes de una esterasa de *Pseudomonas fluorescens* por su capacidad enantioselectiva mejorada hacia los resorufin ésteres de los ácidos (R)- ó (S)-3-fenilbutírico (Henke & Bornscheuer, 1999). Otro ejemplo más sofisticado es el realizado por Reetz *et al.* (1999), quienes han trabajado en el aislamiento de variantes de lipasas utilizando *o*-nitrofenil ésteres de ácidos grasos. Después de la hidrólisis del éster se libera *o*-nitrofenol, el cual es un compuesto amarillo que puede ser cuantificable (Reetz, 2000). Una desventaja de estas metodologías es la selección por la hidrólisis del éster del grupo cromóforo y no del verdadero éster que se va a utilizar en las reacciones de síntesis orgánica, por ejemplo un acetato de un alcohol racémico. Para resolver esto, este grupo desarrolló una metodología mas sofisticada en la que utiliza acetatos de alcoholes quirales marcados isotópicamente, seguido de un análisis de los productos de hidrólisis por espectrometría de masas (Reetz *et al.*, 1999; Sutherland, 2000). Como alternativa se puede utilizar una cámara IR-termográfica para identificar las reacciones exotérmicas y por tanto las variantes activas (Reetz *et al.*, 1998).

También se han reportado ensayos cuantitativos rápidos basados en indicadores de pH. En el caso de las lipasas y esterasas, la hidrólisis de un éster

produce un equivalente químico del ácido correspondiente que a su vez produce una disminución del pH. Esta disminución puede ser detectada espectrofluorométricamente con un compuesto sensible a cambios de pH. Incluso, es posible inmovilizar el colorante para seguir una reacción catalizada enzimáticamente (Moris-Varas *et al.*, 1999).

Otra alternativa para los ensayos de aislamiento es el uso de la tecnología de separación de células activadas por fluorescencia (FACS). La tecnología FACS se basa en la separación física de poblaciones de células previamente reconocidas por la fluorescencia de sus marcadores. Hyun *et al.* (1999) reportaron el aislamiento de dioxigenasas capaces de hidroxilar compuestos aromáticos utilizando esta metodología. El ensayo de aislamiento se basa en la producción de catecol por la dioxigenasa, el cual sirve como sustrato para la peroxidasa de rábano que lo polimeriza para generar un compuesto altamente fluorescente. Cuando las dos enzimas (dioxigenasa, peroxidasa) son co-expresadas en una misma célula, la célula presenta fluorescencia en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sustratos aromáticos. Los productos permanecen asociados a la célula y permite el aislamiento de las células con la actividad enzimática por FACS. Otros autores han reportado y propuesto el uso de esta tecnología como una herramienta de alta resolución y rápida para el aislamiento en evolución dirigida (Olsen *et al.*, 2003).

Una metodología mas sofisticada, es la presentación en fagos (“phage display”) para seleccionar mutantes con actividad catalítica. En esta técnica se fusiona la enzima de interés con una de las proteínas de la cápside de un bacteriófago, de modo que la molécula queda expuesta en la superficie del bacteriófago. Los bacteriófagos aislados de un medio de cultivo son posteriormente seleccionados en base a su capacidad de unirse a una fase sólida que tiene unido covalentemente el ligando de la proteína, comportándose como una matriz cromatográfica de

afinidad (Forrer *et al.*, 1999). En otra variante de esta metodología, la enzima de interés expuesta en la superficie del fago permite que el producto permanezca también unido y posteriormente se utiliza un anticuerpo específico para el producto para identificar los fagos catalíticamente activos (Dermatis *et al.*, 1999). Las ventajas de éste método son: su eficiencia, ya que se pueden probar simultáneamente hasta  $10^{12}$  variantes de un gen, permite seleccionar en un solo paso cromatográfico a aquellas variantes que cumplen con el requisito de afinidad por un ligando y puede ser modificado para detectar catálisis en lugar de afinidad. Sin embargo, proteínas multiméricas no pueden organizarse en multímeros y es posible que la proteína fusionada a la proteína del fago no se pliegue adecuadamente perdiendo sus propiedades de unión y catálisis.

