Freedom para evolucionar

Investigadores de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) están desarrollando nuevas enzimas mediante técnicas de evolución molecular dirigida, para su aplicación en nuevos bioprocesos. Aprovechando las prestaciones para el manejo automatizado de líquidos de una estación de trabajo Freedom EVO® 75, el Grupo de Biotecnología Enzimática de la UCM –dirigido por la Dra. Isabel de la Mata– ha podido analizar la actividad penicilina acilasa y N-acil homoserin lactona acilasa de ~4.000 mutantes de* Rhodococcus *recombinantes, realizando más de 190.000 ensayos solo en la fase de análisis primario.

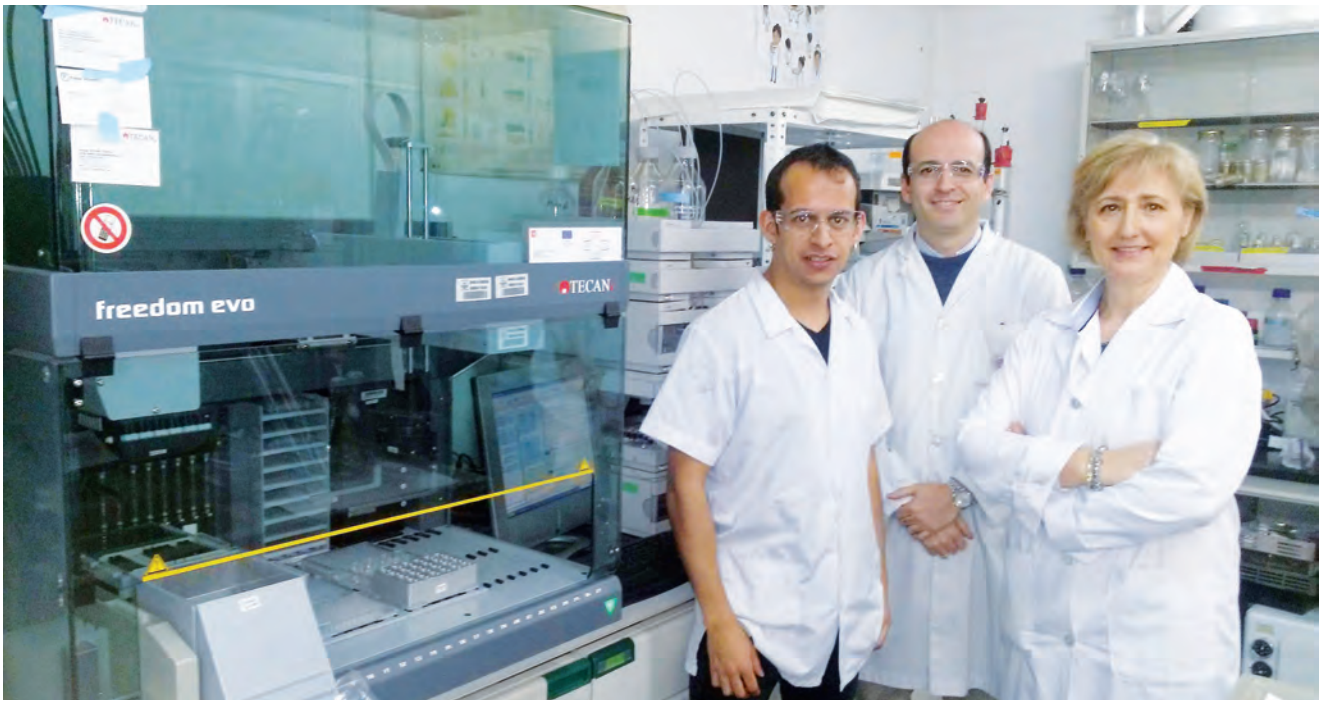
El Grupo de Biotecnología Enzimática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, España, investiga desde hace más de 30 años las aplicaciones industriales de las enzimas. Una de las áreas actuales de investigación del grupo es la investigación de enzimas con posibles aplicaciones en la síntesis de agentes terapéuticos, tal como explicó la Dra. de la Mata: "Estamos interesados en enzimas con nuevas actividades para su utilización en la producción de nuevos agentes antibacterianos, como antibióticos beta-lactámicos semisintéticos con propiedades mejoradas, para superar los mecanismos de resistencia, cada vez más prevalentes en los patógenos nosocomiales. También utilizamos esta estrategia para desarrollar nuevos agentes antifúngicos, como las equinocandinas, dado que en la actualidad se dispone de un escaso número".

