

## FARMACOLOGÍA

# ENZIMAS MICROBIANAS PARA PRODUCIR MOLÉCULAS CON POTENCIAL USO TERAPÉUTICO, EL CASO DEL XILITOL

John Segura Vílchez\*  
Ramiro Navarrete Coronado\*\*

## SUMMARY

As part of the search of compounds with possible therapeutic potential and commercial use, stand out those that are produced by microorganisms. Enzymes are macromolecules with specific biochemical activities, both prokaryotes and unicellular eukaryotes possess specialized enzymes which can degrade complex substrates such as of vegetable origin to obtain molecules that can integrate their metabolism. Xylitol is a current example of a multi-purpose therapeutic substance that can improve the quality of life for many people. This alcohol has been obtained by

microbial metabolism under controlled conditions, but the maximization of its collection and production remains as a source of hard scientific work.

## INTRODUCCIÓN

La actividad fotosintética de la biosfera produce alrededor de  $1,2 \times 10^{11}$  toneladas anuales de biomasa vegetal, de las cuales, más del 80% es lignocelulosa. De esta biomasa, el 89% no se utiliza y del resto que entra en el procesamiento de fibras, combustibles y alimento humano, se pierde un 70%. A través de tratamiento biológicos (microbianos o enzimáticos) es

posible obtener moléculas básicas útiles como punto de partida para producir otras sustancias importantes, ya sea por vía química o por vía microbiológica. Los monosacáridos recuperados de la hidrólisis ácida o enzimática de material lignocelulósico y de otras macromoléculas (almidón, por ejemplo) servirían de nutrientes en fermentaciones para la producción de sustancias tales como aminoácidos, ácidos orgánicos y fármacos.<sup>5</sup>

## ENZIMAS DE ORIGEN MICROBIANO

Los microorganismos están

\* Microbiólogo Químico Clínico. Magíster en Administración de Servicios de Salud. Correspondencia: jsegurav@ccss.sa.cr

\*\* Microbiólogo Químico Clínico. Especialista en Inmunoematología y Banco de Sangre. Laboratorio Clínico, Hospital San Vicente de Paúl.

especializados en descomponer todos los sustratos conocidos; este proceso evolutivo ha resultado en la producción de moléculas con actividad catalítica adaptada al sustrato, estabilidad molecular, eficiente procesamiento intracelular, y en un mecanismo para el transporte fuera de la célula de enzimas extracelulares.<sup>3</sup> Las enzimas obtenidas de microorganismos pueden ayudar a realizar cambios en pasos de síntesis de fármacos, para incrementar diversidad de estructuras que son hasta hoy accesibles a los métodos tradicionales de fabricación.<sup>4</sup> Toda esta capacidad de adaptación, ha causado que los microorganismos sean la fuente primaria de enzimas de uso industrial.<sup>13</sup> El principal grupo utilizado es el de las proteasas obtenidas de bacterias (55%), seguidas de hidrolasas de carbohidratos (20%) tanto de bacterias como de hongos.<sup>16</sup> Por lo tanto implicadas en procesos de síntesis y degradación de sustancias.

Cerca de 100 tipos de enzimas se usan en la industria, la mayoría son de tipo hidrolítico (75%) las cuales se utilizan para la despolimerización de sustratos naturales con alto peso molecular: proteínas, almidones, pectinas, entre otros.<sup>16</sup> Algunas de las áreas más importantes de aplicación industrial con enzimas de origen microbiano son: detergentes,

combustibles, industria alimentaria, bebidas, nutrición animal, textiles, producción de papel, grasas y aceites, síntesis orgánica, farmacéutica, cueros y cuidado personal.<sup>16</sup> Las enzimas usualmente requieren de cofactores o grupos prostéticos, un cofactor es un compuesto no proteico, el cual se combina con una enzima inactiva y permite su activación; los cofactores pueden ser metales tales como  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Co^{+}$ , y  $Cu^{++}$  y moléculas orgánicas tales como Nicotidamina Dinucleótido de Adenina (NAD) y Flavina Dinucleótido de Adenina (FAD). Algunos iones metálicos actúan luego de unirse a sitios específicos de la molécula de la enzima, lo cual permite una estabilización de la forma activa de la enzima, también pueden funcionar para el transporte de electrones, en reacciones de tipo redox, específicamente el  $Cu^{++2}$ . Aproximadamente un 70% de todas las enzimas requieren de nucleósidos trifosfatados, derivados de nicotinamida o coenzima A; estos cofactores son muy caros como para ser utilizados estequiométricamente, pero existen aplicaciones y métodos para propiciar su regeneración *in situ*.<sup>17</sup> En las enzimas que requieren nucleósidos trifosfatados, la regeneración de estos a partir de las correspondientes formas difosfatadas se logra al utilizar donadores de grupos fosfato

