

EVOLUCIÓN DIRIGIDA, O CÓMO CREAR ENZIMAS PARA FINES INDUSTRIALES

Directed evolution: the quest for making enzymes useful for the industry

Paloma F. Salas*

Durante décadas, los químicos sintéticos han buscado que los catalizadores usados a escala industrial sean tan eficientes y excepcionalmente selectivos como lo son las enzimas en sistemas biológicos. Ante el poco éxito conseguido, los esfuerzos más recientes se han enfocado en convertir las enzimas naturales en catalizadores útiles para la industria, y la ingeniería de proteínas ha tenido la tarea de adaptarlas a las condiciones de trabajo de los procesos a escala industrial. El enfoque denominado evolución dirigida es uno de los modelos utilizados para llevar esto a cabo. Inspirado en la evolución natural de las especies, este modelo propone evolucionar enzimas de forma acelerada, dentro del laboratorio, de manera que la enzima manipulada presente las propiedades deseadas para su aplicación industrial. La evolución dirigida es responsable, por ejemplo, de la producción a escala industrial de enzimas incluidas en los detergentes domésticos, y de las enzimas utilizadas por la industria farmacéutica para la generación de intermediarios, que son sintetizados por microorganismos que expresan la enzima mutada desarrollada en el laboratorio. Hoy en día, estas enzimas, algunas de uso industrial y muchas otras aún en fase exploratoria, pueden catalizar con alta eficiencia procesos sintéticos que forman incluso compuestos no naturales de organosilicio y organoboro.

Palabras claves: evolución dirigida, enzimas, mutagénesis, catálisis

En octubre de 2018, la Real Academia de las Ciencias de Suecia galardonó con el Premio Nobel de Química a los profesores Frances H. Arnold (EE.UU), George P. Smith (EE.UU) y Gregory P. Winter (Reino Unido). El premio se dividió en una mitad para Arnold por sus contribuciones en “la evolución dirigida de las enzimas” y la otra mitad en partes iguales para Smith y Winter, por sus contribuciones en “el

For decades, synthetic chemists have sought to make industrial-scale catalysts as efficient and exceptionally selective as enzymes are in biological systems but, unfortunately, this task has proven evasive. Efforts then focused on making enzymes useful for the industry, and protein engineering had the task of adapting natural enzymes to work in conditions of industrial-scale processes. The approach called directed evolution is one of the models used to carry this out. Inspired by the natural evolution of species, this model proposes to evolve enzymes in an accelerated way, within the laboratory, in such a way that the manipulated enzyme exhibits the properties desired for its industrial application. Directed evolution is responsible, for example, for the industrial-scale production of enzymes included in household detergents and of the enzymes used by the pharmaceutical industry for the generation of intermediates, which are synthesized by microorganisms that express the mutated enzyme evolved in the laboratory. Today, these enzymes, some in industrial use and many others still in the exploratory stage, can catalyze very efficiently synthetic processes that form even non-natural compounds such as organosilanes and organoboranes.

Keywords: directed evolution, enzymes, mutagenesis, catalysis

despliegue de péptidos y anticuerpos por los fagos”.¹ De esta manera, la Academia de las Ciencias de Suecia ha reconocido con este prestigioso galardón al rol que tiene la química en la ingeniería de proteínas y la manipulación de organismos para la producción de biomoléculas útiles para la sociedad, todo esto siguiendo el modelo de la evolución. Veamos con más detalle en qué radica la importancia de este galardón.

*La profesora Paloma Salas es Doctora en Química. Ha trabajado como consultora en industria y actualmente es profesora a tiempo completo en el Departamento de Ciencias, Sección Química, de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima. E-mail: salas.pf@puccp.edu.pe

1. The Royal Swedish Academy of Sciences (2018) “The Nobel Prize in Chemistry 2018.” (📄) Consultado: 22/11/18.

Las enzimas son los grandes catalizadores naturales, capaces de generar productos quimio-, regio-, y enantioselectivos de manera relativamente fácil, con altos rendimientos, sin subproductos y bajo condiciones suaves. El uso de enzimas a gran escala, para el desarrollo de sustancias químicas, es uno de los más añorados sueños de la industria. Esto se debe no solo al funcionamiento altamente selectivo descrito líneas arriba, sino a que las enzimas son catalizadores eco-amigables, en contraste con los catalizadores actuales, que en su mayoría están compuestos por metales de transición costosos y tóxicos que generan residuos peligrosos, y los cuales, además, requieren de condiciones mucho más extremas de trabajo sin llegar a ser tan eficientes y selectivos como las enzimas.