### Ejemplos de biocatalizadores mejorados por evolución *in vitro*

Los ejemplos que se describen a continuación muestran la capacidad de la evolución dirigida para crear biocatalizadores con las propiedades de interés, estos pueden dividirse de acuerdo a la característica de la enzima que se modifica: especificidad de sustrato, enantioselectividad, etc. (Tabla 2).

#### *Modificación de la enantioselectividad*

En la industria farmacéutica se requieren principalmente catalizadores enantioselectivos, ya que las moléculas biológicas, que son el blanco de los fármacos, reconocen ligandos en función de su estereoisomería. Por esta razón, mucho del trabajo en evolución dirigida se ha enfocado a mejorar biocatalizadores enantioselectivos. En este sentido, se ha desarrollado mucha investigación con lipasas y estererasas debido a que son muy estables, trabajan en presencia de solventes orgánicos y son aplicables para la síntesis de compuestos ópticamente activos debido a su alta estereoselectividad (Schmidt *et al.*, 2004). Un

ejemplo es el trabajo desarrollado por Liebeton *et al.* (2000) donde incrementaron considerablemente la enantioselectividad ( $E$ ) de una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* por el 2-metildecanoato. En este estudio se realizaron seis generaciones de mutantes por medio de ep-PCR. Las células que expresaban la enzima se evaluaron por actividad con cada uno de los enantiómeros del compuesto modelo, que en este caso es el *p*-nitrofenil éster del ácido 2-metildecanoico. La enantioselectividad de la enzima silvestre era  $E = 1.1$ , lo cual implica que prácticamente no presentaba enantioselectividad. Aquellas variantes que presentaron valores mayores de la  $E$  aparente, fueron puestas en contacto con una mezcla racémica del sustrato y los productos fueron analizados por cromatografía de gases quiral para calcular su  $E$  real. Por este método se logró seleccionar una variante con una  $E$  de 11. Las posiciones de los residuos de aminoácido que resultaron estar relacionados con la enantioselectividad fueron posteriormente exploradas por mutagénesis sitio-específica saturante. La variante generada de este modo presentó 5 aminoácidos modificados, mismos que modificaron su enantioselectividad hasta un valor de  $E$  de 26. Un análisis posterior de las posiciones mutadas en el modelo cristalográfico de la lipasa demostró que estos residuos no están en contacto directo con el estereocentro del sustrato e incluso se localizan lejos del sitio activo, por lo que una mutagénesis racional difícilmente hubiera conducido a las mismas mutaciones. Los autores señalan que estos residuos muy probablemente aumentan la flexibilidad conformacional de la lipasa y esta flexibilidad podría estar asociada a la enantioselectividad (Nardini *et al.*, 2000).

Otro ejemplo es el reportado por el grupo de Arnold (May *et al.*, 2000) para la inversión de enantioselectividad de una hidantoinasa por el isómero D (40% ee) a una moderada por el isómero L (30% ee). La metodología usada para la evolución fue ep-PCR y mutagénesis sitio-específica saturante. La sustitución de sólo un