tales como el acetyl fosfato y fosfoenolpiruvato, a través de las enzimas acetato quinasa y piruvato quinasa respectivamente, las cuales aceptarán GTP, UTP y CTP así como desoxinucleósidos trifosfatados como dATP, dGTP, dUTP y dCTP. La adenilato quinasa cataliza la conversión de AMP a ADP, desafortunadamente esta quinasa es específica para AMP y no acepta XDP (X=U, G, C), al momento no existe un esquema de regeneración práctico de estos monofosfatos a trifosfatos.<sup>17</sup> Los esquemas de regeneración de ATP han sido aplicados a la síntesis de azúcares fosfatados, dihidroxiacetona fosfato y glicerol 3-fosfato; la síntesis de  $NAD^{+}$ , 1,5-difosfato ribulosa y fosfo-ribosil pirofosfato (PRPP), llaves intermedias en la biosíntesis de nucleótidos representan ejemplos más complejos.<sup>17</sup> En contraste con los nucleósidos trifosfatados la regeneración de cofactores de nicotinamida es más difícil, porque ambos compuestos son más caros y son intrínsecamente inestables en solución como cuando se usan en soluciones como oxidante  $NAD(P)$ , entonces la inhibición por producto puede representar un problema severo en dicho sistema. Para la regeneración de  $NADH$  a partir de  $NAD^{+}$  existen tres sistemas prácticos: formato-formato deshidrogenasa, glucosa-glucosa deshidrogenasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.<sup>17</sup> La

regeneración *in situ* de NAD<sup>+</sup> ha sido alcanzada en la mayoría de los casos con un sistema de re-oxidación no enzimática, al tratar el NADH con flavina oxidada, este proceso ha sido útil en la preparación de lactosas quítales a partir de dioles meso; las desventajas de este sistema son las grandes cantidades requeridas de flavina, la baja tasa de reacción y el requerimiento de exposición de la enzimas a oxígeno; probablemente una de las mejores alternativas propuestas se basa en la conversión del cetoglutarato y amonio a ácido glutámico a través de la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>.<sup>17</sup> Algunas enzimas requieren de otros cofactores como el 5'-fosfosulfato de 3'-fosfoadenosina, importante en sulfataciones; otro ejemplo es la S-adenosilmetionina el cual actúa como donador de un grupo metilo.<sup>17</sup> Muchas enzimas no requieren de cofactores, generalmente tienen rápida disponibilidad, alta estabilidad, son baratas y simples de utilizar; representan el grupo más utilizado industrialmente, se usan en aplicaciones a gran escala y probablemente representan el primer grupo de biocatalizadores en los repertorios planteados por los químicos orgánicos.<sup>17</sup>

## EL CASO DEL XILITOL

La xilosa es el segundo carbohidrato de mayor abundancia en las plantas terrestres,

usualmente se encuentra en las plantas angiospermas en forma de xilano (polisacárido compuesto por unidades de xilosa), uno de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica, contribuyendo en un 15–30% del total de peso seco y menos abundante en las plantas gimnospermas las cuales contienen 7–12% .<sup>1, 8</sup> Recientemente ha tomado mucho interés industrial el xilano y el complejo enzimático que lo degrada como suplemento en alimentos para animales, manufactura de pan, alimentos, bebidas, textiles, blanqueamiento de pulpa de celulosa, producción de etanol y del xilitol por lo que se ha descrito la expresión heteróloga del gen *xyn A*, el cual codifica por la endoxilanasas de *Bacillus* y *Saccharomyces cerevisiae*, así como el clonaje y expresión de genes de endoxilanasas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus kawachii*.<sup>12</sup> El xilitol se puede encontrar naturalmente en plantas, hongos, microorganismos y el cuerpo humano, en donde el hígado sintetiza de 5–15 g de xilitol diariamente.<sup>10</sup> El xilitol ha sido manufacturado a escala industrial por la reducción química de la xilosa, la cual se obtiene a partir de la hidrólisis del xilano presente en pulpa de madera para la producción de papel, otros árboles de maderas duras, vainas de flores de algodón, bagazo de caña de hidrolizados hemicelulósicos; el proceso químico no es un