De hecho, existen varios procesos que en la actualidad son catalizados por enzimas. Estos procesos comprenden desde la bioremediación y la síntesis química en la industria farmacéutica hasta la elaboración de detergentes, aceites y biodiesel, por mencionar algunos. Estas enzimas, producidas para su uso industrial, incluyen hidrolasas, proteasas, lipasas y polimerasas, entre otras.² A pesar de sus pronunciadas ventajas, solo un número limitado de enzimas se usan a nivel industrial, y es que también poseen ciertas limitaciones. Por un lado, son altamente específicas, lo que quiere decir que funcionan para un número pequeño de sustratos, cuando lo ideal sería que pudieran ofrecer una mayor versatilidad. Además, funcionan solo en su ambiente natural (generalmente medio acuoso) donde no necesariamente son solubles todos los sustratos de interés, por lo que se requeriría que fueran también estables en medios orgánicos, además de ser estables en un rango razonable de temperatura.

La ingeniería de proteínas, entonces, ha tenido como función optimizar enzimas para su aplicación en otros ambientes, frente a otros sustratos, e incluso para catalizar reacciones en las que originalmente no participaban (actividad no natural), todo ello orientado a ser aplicadas en fines industriales. Existen dos formas de manipular enzimas, una de ellas es de manera racional, y la otra por evolución dirigida. El modelo racional usa el conocimiento previo sobre la enzima para predecir sustituciones de aminoácidos específicos que puedan dar lugar a las propiedades buscadas. Por otro lado, el modelo de la evolución dirigida, en el que se centra este artículo, se basa en la generación de una biblioteca nueva de enzimas a partir de un número n de modificaciones aleatorias en la estructura primaria de la enzima nativa, y en la producción de varias generaciones sucesivas, por combinación de los ejemplares más atractivos, hasta llegar a un producto: la enzima más útil. Este último modelo es el que ponen en práctica los recientes ganadores del Nobel de química para evolucionar enzimas dentro del laboratorio. Arnold, Smith, Winter, y muchos otros

alrededor del mundo, adaptan los mecanismos que usa la biología en su optimización, innovación y supervivencia para implementarlos en la resolución de problemas en la química e ingeniería. Con partidarios y opositores, una cosa es innegable, funciona. Y funciona tan bien que hasta el momento ha producido enzimas que son útiles en ambientes muy distintos de su ambiente natural (como, por ejemplo, en solventes orgánicos), las cuales funcionan varios cientos de veces mejor que la enzima natural. Además, han reducido a cero el número de subproductos e, incluso, han podido preparar productos que no se habían podido lograr en el laboratorio. Ahora, con el premio Nobel como respaldo, parece que la propuesta de evolución dirigida en la ingeniería de enzimas continuará consolidándose.

LA EVOLUCIÓN DIRIGIDA, SUS ORÍGENES

Las especies vivas en su totalidad han seguido el modelo evolutivo: los genes que conforman las especies han mutado y, con ello, han generado distintas proteínas que sirvieron para que el organismo se adapte y sobreviva en realidades cambiantes. Y no solo ha sido de manera natural, los seres humanos lo han puesto en práctica durante miles de años: han criado plantas y animales que “cruzaron” sin medir las consecuencias, pero sabiendo que esperaban beneficios. Sin saberlo, los seres humanos hemos practicado la ingeniería de proteínas para nuestro beneficio a lo largo de la historia.³

El primero en proponer la idea de evolución dirigida de proteínas fue Manfred Eigen en 1984, cuando publicó la propuesta de manera teórica.³ Unos años más tarde, Frances Arnold, quien trabajaba entonces en la División de Química e Ingeniería Química del Instituto de Tecnología de California (Caltech), publicó uno de los primeros trabajos en la implementación de la hipótesis de Eigen. En 1993 reportó una variante de la proteasa subtilisina E que es capaz de funcionar en un medio altamente orgánico casi tan bien como la enzima original en su medio natural.⁴ Después de cuatro generaciones de mutagénesis, que reemplazaron 10 aminoácidos originales (de los casi trescientos presentes en la enzima natural), todos ubicados en los bucles de la superficie de la proteína y cerca del sitio activo y del sitio de unión del sustrato, la variante exitosa mostró un incremento de 256 veces su actividad frente a la enzima nativa en un medio de 60% DMF.⁴ Además, en subsecuentes experimentos con esta y otras enzimas se logró incrementar dos propiedades que antes se creían que eran indirectamente proporcionales: la termoestabilidad y