**Tabla 2.** Ejemplos de nuevos biocatalizadores generados por evolución dirigida.

Enzima	Modificación	Método de mutagénesis	Selección y/o aislamiento	Resultado	Observaciones	Referencia
Esterasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Especificidad de sustrato	Cepas mutagénicas	Crecimiento con indicador de pH	Mutante con el doble de actividad	Enantioselectividad baja	Bornscheuer, <i>et al.</i> , 1999
Lipasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Incrementar enantioselectividad	ep-PCR y cepas mutagénicas	Ensayos microplacas con <i>p</i> -nitrofenil ésteres	Incremento de enantioselectividad (E) de 1 a 26.	5 mutaciones, ninguna en el sitio de unión del sustrato	Liebeton <i>et al.</i> , 2000; Reetz <i>et al.</i> , 1999; Reetz <i>et al.</i> , 2000
Esterasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Actividad en presencia de dimetilformamida (DMF)	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Ensayos microplacas con <i>p</i> -nitrofenil ésteres	Incremento 150 veces la estabilidad en DMF	Mayor actividad sobre <i>p</i> -nitrofenil éster de palmitato que sobre éster de butirato	Arnold & Moore, 1997
Hemoperoxidasa de <i>Coprinus cinereus</i>	Estabilidad y actividad bajo condiciones de lavado	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Incubación microplacas a pH alcalino, con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Actividad residual	Aumento 100 veces la estabilidad en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y 170 veces la termoestabilidad		Cherry <i>et al.</i> , 1999
Hidantoinasa de <i>Arthrobacter sp.</i>	Enantioselectividad reversa (isómero L)	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Ensayos microplacas con D y L-hidantoínas	Cambio de actividad sobre el isómero L	Incremento adicional de la actividad específica	May <i>et al.</i> , 2000
Subtilisina S41	Incrementar termoestabilidad	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa a temperaturas altas	Variante activa en el rango de 10-60°C		Miyazaki <i>et al.</i> , 2000
Esterasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Incrementar termoestabilidad	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa a temperaturas altas	Incremento de 14°C en la termoestabilidad		Giver <i>et al.</i> , 1998
Glutarilacilasa de <i>Pseudomonas SY77</i>	Incrementar la actividad de adipil-acilasa	ep-PCR sobre la subunidad $\alpha$ y cepas mutagénicas	Crecimiento en placa en adipil-leucina	Incremento de la relación $V_{max}/K_m$ para adipil-7-ADCA		Sio <i>et al.</i> , 2002
Varias subtilisinas	Varios parámetros simultáneamente	Barajado de genes	Ensayos microplacas	Se obtienen variantes quiméricas muy activas	Se genera mucha diversidad	Ness <i>et al.</i> , 1999
Varias fitoeno desaturasas y licopenociclasas	Generación de nuevos carotenoides	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa, identificación visual	Carotenoides nuevos (torolueno)	Se evolucionó la vía de biosíntesis completa	Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000

aminoácido fue suficiente para el cambio de enantioselectividad y la actividad se incrementó 5

veces. Esta nueva enzima permitió la producción de L-metionina en *E. coli* a través de la expresión

de la nueva L-hidantoinasa, una L-carbamoilasa y una racemasa en este sistema.

### *Modificación de la especificidad de sustrato*

Un ejemplo interesante del uso de la evolución *in vitro* es el desarrollado por Bornschauer *et al.* (1999). En su trabajo, una doble mutante de una esterasa de *Pseudomonas fluorescens* fue generada con la cepa mutagénica *Epicurian coli* XL1-Red. Esta mutante adquirió la capacidad de hidrolizar estereoselectivamente un 3-hidroxi éster que, debido a un impedimento estérico, no es aceptado como sustrato por 20 hidrolasas comunes que fueron probadas. La identificación de las variantes se realizó en placas de agar con indicadores de pH, observándose un cambio de color después de la hidrólisis del éster y paralelamente en placas suplementadas con un glicerol derivado del 3-hidroxi éster. Sólo las colonias que producían esterases activas podían utilizar el glicerol como fuente de carbono y por lo tanto presentaron mayor crecimiento.

Otro ejemplo es la conversión de una galactosidasa de *E. coli* a fucosidasa. La evolución de esta enzima se realizó por barajado de ADN y la identificación de las mutantes deseadas se basó en el uso de sustratos cromogénicos derivados de fucosa. Las fucosidasas generadas presentaron un incremento de 10-20 veces en los valores de  $k_{cat}/K_m$  para la fucosa, comparados con los valores obtenidos con la proteína original (Zhang *et al.*, 1997).

Sio *et al.* (2002) reportaron la conversión de actividad de una glutaril acilasa de *Pseudomonas* SY77 a una adipil-7-ADCA acilasa. El 7-ADCA (ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico) es un precursor importante en la síntesis de cefalosporinas semi-sintéticas. En una primera ronda de mutagénesis se localizaron los residuos que son importantes para la actividad. Posteriormente se hizo una mutagénesis sitio-específica saturante de la subunidad  $\alpha$  de esta enzima y se seleccionaron las variantes deseadas

por crecimiento con un derivado del sustrato. Se identificaron 3 mutantes con valores mayores de  $V_{max}/K_m$  para el análogo con cadenas laterales de adipil-7 ADCA y menores para los sustratos con cadenas laterales de glutarilo.