método costo-efectivo para la producción en masa del xilitol por el alto costo que requiere la purificación del xilitol de otros polioles y azúcares que puedan estar presentes en la mezcla de reacción.<sup>9, 15</sup> Muchas especies de *Candida* pueden tomar la xilosa por un transportador específico (por difusión facilitada o ingreso dependiente de protones), la producción de xilitol se ha descrito en cepas específicas de *C. milleri*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*.<sup>7, 15</sup> El rendimiento de la producción de xilitol tiende a ser bajo debido a la fermentación natural de la xilosa por parte de algunas levaduras para su crecimiento y metabolismo endógeno; se ha estudiado el efecto de factores como el de la edad del inóculo y la presencia de otros compuestos tales como la glucosa, ácido acético y furfural en la conversión de la xilosa en xilitol.<sup>15</sup> Resalta contradictorio el uso de *C. albicans* en la producción de xilitol dada su naturaleza patogénica, por lo que se han utilizado cepas recombinantes de *S. cerevisiae*.<sup>7</sup> La xilosa puede ser convertida en xilitol en una reacción enzimática de un paso, catalizada por la xilosa reductasa; debido a que esta enzima requiere NADPH como cofactor, la conversión de la xilosa en xilitol se torna dificultosa (por la no regeneración del cofactor), como ejemplo se ha documentado la xilosa reductasa de *C. parapsilosis* la cual posee

una afinidad por el NADH 100 veces mayor sobre el NADPH (con base en la relación de eficiencia catalítica  $k_{cat}/K_m$ ), la abundancia del conocimiento respecto a la bioquímica y estructura de la xilosa reductasa de *C. tenuis* se ha utilizado para diseñar mutantes con especificidad de cofactor alterada, lo cual podría eventualmente beneficiar algunas condiciones que permitan un aumento en los rendimientos de producción de xilitol.<sup>6, 10</sup> Las levaduras en las cuales el xilitol es transformado por la xilosa isomerasa hasta xilulosa, esta puede ser fosforilada por la xilulosa quinasa y entrar a la vía de las pentosas fosfato como xilulosa-5-fosfato; la vía de las pentosas fosfato es la principal fuente de NADPH (cofactor para la obtención de xilitol) además de generar intermediarios para la producción de energía y biosíntesis. Debido a que toda cepa silvestre de *S. cerevisiae* carece de la xilosa isomerasa, se han utilizado cepas de modificadas genéticamente con el gen de la xilosa reductasa (*XYL1p*) lo cual ha permitido una eficiente conversión de la xilosa en xilitol con rendimientos de hasta un 95%.<sup>6, 10, 11</sup> El xilitol es un polialcohol de cinco carbonos con un poder endulzante comparable al de la sacarosa, actualmente existe una gran variedad de productos comerciales los cuales contienen xilitol, tales como gomas de mascar, confites, bebidas livianas

y helados, entre otros; el xilitol es un edulcorante no cariogénico ya que las bacterias que normalmente habitan la boca no pueden metabolizarlo, tiene la propiedad de generar una sensación de enfriamiento al sentido del gusto, se ha documentado como un sustituto del azúcar común ideal para el mantenimiento de pacientes con diabetes y personas obesas precisamente porque su absorción celular no es dependiente de insulina; se ha utilizado en soluciones parenterales, ha sido recomendado para la prevención de la osteoporosis e infecciones del tracto respiratorio; coadyuvante en desórdenes del metabolismo lipídico y lesiones en riñón y en pacientes con deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocítica.<sup>9, 10, 12, 14</sup> El desarrollo de tecnologías más apropiadas para la producción de xilitol que la catálisis química de la xilosa por hidrogenación en presencia de un metal bajo condiciones extremas, ha generado mayor esperanza en cuanto a ampliar su uso en la industria alimentaria, farmacéutica y odontológica.<sup>10, 12</sup>

## CONCLUSIONES

En la descomposición de diversos sustratos que realizan los microorganismos mediante moléculas con actividad catalítica para obtener moléculas más simples; es importante comprender

que ellas están teniendo un gran auge en el desarrollo de nuevos compuestos que pueden mejorar la calidad de vida de las personas desde el contexto cotidiano hasta procesos de seguimiento, mantenimiento y control de diversos estados clínicos. Es muy importante realizar estudios descriptivos de poblaciones microorganismos unicelulares con eventual actividad de degradación de sustratos para la eventual obtención de compuestos con potencial terapéutico como el xilitol. El desarrollo de estrategias para la producción o recuperación de compuestos derivados del metabolismo microbiano, cualquiera que sea su uso, es muy importante en el marco del paradigma del desarrollo sostenible, ya que se fortalece de tecnologías amigables con el medio ambiente y promueve el avance de nuevas tendencias desde el punto de vista farmacológico para la realización de eventuales ensayos clínicos.