2. Porter, J. L.; Rusli, R. A.; Ollis, D. L. *ChemBioChem* **2016**, *17* (3), 197–203. (□)

3. The Royal Swedish Academy of Sciences (2018) ; *Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2018 – Directed Evolution of Enzymes and Binding Proteins*. pp 1–10. (□)

4. Chen, K.; Arnold, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90* (12), 5618–5622. (□)

la actividad. Esta creencia se debía a una amplia evidencia que había mostrado que una mayor rigidez molecular era un pre-requisito para la termoestabilidad, mientras que la flexibilidad era necesaria para la actividad catalítica.⁵ Esto ya no es completamente cierto y la evolución dirigida de la subtilisina E fue el primer gran logro de Arnold en este campo y la semilla que permitió continuar el desarrollo de esta metodología.

Nada de esto hubiese sido posible sin los avances en biología molecular y las pruebas de evaluación de alto rendimiento (*high-throughput screening*) desarrollados en las últimas décadas. Estos avances permiten, a día de hoy, escribir, cortar y pegar ADN, además de lograr que ese ADN sea leído y traducido en proteínas en organismos recombinantes, todo con relativa facilidad. La mutagénesis aleatoria de las enzimas nativas, que permite alcanzar las diversas generaciones en su evolución, puede llevarse a cabo por métodos como el “PCR con predisposición al error” (*error-prone PCR*, *epPCR*), el método de “barajado de ADN” (*DNA shuffling*), o por “mutagénesis por saturación de sitio” (*site-saturation mutagenesis*). La primera técnica, la *epPCR*, incorporó en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) la capacidad de generar mutaciones aleatorias durante el proceso de replicación del ADN. El *DNA shuffling* es también llamado recombinación genética porque fragmenta genes y los reensambla de manera aleatoria, recombinando varias secuencias de ADN de distintas enzimas en una biblioteca o generación. Finalmente, la mutagénesis por saturación de sitio permite la sustitución sistemática de un aminoácido en cierta posición por cualquier otro de los 20 aminoácidos proteínogénicos.^{2,6} Esta mutagénesis se acopla a una evaluación y selección cuidadosamente diseñadas. Muchas veces estos estudios se basan en el crecimiento celular, donde existe una correlación directa entre la supervivencia de la población celular y la actividad buscada en la enzima. Luego de este proceso de selección, sigue una segunda evaluación ya no de supervivencia celular sino de medición de la actividad de la enzima.^{2,6} El lector interesado puede encontrar una completa descripción de los métodos de laboratorio empleados en la ingeniería de proteínas consultando la bibliografía esencial al final del artículo.

En resumen, la evolución dirigida es un procedimiento en el cual se identifica una proteína de partida, se diversifican los genes que la codifican, se expresa y se evalúa; luego, se seleccionan los mejores candidatos como padres de la siguiente generación, y así sucesivamente hasta que se alcance una proteína con una propiedad específica mejorada, sea actividad enzimática, afinidad, especificidad o estabilidad (Figura 1).

Una de las críticas al modelo de evolución dirigida es que carece de todo diseño racional. Sin embargo, la aplica-

ción de este modelo en el laboratorio no es tan simple, ni es poco racional. Arnold y colaboradores afirman que el diseño comienza por seleccionar bien el punto de partida: una enzima nativa que tenga algo, aunque sea mínimo, de la actividad o propiedad buscada.⁶ La evolución no funciona generando nuevas enzimas ni nuevos centros activos; todas las enzimas homólogas son similares a un ancestro, del que fueron adaptando los elementos de su mecanismo o de su maquinaria. Además de ello, debe invertirse un considerable trabajo para el diseño, tanto del número y la manera en la que se harán las bibliotecas de proteínas mutantes, como del método de evaluación de la actividad o propiedad de interés. En un primer caso, si se producen numerosas mutaciones aleatorias, estas pueden desvirtuar a la enzima, y en el segundo caso, si no está bien diseñada la manera de evaluación, podrían descartarse enzimas con potencial para futuras mutaciones.⁶ Por su parte, Arnold critica el modelo racional por ser ineficiente, lento y costoso. La comprensión de la conexión entre secuencia y función es, lamentablemente, aún desconocida, por lo que hasta el día de hoy es imposible crear una enzima desde cero para que cumpla una determinada tarea. No hay manera confiable de predecir eficientemente las mutaciones que mejoren el rendimiento de una enzima y es imposible probar todas las mutaciones posibles en una enzima que tiene entre 200 y 300 aminoácidos (¡con 20 aminoácidos disponibles existen 20³⁰⁰ posibilidades distintas!), además de que muy pocos de esos aminoácidos cumplen un rol funcional. La evolución dirigida, por otro lado, logra resultados funcionales deseables, ignorando cómo la secuencia los codifica.

