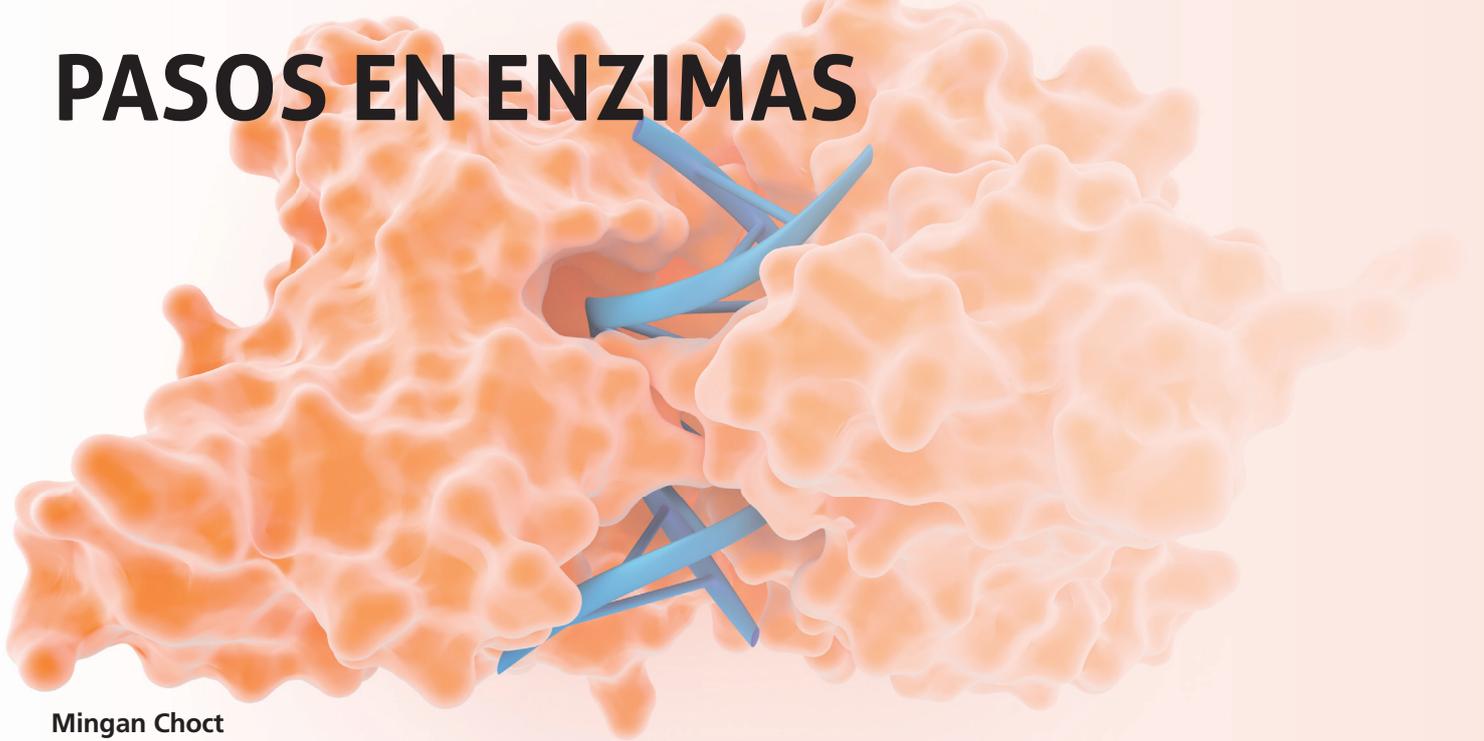




# LOS PRÓXIMOS GRANDES PASOS EN ENZIMAS



Mingan Choct

*21st Symp. of Poultry Nutrition. Salou/Vila-seca, mayo 2017*

## Resumen

Esta breve revisión pretende discutir sobre las oportunidades y los retos en torno a las aplicaciones de la xilanasas en las dietas de las aves. El tema incluye pero no está necesariamente limitado a lo relacionado con la actividad enzimática y el rendimiento de las aves, aclarar el papel de los subproductos de hidrólisis en la salud intestinal y la nutrición y la manipulación de los procesos anatómicos y fisiológicos de las aves para mejorar la eficacia de las enzimas existentes. Además, se hacen algunas especulaciones sobre la búsqueda de nuevos usos de las proteasas, como es la desactivación de los anti-nutrientes en la alimentación.