Las aldolasas son enzimas muy utilizadas en química orgánica para catalizar la reacción aldol asimétrica que permite la síntesis controlada de moléculas pequeñas complejas bioactivas. Por lo anterior, se han realizado numerosos trabajos de evolución dirigida con estas enzimas, algunos enfocados a la modificación de especificidad de sustrato (Bolt, *et al.*, 2008). Una aldolasa inusual es la 2-deoxiribosa-5-fosfato aldolasa (DERA) que cataliza la condensación entre dos aldehídos. Esta enzima ha sido modificada por evolución dirigida para la síntesis de fármacos de estatina (Jennewein, *et al.*, 2006).

Otro grupo de enzimas que también son muy utilizadas como biocatalizadores, son las citocromo P450, las cuales catalizan la introducción de un átomo de oxígeno en un sustrato orgánico. En especial las monooxigenasas P450 ayudan a la eliminación de fármacos en mamíferos y de contaminantes químicos ambientales. Se ha desarrollado mucho trabajo para la modificación por evolución dirigida de estas enzimas. Las técnicas de evolución dirigida se han aplicado en su mayoría para la modificación de la especificidad de sustrato (Gillam, 2007).

### *Incremento de la actividad de la enzima bajo las condiciones del proceso*

Si se cuenta con un biocatalizador con la estereoselectividad ó la especificidad por sustrato adecuada, éste puede no cumplir con los requerimientos necesarios para el proceso. Las propiedades de estabilidad de la enzima al pH, temperatura y disolventes difícilmente pueden ser mejoradas por los métodos clásicos como inmovilización ó mutagénesis sitio-dirigida. Nuevamente la evolución dirigida es una alternativa.

Un ejemplo es el descubrimiento de una esterasa de *Bacillus subtilis* capaz de hidrolizar *p*-nitrofenil ésteres de Loracarfeb (una antibiótico de la familia de las cefalosporinas). Sin embargo, dicha enzima presenta una actividad muy baja en presencia de dimetilformamida (DMF), disolvente que debe ser adicionado para la disolución del sustrato. La enzima se sometió a un proceso de evolución dirigida con ep-PCR y barajado de ADN, lo cual generó una variante con actividad incrementada 150 veces a la mostrada originalmente en DMF (Arnold & Moore, 1997). Adicionalmente, Giver *et al.*, (1998) reportó un incremento de 14°C en la termoestabilidad de esta esterasa *B. subtilis* después de ser modificada también por evolución dirigida.

Recientemente, la xilanasa A termoestable de *Thermofibida fusca* ha sido modificada exitosamente por barajado de ADN para incrementar la actividad catalítica y estabilidad en pH alcalino. El análisis de la variante generada mostró un cambio en la secuencia de 5 aminoácidos, 3 de ellos cercanos al sitio activo (Wang Q & Xia T, 2008).

Un ejemplo desarrollado directamente para una aplicación industrial es el reportado por Cherry *et al.*, (1999). En un intento por producir variantes adecuadas para su uso en detergentes biológicos, una hemoperoxidasa de *Coprinus cinereus* fue sometida a múltiples rondas de evolución dirigida. Las mutantes se obtuvieron por ep-PCR y mutagénesis sitio-dirigida y se identificaron por su estabilidad mejorada midiendo la actividad residual después de ser incubadas en condiciones similares a las de lavado (pH=10.5, 50°C, 5-10mM peróxido). Se realizó otra ronda de evolución dirigida por barajado de ADN y se encontró una variante con un incremento marcado en la estabilidad oxidativa (100 veces) y en la estabilidad térmica (174 veces) en comparación con la enzima original.