"Utilizamos técnicas de evolución dirigida para obtener enzimas mutantes con propiedades catalíticas mejoradas como amplia especificidad de sustrato o mayor actividad de la enzima objetivo, al igual que su estabilidad en condiciones ambientales diferentes, como la variación del pH o la temperatura o la presencia de solventes orgánicos. El éxito de estos métodos de evolución molecular depende de la habilidad para analizar un número elevado de mutantes y, por consiguiente, precisábamos de un sistema de expresión microbiano que fuera estable y permitiera el análisis y cribado masivo de los mutantes generados (High-Throughput Screening-HTS). Lamentablemente,las enzimas que estudiamos no pueden expresarse en *E. coli,* sis-

Freedom to evolve

Researchers at the Complutense University of Madrid are using directed evolution techniques to develop new enzymes for a variety of bioprocessing applications. Taking advantage of the walkaway liquid handling capabilities of a Freedom EVO® 75 workstation, the university's Enzyme Biotechnology Group –headed by Dr Isabel de la Mata– has been able to investigate ~4,000 Rhodococcus *mutants for penicillin acylase and N-acyl homoserine lactone acylase activity, conducting over 190,000 assays in the primary screen alone.*

© 2016 kdm communications limited
(Contacto en Tecan: Florence Collins)



De izquierda a derecha: Rodrigo Velasco, Miguel Arroyo e Isabel de la Mata con la estación de trabajo Freedom EVO 75 del grupo.

tema de expresión comúnmente utilizado, ya que las bacterias productoras son actinomicetos y presentan diferente uso de codones, por lo que para su producción tuvimos que desarrollar un sistema alternativo utilizando la cepa de Rhodococcus sp T104. Es mucho más difícil trabajar con *Rhodococcus* que con *E. coli*, sin embargo, utilizando nuestra plataforma Freedom EVO 75, hemos podido desarrollar un método de ensayo de cribado masivo para analizar los mutantes en un formato de microplaca de 96 pocillos."

La plataforma Freedom EVO 75 del grupo está equipada con un brazo 8 Plus 1 Access™, una incubadora MIO™ y dispositivos de temperatura controlada para las placas de ensayo y los reactivos que permiten efectuar automáticamente el procesamiento y obtener resultados reproducibles. Rodrigo Velasco, estudiante de doctorado del grupo, comentó: "Gracias a las prestaciones de alto rendimiento de la plataforma Freedom EVO, cada muestra se puede someter simultáneamente a ensayos en condiciones de operación diferentes, lo que a su vez sería muy complejo y difícil de realizar de forma manual. Esto proporciona información inestimable que nos facilita el diseño de las fases subsiguientes de la investigación."

La Dra. de la Mata agregó: "Utilizando la plataforma Tecan, hemos podido desarrollar un método de análisis colorimétrico de cribado masivo de alto rendimiento (HTS) para identificar, por ejemplo, nuevas especificidades de las acilasas. En el primer ciclo de análisis estudiamos más de 4.000 clones individuales, cada uno de los cuales se analizó por duplicado, considerando una variedad de condiciones: dos valores de pH, dos temperaturas y siete sustratos diferentes. Este diseño experimental generó más de 190.000 ensayos individuales, lo que hubiese sido imposible de realizar de forma manual, sin embargo, utilizando la plataforma Freedom EVO, ¡pudimos procesar las muestras en menos tiempo que el que necesitamos para analizar los resultados! Con el análisis primario obtuvimos varios candidatos prometedores con características de interés para su aplicación biotecnológica con los que generamos una segunda colección de mutantes para analizar. Tras este segundo ciclo de análisis en el que llevamos a cabo alrededor de 27.000 ensayos, hemos obtenido varios biocatalizadores altamente eficaces que estamos caracterizando, todo esto dos años después de haber iniciado el proyecto."

"¡Pudimos procesar las muestras en menos tiempo que el que necesitamos para analizar los resultados!"

"Estamos muy satisfechos con el rendimiento de la estación de trabajo Freedom EVO y la asistencia que hemos recibido de Tecan. Este tipo de proyectos simplemente no habría sido posible de realizar de forma manual y la asistencia técnica ha sido excelente", concluyó la Dra. de la Mata.