Una mayor investigación sobre la caracterización del sustrato subraya futuros avances en las aplicaciones enzimáticas.

## Introducción

En las últimas tres décadas las enzimas se han convertido en un aditivo imprescindible en la alimentación de los monogástricos. Las enzimas utilizadas habitualmente son fitasas y glucanasas aunque en los últimos años también ha aumentado el uso de proteasas. El empleo de fitasa es generalizado por entenderse bien su mecanismo de acción y aceptarse ampliamente sus ventajas prácticas... Por lo tanto, este trabajo se centra en nuevas formas de aplicación de las xilanasas y proteasas en las dietas de las aves.

## Las xilanasas y sus sustratos

Los sustrato de las xilanasas son xilanos, el segundo más abundante grupo de polisacáridos en la naturaleza. En la alimentación son responsables del 50-70% de los polisacáridos no amiláceos - NSP - presentes en los granos de los cereales.

Los xilanos se refieren a una gran cantidad de polisacáridos que tienen una base de 1,4 residuos enlazados de xilosa. En los granos de cereales a menudo se conocen como arabinoxilanos o pentosanos, que tienen variables proporciones de xilanos substituido con  $\alpha$ -L-arabinofuranosa en las posiciones O-2 y O-3. En cambio, los xilanos de la madera tienen sus unidades - D-xilopironosa substituidas en las posiciones C-2 por residuos 1,2- ligados a 4-O - metil de residuos de ácido glucurónico.

***“Las enzimas se han convertido en un aditivo imprescindible en la alimentación de los monogástricos”***

Hay una amplia gama de variación en las estructuras de los xilanos y sus funciones. Las diferencias simples son: a) el peso molecular y la relación arabinosa y xilosa, indicando esta última la variación en el grado de sustitución de cadenas laterales de arabinosa y b) la solubilidad y la viscosidad, donde un xilano debe ser



soluble para ser viscoso, pero no necesariamente todos los xilanos solubles lo son - Bedford y Classen, 1992 -, pero no los del arroz - Smits y Annison, 1996 -. Hay muchas variaciones complejas entre los xilanos. Pueden tener cadenas laterales diferentes con respecto a la composición del azúcar y los tipos de acoplamiento, pueden ser parcialmente metilados o acetilados o esterificados y pueden estar cruzados con otros componentes de la pared celular. Voragen y col. - 1992 - los clasifican en las siguientes familias, sobre estas bases:

- Sólo tienen cadenas laterales de una unidad terminal de  $\alpha$ -L-arabinofuranos y l sustitutos - como antes se ha descrito para los arabinoxilanos en los granos de cereales.
- Sólo tienen ácido  $\alpha$ -D-glucurónico o su derivado 4-O-metil éter como sustitutos.
- Tienen ácido  $\alpha$ -D glucurónico - y 4-O-metil- $\alpha$ -Dglucurónico - y  $\alpha$ -L-arabinosa como substitutos.
- Tienen residuos terminales de  $\beta$ -D-galactopiranos sobre complejas cadenas laterales de oligosacáridos. Tales xilanos se encuentran típicamente en plantas perennes.