EVOLUCIÓN DIRIGIDA Y QUÍMICA SINTÉTICA

Es posible que nos estemos preguntando, ¿cómo se relaciona la evolución dirigida con la química? Aunque todo esto parece bastante biológico, la misma Arnold parece tender un puente hacia nuestra rama en un ensayo publicado el año pasado en *Angewandte Chemie*.⁷ En este ensayo, Arnold describe lo que puede ser entendido como su admiración por la química sintética. Elogia a esta rama de la química por haber tomado elementos y compuestos que la naturaleza no utilizaba, para transformarlos en los productos que nos alimentan, visten, albergan, entretienen y curan, y que han dado forma a nuestra vida. Los químicos sintéticos han hecho innumerables esfuerzos y con ello han logrado muchas cosas, sin embargo, no se ha podido igualar la eficiencia y la selectividad que logran los sistemas biológicos utilizando enzimas. Lo sintético recoge inspiración de la naturaleza y, según Arnold, es momento de que la naturaleza recoja inspiración del mundo sintético.

5. Arnold, F. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (3), 125–131. (□)

6. Arnold, F. H.; Wintrode, P. L.; Miyazaki, K.; Gershenson, A. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26* (2), 100–106. (□)

7. Arnold, F. H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (16), 4143–4148. (□)

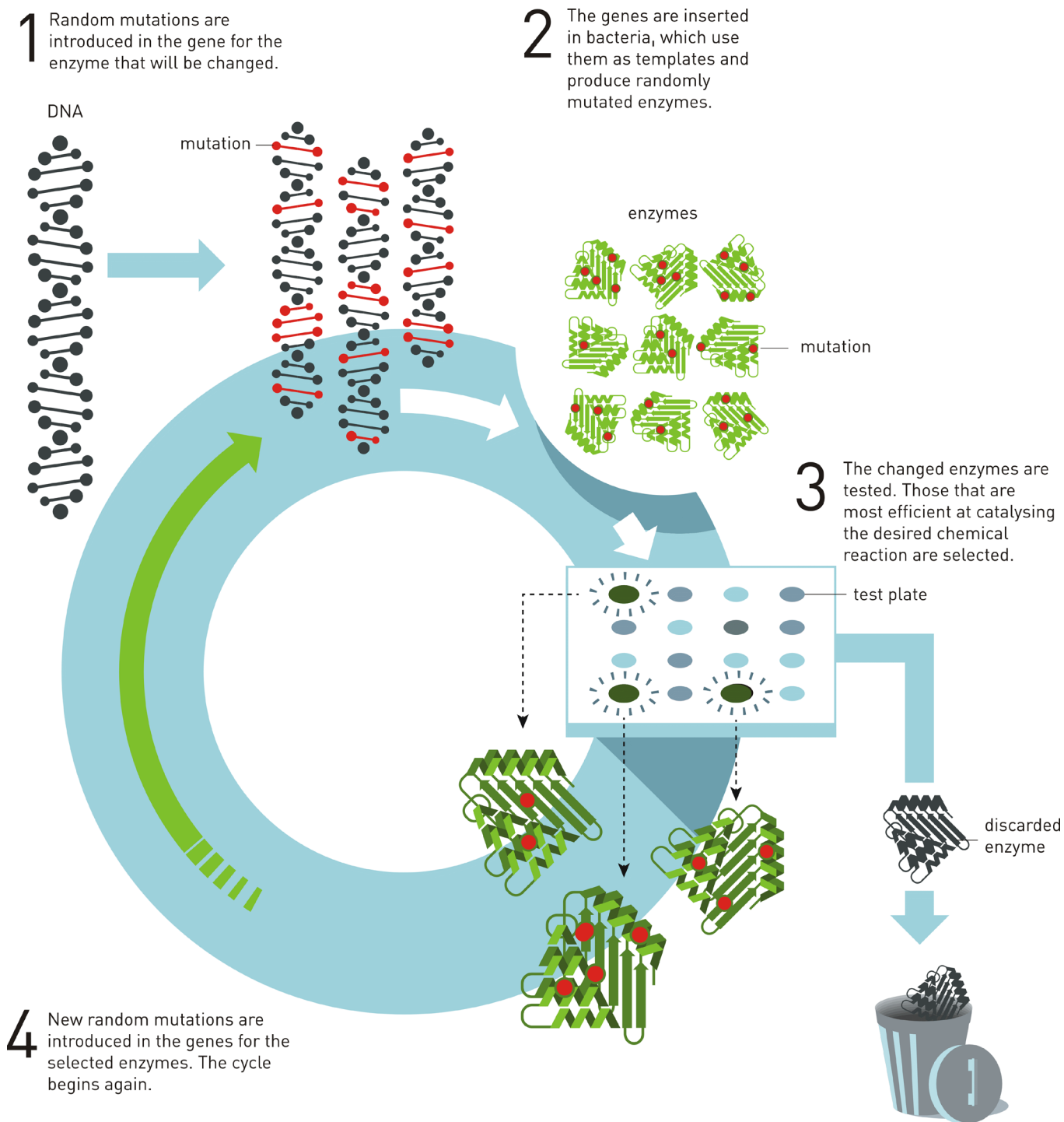


Figura 1. Manipulación de enzimas por evolución dirigida.³ 1.) Mutaciones son introducidas de manera aleatoria en el gen que codifica la enzima que será alterada. 2.) Los genes son insertados en bacterias, las cuales los usarán para la producción de enzimas mutadas. 3.) Las enzimas mutadas son evaluadas. Las más eficientes catalizando la reacción química deseada son seleccionadas y el resto descartado. 4.) Nuevas mutaciones aleatorias son introducidas en los genes del grupo de enzimas seleccionadas y el ciclo comienza nuevamente. ©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences.

Por ello, luego de mejorar significativamente las características de ciertas enzimas, los expertos en el campo se impusieron un reto más grande: explorar reacciones comunes para la química sintética, pero partiendo de maquinaria biológica, para llevar a cabo nuevas funciones en enzimas no