En general se ha asumido que la adecuación de una característica de un biocatalizador en un sentido ésta comprometida con la pérdida o

disminución de otras características de la enzima. Usualmente se considera que la estructura de una enzima requiere de cierta rigidez para que ésta presente actividad a alta temperatura y que, en consecuencia, esta rigidez actúa en contra de la actividad a temperaturas menores. Sin embargo, se ha demostrado que esto no es del todo cierto; tal es el caso de la evolución *in vitro* de una subtilisina que trabaja habitualmente a bajas temperaturas. Las variantes de esta enzima obtenidas por evolución dirigida mostraron un incremento de la termoestabilidad hasta 60°C sin perder la actividad mostrada a 10°C (Miyazaki *et al.*, 2000). En otro trabajo desarrollado por la empresa Novo Nordisk se lograron obtener variantes de una subtilisina a partir de una genoteca generada por barajado de ADN. Lo interesante es que dichas variantes mostraron mejoras de 4 parámetros simultáneamente: actividad a 23°C, termoestabilidad, tolerancia a disolventes orgánicos y pH (Ness *et al.*, 1999).

### *Perspectivas*

La evolución dirigida es una herramienta muy útil para la obtención de nuevos biocatalizadores por lo que nuevos métodos de mutagénesis y recombinación más específicos se están desarrollando.

Hasta la fecha la evolución dirigida se ha enfocado casi de manera específica en mejorar biocatalizadores. Sin embargo, recientemente también se ha aplicado en el campo de la ingeniería de vías metabólicas completas (Johannes & Zhao, 2006). De este modo, la síntesis de análogos de productos naturales, un campo que sólo estaba reservado a la química orgánica, podrá en un futuro efectuarse por evolución de vías metabólicas. Un ejemplo es la generación de carotenoides cíclicos como el toruleno, mediante el barajado de genes de desaturasas de fitoeno y ciclasas de licopeno, provenientes de diferentes especies de bacterias (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000). Se han obtenido nuevos compuestos derivados de la evolución de la

vía de biosíntesis de carotenoides, la cual ha servido como base para la evolución de otras vías metabólicas (Umeno *et al.*, 2005).

En los ejemplos mencionados, las mutaciones encontradas y su efecto sobre las propiedades catalíticas de las enzimas muestran nuestro pobre entendimiento de la relación entre estructura y función de las enzimas. Sin embargo, los conocimientos generados por estos métodos no racionales, así como por los estudios estructurales racionales, nos permitirán acceder al diseño racional de proteínas en un futuro no muy lejano.

## REFERENCIAS

- Abecassis V, Pompon D & 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 Res.* 28: e88.
- Arnold FH (1998) Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.* 31: 125-131.
- Arnold FH & Moore JC (1997) Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58: 1-14.
- Arnold FH & Volkov A (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 54-59.
- Bolbach G (2005) Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of non-Covalent complex: fundamentals and applications. *Curr. Pharm. Dess.* 20: 2535-2557.
- Bolt A, Berry A & Nelson A (2008) Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry. *Arch Biochem Biophys.* In press. doi:10.1016/jabb.2008.01.005
- Bornscheuer UT (1998) Directed evolution of enzymes. *Angew Chem Int. Ed. Engl.* 37: 3105-3108.
- Bornscheuer UT, Altenbuchner J & Meyer HH (1999) Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2169-2173.
- Cadwell C & Joyce G (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods and Applications*, 2: 28-33.
- Chatterjee R & Yuan L (2006) Directed evolution of metabolic pathways. *Trends Biotechnol.* 24: 28-38.
- Chen P (2003) Electrospray ionization tandem mass spectrometry in high-throughput screening of homogeneous catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42: 2832-2847.
- Cherry JR & Lamsa MH (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* 17: 379-384.
- Coco WM (2003) RACHITT: Gene family shuffling by random chimeragenesis on transient templates. *Methods Mol. Biol.* 231: 111-127.
- Cramer A, Raillard S, Bermudez E & Stemmer W (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391: 288-291.
- Dermatis S, Huber A & Viti F (1999) A strategy for the isolation of catalytic activities from
- Farinas ET, Bulter T & Arnold FH (2001) Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 545-551.
- Ferrer P, Jung S & Pluckthun A (1999) Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 514-20.
- Gaytan P, Yanez J, Sanchez F & Soberon X (2001) Orthogonal combinatorial mutagenesis: a codon-level combinatorial mutagenesis method useful for low multiplicity and amino acid-scanning protocols. *Nucleic Acids Res.* 29: e9-17
- Gillam EM (2007) Extending the capabilities of nature's more versatile catalysts: Directed evolution of mammalian xenobiotic-metabolizing P450s. *Arch. Biochem. Biophys.* 464: 176-186.
- Giver L; Gershenson A, Freskgard P & Arnold FH (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 12809-12813.