### **“Hay una amplia gama de variación en las estructuras de los xilanos y sus funciones”**

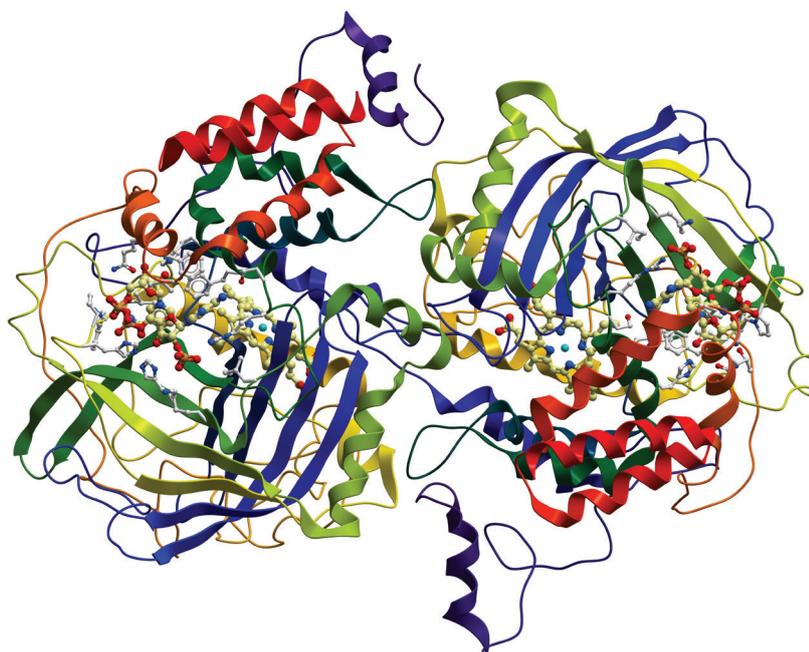
Estas variaciones significan que requieren diferentes xilanasas para aser desbloqueadas. Las xilanasas se clasifican en familias de hidrolasas glucósido - GH - basadas en las similitudes de sus secuencias de aminoácidos - Coutinho y Henrissat, 1999 -. A partir de

enero de 2017 hay al menos 141 familias de GH registradas en el sitio CAZY ([https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Families](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Families)). La exploración comercial para xilanasas se ha enfocado principalmente sobre endoxilanasas GH10 y 11 - -1,4-endoxilanasas; EC 3.2.1.8 -, aunque una fuerte actividad xilanasas también se ha caracterizado en GH5, 7, 8 y 43 - Collins y col., 2005 -. Las dos xilanasas GH 10 y 11 actúan sobre los enlaces glucosídicos en el centro de la columna vertebral de xilano. La mayoría de xilanasas comerciales pertenecen a este grupo y reducen la viscosidad y/o rompen la arquitectura celular. Sin embargo, no todas las endo-xilanasas actúan de la misma forma. La mayoría de las GH 11 xilanasas solo atacan la columna vertebral de xilano en las secuencias ininterrumpidas - Gruppen y col., 1993 - mientras que las GH 10 son más versátiles y pueden unirse a los enlaces adyacentes a las cadenas laterales - Biely y col., 1997 -. Además, hay endoxilanasas que tienen afinidad con xilanos solubles o insolubles - Moers y col. 2005 - y también otras enzimas degradantes de xilanos, a saber -1,4-xilosidasas - EC 3.2.1.37 - y exoxilanasas, que retiran residuos sucesivos de D-xilosa de la terminación no reductora de los xilanos o los xilo-oligómeros. Este grupo de xilanasas no se emplea habitualmente en la alimentación.

De hecho, la multiplicidad y la heterogeneidad de la enzima - xilanasas - y el sustrato - xilano - plantean el mayor reto para el próximo avance de la industria de las enzimas.

### **Retos actuales de las xilanasas**

En los últimos treinta años ha habido tremendos avances en la aplicación de xilanasas, en cuanto a su rendimiento, estabilidad y actividad.





## “En los últimos treinta años ha habido tremendos avances en la aplicación de xilanasas, en cuanto a su rendimiento, estabilidad y actividad”

Sin embargo quedan significativas oportunidades y retos para la industria de las xilanasas, como son las consideraciones que exponemos seguidamente.