relacionadas con la actividad buscada. Por ejemplo, los citocromos P450s que realizan un número de reacciones complejas como la hidroxilación, epoxidación, nitración y más, fueron un atractivo punto de partida para explorar reacciones inventadas por los químicos sintéticos. Arnold y varios otros

descubrieron en su trabajo que era posible conseguir muchas funciones nuevas y no-naturales para los P450s y otras enzimas.⁷

Por ejemplo, la transferencia de grupos carbeno y nitreno a moléculas orgánicas, que genera nuevos enlaces C-C y C-N en medios 100% orgánicos, fue lograda por enzimas P450s mutadas siguiendo el modelo de evolución dirigida.⁸ Incluso, se demostró que estas nuevas actividades no estaban restringidas a los citocromos P450s. Algunas enzimas que no cumplen roles catalíticos de manera natural, como la proteína hemo almacenadora del oxígeno, la mioglobina, pueden ser mutadas para catalizar este tipo de reacciones nunca observadas para las P450s o proteínas hemo.⁸ En unos pocos ciclos de mutagénesis estas proteínas evolucionaron hasta presentar aumentos significativos en actividad y estereoselectividad, que superan a las obtenidas por catalizadores metálicos. Hasta el momento se ha desarrollado un gran número de estas enzimas que se utilizan a nivel industrial para la generación de precursores quirales necesarios en la industria farmacéutica, con excelentes rendimientos y enantio/diastereoselectividad. Algunas de estas enzimas y las síntesis que catalizan se muestran en la Figura 2.⁸

Tanto la alta actividad como la selectividad son propiedades ya conocidas para las enzimas, sin embargo, algo que nunca había sido alcanzado era que intervinieran formando enlaces desconocidos en el mundo biológico, como por ejemplo, el enlace C-Si o C-B. Estos dos enlaces están presentes en un gran número de compuestos de uso rutinario, y se producen de manera sintética por el hombre dado que no se encuentran en la naturaleza ni se conoce alguna enzima

