

Producción de xilitol a partir de levaduras nativas colombianas*

Xylitol production from colombian native yeast strains

Isleny Andrea Vanegas Córdoba^{**}, María del Socorro Yepes Pérez^{***},
Orlando Simón Ruiz Villadiego^{****}

RESUMEN

El xilitol es un edulcorante alternativo con características similares a la sacarosa que ha despertado gran interés debido principalmente a su uso seguro en pacientes diabéticos y aquellos deficientes en *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*. Su síntesis química es costosa y genera subproductos indeseables, mientras que el proceso biotecnológico, utilizando levaduras de diferentes géneros, se perfila como una alternativa viable de producción por ser más seguro y específico. Colombia, por su ubicación geográfica privilegiada, ofrece una gran variedad microbiana que puede aprovecharse con fines académicos y comerciales, por esto, en el presente trabajo se realizó la búsqueda de algunos microorganismos nativos con potencial para la producción de xilitol. Se aislaron 25 especies de levaduras, de las cuales fue posible identificar bioquímicamente el 84% mediante el kit API 20C-AUX. Tres levaduras: *Candida kefyri*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* presentaron mayor capacidad para degradar xilosa frente a las demás, por lo que fueron seleccionadas para la posterior evaluación de su capacidad productora. Se desarrollaron cultivos celulares discontinuos en matraces agitados a 200 rpm y 35 °C por 30 horas, usando un medio sintético con xilosa como fuente de carbono. La evaluación del consumo de xilosa y la producción de xilitol se realizó por cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta resolución. Los rendimientos máximos se lograron con *Candida kefyri* y *C. tropicalis* (Yp/s 0,5 y 0,43 g/g, respectivamente), utilizando una concentración inicial de 20 g/L de xilosa.

Palabras clave: xilitol, xilosa, levaduras, *Candida kefyri*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*.

ABSTRACT

Xylitol is an alternative sweetener with similar characteristics to sucrose that has become of great interest, due mainly to its safe use in diabetic patients and those deficient in glucose-6-phosphate-dehydrogenase. Its chemical production is expensive and generates undesirable by-products, whereas biotechnological process, which uses different yeasts genera, is a viable production alternative because it is safer and specific. Colombia has a privilege geographic location and offers a great microbial variety, this can be taken advantage of with academic and commercial goals. Because of this, some native microorganisms with potential to produce xylitol were screened in this work. It were isolated 25 yeasts species, from which was possible to identify 84% by the kit API 20C-AUX. Three yeasts: *Candida kefyri*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* presented greater capacity to degrade xylose compared to the others, therefore they were selected for the later evaluation of its productive capacity. Discontinuous cellular cultures were developed in shaken flasks at 200 rpm and 35°C by 30 hours, using synthetic media with xylose as carbon source. Xylose consumption and xylitol production were

* Este artículo corresponde a la presentación oral que obtuvo el tercer lugar en la sala de bioprocesos, bioprospección y ambiental del segundo Congreso Colombiano de Biotecnología.

** Ingeniera química, M. Sc. biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Correo electrónico: iavanega@unalmed.edu.co

*** Química, M. Sc. ciencias químicas, Área Productos naturales. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Correo electrónico: msyepes@unalmed.edu.co

**** Químico, M. Sc. ciencia y tecnología del carbón. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Correo electrónico: osruiz@unalmed.edu.co

Recibido: octubre 26 de 2004. **Aceptado:** octubre 29 de 2004.

evaluated by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. The maximal efficiency were obtained with *Candida kefyri* and *C. tropicalis* (Yp/s 0.5 y 0.43 g/g, respectively), using an initial xylose concentration of 20 g/L.

Key words: Xylitol, xylose, yeasts, *Candida kefyri*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*.

INTRODUCCIÓN

Desde las primeras etapas de su vida, el hombre muestra una fuerte tendencia por el sabor dulce. Se presume que el hombre primitivo lo utilizó como indicador en la selección de sustancias aptas para consumir, haciendo una asociación casi inconsciente del sabor dulce de los alimentos con su inocuidad (Hugill, 1981).

El mercado actual ofrece una gran variedad de edulcorantes con diferentes especificidades y beneficios, considerando aspectos energéticos, económicos y de seguridad alimentaria. Uno de los edulcorantes alternativos que ha despertado el interés de numerosos investigadores a nivel mundial es el xilitol ($C_5H_{12}O_5$), un azúcar alcohol que por sus múltiples ventajas se usa en las industrias de alimentos, farmacéutica y en la elaboración de productos de higiene oral. El xilitol es de apariencia y dulzura similares a la sacarosa, pero aporta un 40% menos de calorías (2,4 kcal/g). Por esta razón, es utilizado como sustituto del azúcar en una relación 1:1 peso a peso, con la consecuente disminución calórica. Es muy estable en la fabricación de alimentos, no fermenta y no produce pardeamiento de Maillard (Ooi *et al.*, 2002; Emodi, 1978).