**1. Relación entre la actividad xilanasa y el rendimiento de las aves.** Con o sin razón, algunos investigadores y los usuarios finales conceden una gran importancia a la actividad enzimática.

Esto es comprensible porque un primer paso para saber si un producto será beneficioso para el rendimiento del ave es conocer si la enzima es activa. Hay dos métodos principales para medir la actividad xilanasa, el del azúcar reductor y el ensayo de liberación de tinte. El primero abarca realidad dos ensayos, el 3,5 ácido dinitrosalicílico – DNS – método reductor del azúcar - Sumner, 1925; Miller, 1959 -, y el Nelson-Somogyi – Nelson, 1944; Somogyi, 1952 -, basado en una tableta de técnica cromogénica - McCleary, 1992 -.

Ha habido mucha discusión sobre estos métodos - Bailey y col., 1992; McCleary y McGeough, 2015 -. Pero ninguno de ellos significaría mucho si se quisiera utilizar la actividad enzimática como medida de liberación de nutrientes - Ravindran, 2013 - porque no siempre cuanto más alta sea ésta mejor será el rendimiento de las aves. Los problemas están relacionados con la dificultad en: a) entender el sustrato y sus efectos sobre el rendimiento del ave; b) cuantificar el mecanismo clave por el que el sustrato afecta al rendimiento; c) probar el efecto de la enzima relevante bajo condiciones normales de alimentación y crianza. Por tanto, un ensayo de actividad de la enzima prácticamente relevante tendrá que esperar más trabajos sobre la caracterización del sustrato.

**2. Sintonía de los productos de hidrólisis de xilanasas.** Las formas de acción de las xilanasas en cuanto a la especificidad del sustrato, la afinidad de éste y los tipos de subproductos de hidrólisis que se liberan *in situ* no se entienden del todo. Sin embargo, se sabe que distintas xilanasas liberan diferentes cantidades y tipos de moléculas de carbohidratos, como monómeros, oligómeros y otros xilanos de bajo peso molecular. Los papeles de los productos de hidrólisis, xilo-oligosacáridos - XOS - o arabinoxilo-oligosacáridos - AXOS - en los seres humanos - Childs y col., 2014; Lin y col., 2016 - y en las aves - Pourabedin y col., 2015 - se han convertido en una interesante área de desarrollo. De hecho, los XOS parecen ser únicos prebióticos y sus efectos incluyen la optimización de la función del colon un au-

mento o un cambio en la composición de los ácidos grasos de cadena corta - SCFAs -, un aumento de la absorción mineral, una estimulación inmunitaria y un aumento de la longitud del villus ileal - Kim y col., 2011 -. El empleo de XOS en la dieta de las aves parece ser especialmente beneficioso para la microflora intestinal productora de butirato - De Maesschalck y col., 2015 - al demostrar una mejora del rendimiento de las aves, tal vez como consecuencia de la mayor disponibilidad de éste por las células epiteliales y, por tanto, de la integridad epitelial con un producto conteniendo el 35% de XOS, con longitudes de cadena de 2 a 7 y el 65% of maltodextrina. Por tanto, será importante llevar a cabo estudios para examinar las moléculas XOS individuales en una forma más pura.