- Henke E & Bornscheuer UT (1999) Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by ep-PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.* 380: 1029-1033.
- Hughes MD, Nagel DA, Santos AF, Sutherland AJ & Hine AV (2003) Removing the redundancy from randomised gene libraries. *J. Mol. Biol.* 331: 973-79.
- Hyun J, Akira A, Lin Z & Arnold FH (1999) A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chemistry & Biology.* 6: 699-706.
- Jaeger KE, Eggert T, Eipper A & Reetz MT (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 519-530.
- Jennewein S, Schürmann M, Woldweg M, Hilker I, Lutein R, Wubbolts M (2006) Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.* 1: 537-548.
- Johannes TW & Zhao H (2006) Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 261-267.
- Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, Nardini M, Lang D, Dijkstra BW, Reetz MT & Jaeger KE (2000) Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* 7: 709-718.
- Liese A, Seelbach K & Wandrey C (2000) Industrial Biotransformations. Wiley-VCH (eds).
- Liesener A & Karst U (2005) Monitoring enzymatic conversions by mass spectrometry: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 1451-1464.
- Lutz S, Ostermeier M, Moore GL, Maranas CD & Benkovic SJ (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 11248-11253.
- May O, Nguyen PT & Arnold FH (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.* 18: 317-320.
- Miyazaki K, Wintrode PL, Grayling RA, Rubingh DN & Arnold FH (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* 297: 1015-1026.
- Miller OJ, Bernath K, Agresti JJ, Amitai G, Kelly BT, Mastrobatista E, Taly V, Magdassi S, Tawfik DS & Griffiths AD (2006) Directed evolution by *in vitro* compartmentalization. *Nature.* 3: 561-570.
- Moris-Varas F (1999) Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2183-2188.
- Murakami H, Hohsaka T & Sisido M (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biotechnol.* 20: 76-81.
- Murakami H, Hohsaka T & Sisido M (2003) Random insertion and deletion mutagenesis. *Methods Mol. Biol.* 231: 53-64.
- Naki D, Paech C, Ganshaw G & Schellenberger V (1998) Selection of a subtilisin-hyperproducing *Bacillus* in a highly structured environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 290-294.
- Nardini M, Lang DA, Liebeton K, Jaeger KE & Dijkstra BW (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* 275: 31219-31225.
- Ness JE, Welch M, & Giver L (1999) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.* 17: 893-896.
- Neylon C (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Research.* 32: 1448-1459.
- Olsen MJ, Gam J, Iverson BL & Georgiou G (2003) High-throughput FACS method for directed evolution of substrate specificity. *Methods Mol. Biol.* 230: 329-342.