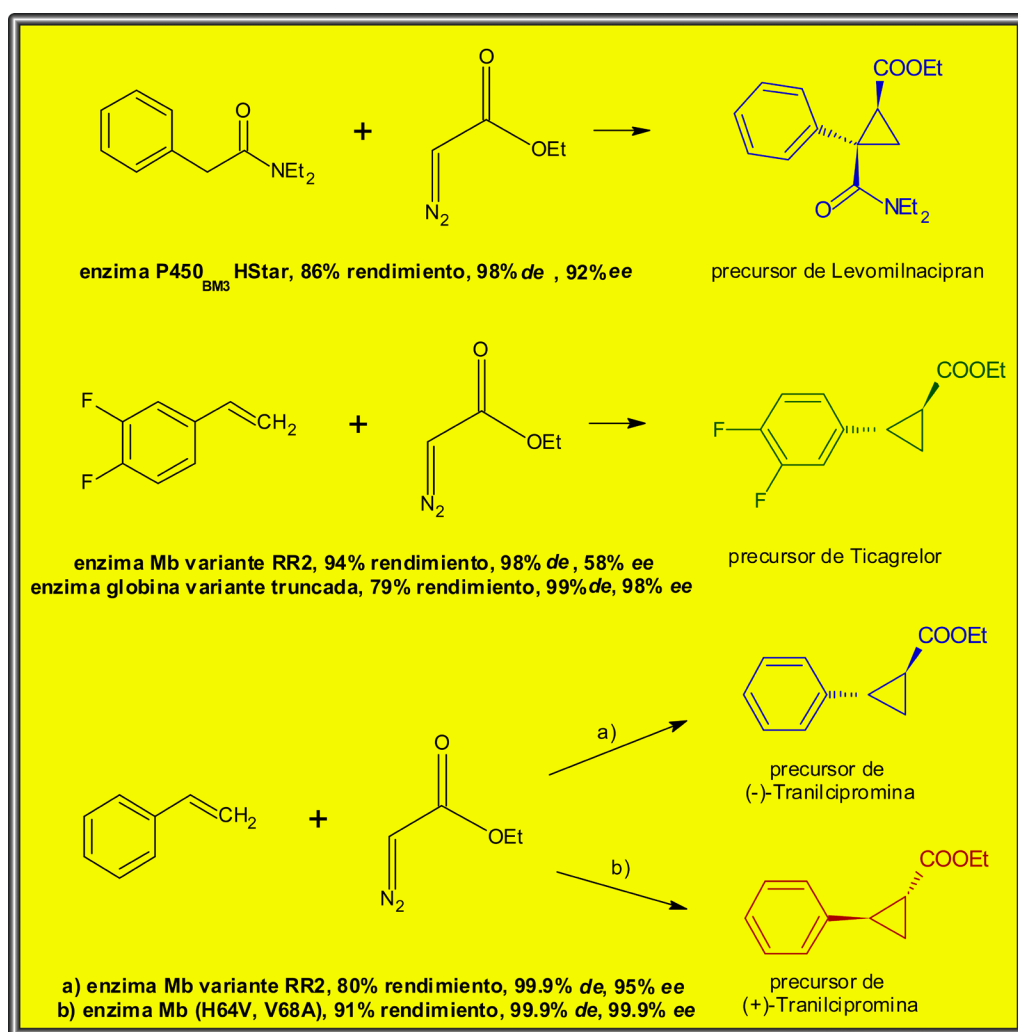


Figura 2. Algunos de los procesos sintéticos a escala preparativa catalizados por enzimas generadas por evolución dirigida. Estas reacciones de ciclopropanación son realizadas por enzimas P450 o mioglobina mutadas. Los productos son precursores de fármacos como el inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina Levomilnacipran. Pueden consultarse más reacciones en la referencia 8, de donde se han tomado estas.

que sea capaz de formarlos. Esto cambió hace apenas dos años, cuando se logró la inserción de carbenos de la misma manera que en el ejemplo anterior, pero esta vez en enlaces Si-H y B-H.^{9,10}

En un artículo publicado en *Science* en el 2016, Kan y colaboradores, luego de evaluar una población de enzimas y grupos hemo, descubrieron una pequeña proteína (de 124 aminoácidos) citocromo c (*Rma cyt c*) de la bacteria gram-negativa *Rhodothermus marinus* presente en las aguas termales de Islandia, que podía catalizar con baja eficiencia pero de manera enantioselectiva (97% ee), la reacción entre el fenil-