La mayor parte de xilanasas comerciales pueden producir una gama de fragmentos de xilanos de bajo peso molecular, como xilobiosa, xilotriosa, xilotetrosa y otras numerosas moléculas - Morgan y col., 2017 -. Los tipos de XOS producidos dependen del sustrato, la xilanasa y el entorno intestinal del ave. Así, hay interés en examinar varias xilanasas a partir de: a) la afinidad y especificidad de sustratos solubles e insolubles y las cantidades y tipos de xilanos producidos de bajo peso molecular; b) las características partidoras de la cadena lateral y c) el sitio más efectivo de liberación de XOS en el tracto gastrointestinal de los animales. El empleo de xilanos insolubles como materia prima para una producción de XOS *in situ* requerirá un cambio importante en la forma de pensar en la producción de xilanasas. Esto es debido a que, tradicionalmente, las xilanasas se proporcionan principalmente por despolimerización de xilanos solubles a fin de reducir los efectos negativos de la viscosidad de la digesta sobre la digestión y la absorción. Ha habido mucho debate sobre el efecto de “encapsulación de nutrientes” sobre de NSP y el beneficio de romper la arquitectura de la pared celular mediante enzimas. Sin embargo, los mecanismos para encontrar los tipos de xilanasas requeridos para ello, cómo trabajan en concierto con otras enzimas y en que medida se disgregan los xilanos aun no están bien aclarados. Con los papeles de los XOS cada vez más prominentes en la acción beneficiosa de las xilanasas, tal vez debería prestarse mayor atención a la producción de XOS cuando éstas se emplean en dietas de monogástricos.

**3. Mejora de eficacia de la xilanasas cambiando las prácticas de alimentación.** En la producción avícola intensiva, el pienso es ofrecido a las aves en forma continua. Esta práctica no promueve un gran tiempo de retención en el buche o la molleja - Classen y col., 2016 -. Sin embargo, estos órganos pueden ser manipulados mediante las prácticas de manejo y alimentación - Moen y col., 2012; Classen y col., 2016 -. Rodrigues y col. - 2017 - han realizado una experiencia en la que los broilers fueron alimentados con dietas intermiten-



temente conteniendo enzimas o no. La alimentación intermitente con enzimas dio lugar a una más larga retención de material digestivo en el buche y la molleja. Y con este aumento del precondicionado y mejora de la trituración mecánica del alimento las enzimas fueron más efectivas en la mejora del rendimiento de las aves. Las implicaciones de este estudio inicial están en que hay posibilidades en cambiar las prácticas de alimentación para agregar valor a las enzimas existentes. Mientras tanto, también trae nuevas preguntas acerca de cómo las enzimas son seleccionadas en cuanto al pH óptimo y su afinidad por los sustratos secundarios liberados previamente en el tracto gastrointestinal debido a que el pH en el intestino grueso del ave oscila entre una alta acidez hasta la neutralidad.

### ***“Distintas xilanasas liberan diferentes cantidades y tipos de moléculas de carbohidratos, como monómeros, oligómeros y otros xilanos de bajo peso molecular”***

#### **Proteasas**

Esta revisión solo aborda un par de cuestiones referentes al empleo de proteasas en la alimentación. Las proteasas tienen una amplia aplicación industrial, incluyendo su empleo como aditivos. A diferencia de las carbohidrasas, tienen un enlace común para hendir, un péptido.

Sin embargo, al igual que otras enzimas, tienen un grado de especificidad. Por ejemplo, mientras que las aminopeptidasas liberan un aminoácido o un pequeño péptido en un momento, actuando en el N terminus de las proteínas, las carboxipeptidasas hacen lo mismo pero sobre el C terminus. Y de igual forma las endopeptidasas desdoblan enlaces peptídicos en el centro de una molécula proteica pero las proteasas de serina hidrolizan un enlace peptídico que o bien tiene tirosina, fenilalanina o leucina. Así hay mucho margen para profundizar en el empleo de proteasas en alimentación, exponiendo seguidamente un par de ideas sobre ello:

1. Una mayor caracterización de los sustratos por ser esencial para identificar y caracterizar las proteínas del pienso para que su acoplamiento con las proteasas tenga un impacto real.
2. La desactivación de anti-nutrientes pues muchos de los presentes en los ingredientes de los piensos son proteínas, por lo que se precisa explorar las proteasas dirigidas a ellos, posibilitando así una solución más natural o rentable para abordar los problemas relacionados.

#### **Conclusiones**

En los últimos 30 años se han realizado grandes avances en la tecnología y la aplicación de enzimas y actualmente hay una mayor demanda para la caracterización del sustrato para una rápida y exacta medición de su funcionalidad y eficacia, así como para nuevos usos de las ya existentes.