## RESUMEN

En el marco de la búsqueda de compuestos con eventual potencial terapéutico y de uso comercial, se destacan aquellos producidos por microorganismos. Las enzimas son macromoléculas con actividades bioquímicas específicas; los procariotas y eucariotas unicelulares poseen

enzimas especializadas y a partir de ellas, pueden degradar sustratos complejos, como los de origen vegetal, para obtener moléculas que pueden integrar a su metabolismo. El xilitol es un ejemplo actual de una sustancia con múltiples usos incluso de tipo terapéutico que puede mejorar la calidad de vida de muchas personas, este alcohol se ha estado obteniendo mediante el metabolismo microbiano en condiciones controladas, pero la maximización de su obtención y producción sigue siendo una fuente de arduo trabajo científico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arce, L. 2004. Evaluación de la producción de xilitol a nivel de laboratorio, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial. Proyecto de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Tesis no publicada. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Escuela de Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica-Sede Rodrigo Facio, San José. Costa Rica.
2. Aslam, M., Paul-Torrence, G. & Zey E. 2005. Enzyme Applications. En: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. (5th Ed.), (pp 249, 250, 253 y 278). United States of America: Wiley-Interscience. John Wiley & Sons, Inc.
3. Blanco, J. 2004. Análisis de la actividad enzimática de aislamientos bacterianos obtenidos de diferentes estadios del ciclo de vida y materiales relacionados a *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera: Saturniidae). Trabajo Final de Graduación modalidad Investigación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Tesis no publicada. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica-Sede Rodrigo Facio, San José. Costa Rica.
4. Caporale, S. 1995. Chemical ecology: A view from pharmaceutical industry. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. (92), 75-82.
5. Cunningham, R. & López, G. 2004. Etanol de lignocelulósicos, tecnologías y perspectivas. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Universidad de Santiago de Compostela-Santiago. Chile.
6. Ehrensberger, A., Elling, R. & Wilson, D. 2006. Structure-Guided Engineering of Xilitol Dehydrogenase Cosubstrate Specificity. *Structure*. (14), 567-575.
7. Ganström, T. 2002. Biotechnological production of xylitol with *Candida* yeasts. Dissertation for the degree of Doctor in Philosophy. Tesis no publicada. Helsinki University of Technology. Finland.
8. Kang, M., Ni, H. & Jeffries, T. 2003. Molecular Characterization of a Gene for Aldose Reductase (CbXYL1) from *Candida boidinii* and Its Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (105-108), 265-276.
9. Kim, Y., Kim, S., Kim, J. & Kim, S.C. 1999. Xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing multiple xylose reductase genes at chromosomal  $\delta$ -sequences. *Journal of Biotechnology*. (67), 159-171.
10. Lee, W., Ryu, Y. & Seo, J. 2000. Characterization of two-substrate fermentation processes for xilitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. *Process Biochemistry*. (35), 1199-1203.
11. Leitgeb, S., Petschacher, B., Wilson, D. & Nidetzky, B. 2005. Fine tuning of coenzyme specificity in family 2 aldoketo reductases revealed by crystal structures of the Lys-27→Arg mutant of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) bound to NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup>. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. (579), 763-767.
12. Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J. & Amorim, D. 2005. Mini Review. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (67), 577-591.
13. Rolfe, R.S. 1998. Enzyme applications for agro-processing in developing countries: an inventory of current potential applications. *World J. Microbiol. Biotech.* (14), 611-619.
14. Silva, S.S., Chanto, Q.A., Vitolo, M., Felipe, M. & Mancilla, I. 1999. Preliminary Information About Continuous Fermentation Using Cell Recycling for Improving Microbial Xilitol Production Rates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (77-79), 571-575.
15. Silva, S.S., Quesada-Chanto, A. & Vitolo, M. 1997. Upstream Parameters Affecting the Cell Growth and Xylitol Production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. (52c), 359-363.
16. Uhlig, H. (2003). Enzymes. En: Ullmann's Encyclopedia of Chemical Chemistry. (6th Ed.), (pág. 108). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA. Federal Republic of Germany.
17. Waldmann, H. y Whitesides, G. 2003. Industrial Uses of Enzymes. En: Ullmann's Encyclopedia of Chemical Chemistry. (6th Ed.), (pp. 153-155). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA. Federal Republic of Germany.