8. Brandenburg, O. F.; Fasan, R.; Arnold, F. H. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *47*, 102–111. (□)

9. Kan, S. B. J.; Lewis, R. D.; Chen, K.; Arnold, F. H. *Science* **2016**, *354* (6315), 1048–1051. (□)

10. Kan, S. B. J.; Huang, X.; Gumulya, Y.; Chen, K.; Arnold, F. H. *Nature* **2017**, *552* (7683), 132–136. (□)

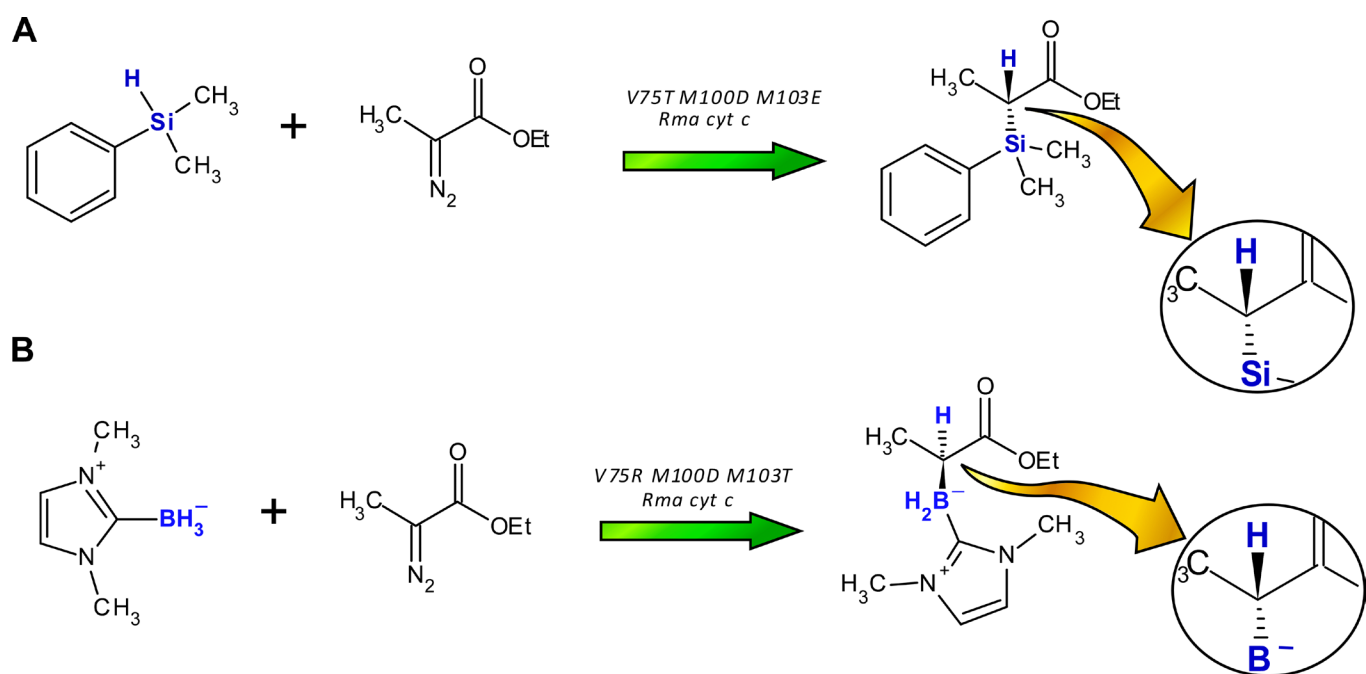


Figura 3. Ejemplos de nuevos enlaces Si-C y C-B catalizados por enzimas mutadas. **(A)** La enzima mutada *V75T M100D M103E Rma cyt c* cataliza la formación de compuesto de organosilicio con más de 2520 números de recambio (*turnover total number*, TTN) y una pureza enantiomérica mayor a 99 % ee (ver referencia 9). **(B)** La enzima mutada *V75R M100D M103T Rma cyt c* cataliza la formación de compuesto de organoboro con más de 2490 TTN y 99 % ee (ver referencia 10).

dimetilsilano y el etil-2-diazopropanoato para formar el compuesto quiral organosilicio R-2-(dimetilfenil(silil))propanoato de etilo mostrado en la Figura 3A.⁹ Aplicando la mutagénesis por saturación de sitio se modificó secuencialmente esta proteína en tres posiciones (M100, V75 y M103) hasta obtener el triple mutante *V75T M100D M103E Rma cyt c* que cataliza la reacción de formación del enlace quiral C-Si con altísima eficiencia, con un número de recambio (*turnover total number*, TTN) de 2520 y una pureza enantiomérica mayor a 99 % ee. Esta misma enzima, además, sirvió para catalizar la formación de otros 20 compuestos organosilicio con la misma enantioselectividad, mostrando su versatilidad, aunque con eficiencias variables, que van desde 47 hasta 8210 TTN. A pesar de ser un grupo de solo 20 sustratos, esto demostró la versatilidad de la enzima, y aún más importante, mostró ser quimioselectiva frente a otros grupos reactivos como el O-H, N-H o C=C presentes en la molécula.⁹ Una enzima mutante análoga a ésta, la *V75R M100D M103T Rma cyt c*, logró catalizar la formación de enlaces quirales C-B a partir de sustratos carbeno boranos N-heterocíclicos y diazoesteres (Figura 3B), exhibiendo una eficiencia de hasta 15 300 TTN, una frecuencia de recambio (*turnover frequency*, TOF) de 6 100 h⁻¹, 99% de pureza enantiomérica y 100 % de quimioselectividad en la generación de 16 compuestos organoboro.¹⁰