- O'Maille PE, Bakthina M & Tsai MD (2002) Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J. Mol. Biol.* 321: 677-691.
- Ostermeier M, Nixon AE & Bencovic SJ (1999) Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2139-2144.
- Otten LG, Sio CF, Vrieling J, Cool RH & Quax WJ (2002) Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the Beta  $\beta$ -subunit. *J. Biol. Chem.* 277: 42121-42127.
- Panke S, Held M & Wubbolts M (2004) Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. Review. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 272-279.
- Petrounia IP & Arnold FH (2000) Designed evolution of enzymatic properties. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 325-330.
- Rao A, Chopra S, Ram G, Gupta A & Ranganatahn A (2005) Application of the "codon shuffling" method: Synthesis and selection of the *novo* proteins as antibacterials. *J. Biol. Chem.* 280: 23605-23614.
- Reetz MT (2000) Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis. *Sci. Prog.* 83: 157-172.
- Reetz MT, Becker MH, Klein HW & Stöckigt (1999) A method for high throughput screening of enantioselective catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38: 1758-1761.
- Reetz MT, Becker MH, Kühling KM & Holzwarth A (1998) Time-resolved IR-thermographic detection and screening of enantioselectivity in catalytic reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37: 2647-2650.
- Riesenfeld CS, Schloss PD & Handelsman J. (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525-552.
- Ryu K, Hwang SY, Kim KH, Kang JH & Lee EK (2008) Functionality improvement of fungal lignin peroxidase by DNA shuffling for 2,4-dichlorophenol degradability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stability. *J. Biotechnol.* 133:110-5.
- Schmidt-Dannert C, Umeno D & Arnold FH (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.* 18:750-3.
- Schmidt M, Baumann M, Henke E, & Bornscheuer UT (2004) Directed evolution of lipases and esterases. *Methods Enzimol.* 388: 199-207.
- Shao Z, Zhao H, Giver L & Arnold FH (1998) Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 26: 681-683.
- Shibuya H, Kaneko S & Hayashi K (2000) Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of xylanase by random gene shuffling. *Biochem. J.* 349: 651-656.
- Sieber V, Martinez CA & Arnold FH (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat. Biotechnol.* 19: 456-460.
- Sio CF, Riemens AM, van der Laan JM, Verhaert RM & Quax WJ (2002) Directed evolution of a glutaryl acylase into an adipyl acylase. *Eur. J. Biochem.* 269: 4495-4504.
- Stemmer W (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10747-10751.
- Sun Fong, Machajewsky TD, Chi Ching Mak & Chi-Huey Wong (2000) Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D and L-sugars. *Chem. Biol.* 7: 873-883.
- Sutherland JD (2000) Evolutionary optimisation of enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 263-269.
- Tawfik DS & Griffiths AD (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* 16: 652-656.
- Umeno D, Tobias AV & Arnold FH (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 51-78.
- Urban A, Neukirchen S & Jaeger K (1997) A rapid and efficient method for site-directed

- mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* 25: 2227-2228.
- Voigt CA, Mayo SL, Arnold FH & Wang ZG (2001)a Computationally focusing the directed evolution of proteins. *J. Cell Biochem. Suppl.* 37: 58-63.
- Voigt CA, Kauffman S & Wang ZG (2001)b Rational evolutionary design: The theory of in vitro protein evolution. En *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 55) *Evolutionary Protein Design* (F.H. Arnold, Ed.). Academic Press, San Diego pp. 79-160.
- Volkov AA, Shao Z & Arnold FH (1999) Recombination and chimeragenesis by in vitro heteroduplex formation and in vivo repair. *Nucleic Acids Res.* 27: E18.
- Wahler D, Reymond JL (2001) High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 535-544.
- Wang Q & Xia T (2008) Enhancement of the activity and alkaline pH stability of *Thermobifida fusca* xylanase A by directed evolution. *Biotechnol. Lett.* In press. doi 10.1007/s10529-007-9508-1.
- Wong TS, Roccatanno D, Zacharias M & Schwanenberg UA (2006) Statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J. Mol. Biol.* 355: 858-871.
- Wong TS, Tee KL, Hauer B & Schwanenberg UA (2004) Sequence saturation mutagenesis (SeSam) a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 32: e26 .
- Xu S, Ju J, Misono H & Ohnishi K (2006) Directed evolution of extradiol dioxygenase by a novel in vivo DNA shuffling. *Gene*, 368: 126-137.
- Zha D, Eipper A & Reetz MT (2003) Assembly of Designed Oligonucleotides as an Efficient Method for Gene Recombination: A New Tool in Directed Evolution. *Chem. Bio. Chem.* 4: 34-39.
- Zhang JH, Dawes G & Stemmer WP (1997) Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 4504-4509.
- Zhao H, Giver L, Shao Z, Affholter JA & Arnold FH (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* 16: 258-26.