Recientemente, Cho y colaboradores reportaron la formación de unidades quirales 1,2 amino alcoholes a partir de la catálisis enzimática de alquenos siguiendo el modelo de la evolución dirigida. Nuevamente, la hemoproteína *Rma cyt*

c fue evolucionada en el laboratorio en siete posiciones para dar lugar a la variante *cyt c TQL* que logra esta conversión con un TTN de hasta 2500 y una pureza enantiomérica de hasta 90 % ee. Si bien existen múltiples rutas sintéticas para lograr este grupo funcional a partir del estireno u otros reactivos, el mérito de este estudio fue aportar el primer ejemplo de catálisis enzimática que permite la síntesis simple y en un solo paso de amino alcoholes desprotegidos, directamente desde alquenos.¹¹ La formación de enlaces C-C probó ser una tarea más difícil. El citocromo P450BM3 del *Bacillus megaterium* debió someterse a treinta y un ciclos de mutaciones y a la remoción de un dominio para dar lugar a la enzima mutada *P411-CHF* que permite la alquilación de enlaces C-H sp³ bencilicos con un TTN de hasta 2810 y con pureza enantiomérica de hasta 98% ee; esto sin requerir los costosos catalizadores de rodio e iridio necesarios para este tipo de transformaciones en la industria.¹²

En todos los casos descritos, los investigadores crearon situaciones no naturales al poner a disposición de las enzimas, sustratos que nunca han estado disponibles en el medio biológico en el que funcionan, como son los silanos, los boranos o los diazocompuestos. La “promiscuidad” de estas

11. Cho, I.; Prier, C. K.; Jia, Z.; Zhang, R. K.; Gçrbe, T.; Arnold, F. H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58*, 1–6. (□)

12. Zhang, R. K.; Chen, K.; Huang, X.; Wohlschlagler, L.; Renata, H.; Arnold, F. H. *Nature* **2019**, *565*, 67–72. (□)

enzimas fue aprovechada para evolucionar la pequeña actividad observada en la enzima nativa hasta lograr una enzima mutada que sea altamente funcional para este tipo de sustratos y condiciones. De esta manera la química sintética aplica su conocimiento a la maquinaria biológica, proporcionando los sustratos, condiciones y reacciones adecuadas en busca de una respuesta, por pequeña que sea, que permita ser evolucionada en el laboratorio.

dañan al primero seriamente. Esto, sumado al costo asociado, y a su espectro de aplicabilidad en sustratos aun relativamente pequeño, podría asegurar que la química sintética mantendrá aun por algunos años, su hegemonía en la industria.

Recibido: 21 de noviembre de 2018
Aceptado en forma final: 25 de enero de 2019

¿ES EL FIN DE LA QUÍMICA SINTÉTICA?

Podría parecer que estos resultados pronostiquen el final de la química sintética, pero personalmente no creo que sea así. El ambiente sintético siempre será mucho más simple que un medio biológico, y nos permitirá estar en control de las variantes que afectan a una reacción. En el control que ejercemos dentro del balón de reacción podremos seguir experimentando, variando condiciones y sustratos, y tendremos a nuestra disposición técnicas espectroscópicas que nos permitirán racionalizar los productos obtenidos, los mecanismos seguidos, y los resultados de las condiciones de reacción usadas. Este *know-how* adquirido en el mundo sintético es primordial para ser aplicado en el diseño y la evaluación de enzimas modificadas, tal como fue descrito anteriormente. Adicionalmente, las enzimas no han desplazado por completo a los catalizadores metálicos pues mantienen problemas pendientes, como el carecer de control de reacciones paralelas entre el centro activo con especies intermedias reactivas, que

BIBLIOGRAFÍA ESENCIAL

Renata, H.; Wang, Z. J.; Arnold, F. H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (11), 3351–3367. (📄)

Packer, M. S.; Liu, D. R. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16* (7), 379–394. (📄)

Bornscheuer, U. T.; Hauer, B.; Jaeger, K. E.; Schwaneberg, U. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58*, 36–40. (📄)

Jimenez, A.; Miriam, R.; Merino, V. F. *Mol. Biotechnol.* **2018**, *60* (12), 946–974. (📄)