En el área de la salud se destaca su inclusión en la dieta y las formulaciones destinadas a pacientes diabéticos, porque su metabolismo no está regulado por la insulina. De igual forma, las personas deficientes en *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* lo encuentran adecuado, debido a que su biotransformación celular no requiere de esta enzima (Choi *et al.*, 2000; Converte *et al.*, 2000). Otras características importantes del xilitol son su efecto anticariogénico (Martínez *et al.*, 2001; Heikkilä *et al.*, 1992) y en la prevención de la otitis media aguda en la población infantil (Tapiainen, 2002; Glasnapp y Tribble, 2000). A nivel experimental, su ingestión se relaciona con el aumento en la absorción ósea de calcio en ratas de laboratorio, previniendo la osteoporosis o mejorando las condiciones de aquellas que ya la padecen (Mattila, 1999).

El xilitol se encuentra de manera natural en numerosas frutas y algunas legumbres como ciruelas

amarillas, fresas, coliflor, frambuesa, lechuga, espinaca, zanahoria, banano y cebolla, aunque en muy bajas concentraciones, lo que hace que su extracción de dichas fuentes no sea práctica ni económica (Ooi *et al.*, 2002; Affleck, 2000). En la actualidad, su producción a gran escala se realiza por hidrogenación catalítica de la xilosa a altas presiones y temperaturas. Además de los altos costos de producción, se generan impurezas que dificultan la purificación y cristalización del producto final. Otra forma de obtención es a través de procesos biotecnológicos, los cuales son una alternativa de producción limpia, porque no generan subproductos tóxicos debido a su naturaleza específica.

La biotransformación se realiza utilizando bacterias y algunos hongos capaces de asimilar y fermentar la xilosa a xilitol, etanol y otros compuestos. Dentro de todas las especies microbianas, las levaduras son reconocidas como las mejores productoras de xilitol, especialmente los géneros *Pichia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Debaryomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces* y *Candida*, considerada en el campo de la investigación como el patrón de referencia (Gronström, 2002; Barbosa *et al.*, 1988; Winkelhausen y Kuzmanova, 1998; Mayerhoff *et al.*, 1997).

En este trabajo de investigación se aislaron 25 cepas de levaduras nativas de diferentes fuentes de Medellín y su área metropolitana, con el fin de hacer una selección de las que presentaran mayor potencial para la producción de xilitol. Mediante procesos discontinuos se procedió a desarrollar el cultivo celular en un medio sintético con xilosa y luego se evaluó el consumo del sustrato y la producción de xilitol para las cepas seleccionadas, por cromatografía de capa fina (TLC: Thin Layer Chromatography) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento, selección e identificación de levaduras. Los microorganismos se aislaron de fuentes que

se caracterizan por tener altos contenidos de hemice-lulosa y/o carbohidratos, como bagazo y guarapo de caña de azúcar, suelos de sembrado de caña, de trapiches y de zonas arborizadas. También se aisló de tejido de tomate en descomposición. Las levaduras aisladas se purificaron por medio de repiques sucesivos. Posteriormente se hizo una selección entre las cepas que presentaron mayor potencial para metabolizar la xilosa, como indicativo de su posible producción de xilitol. Para ello se empleó un medio mínimo selectivo cuya composición en porcentaje p/v fue: xilosa 1,5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, KH_2PO_4 0,5%, Agar - Agar 2,0%. Luego, las levaduras seleccionadas se identificaron bioquímicamente con el kit API 20C-AUX.

Microorganismos y preparación del inóculo. Las levaduras seleccionadas se conservaron en tubos de ensayo con agar Sabouraud en bisel a 4 °C. Para las evaluaciones, las levaduras se sembraron en cajas de Petri en medio agar Sabouraud y se incubaron por 24 horas a 35 °C. Después de ese tiempo, se tomó una asada del cultivo fresco y se inoculó en 100 mL de medio Sabouraud líquido, en matraces a 200 rpm por 24 horas a 35 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas en condiciones ascépticas a 20000 rpm por 15 min., lavadas y resuspendidas en agua destilada estéril. De esta suspensión se tomaron volúmenes adecuados de células hasta obtener concentraciones de inóculo entre 0,5 y 4,0 g/L.

Medios y condiciones de producción. Se realizaron cultivos celulares discontinuos microaeróbicos con el medio de cultivo sintético descrito por Yahashi *et al.* (1996), cuya composición fue xilosa 20,0 g/L, glucosa 2,0 g/L, KH_2PO_4 15,0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g/L. Este medio contiene glucosa como suplemento con el fin de estimular el crecimiento celular y la posterior producción del metabolito. Se tomaron 20 mL de medio en matraces de 50 mL cubiertos con tapones de algodón y se agitaron a 200 rpm a 35 °C. El pH inicial fue de 4,5 y no se controló durante el transcurso de los experimentos. Los cultivos se desarrollaron siguiendo un diseño experimental con un solo factor (variable de estudio: cepa) y cuatro variables de respuesta: crecimiento celular, consumo de xilosa, producción de xilitol y pH del medio. Se realizaron cuatro repeticiones de cada experimento y los resultados fueron sometidos a pruebas de media y análisis de varianza mediante el paquete estadístico SAS.

Métodos analíticos. Se realizó un monitoreo periódico de las corridas experimentales para determinar

el consumo de la fuente de carbono y la producción de xilitol. Las muestras fueron diluidas (1:10), sometidas a eliminación de proteínas, lípidos y colorantes de alto peso molecular y posteriormente microfiltradas a través de membranas de 0,45 μm . Las concentraciones de glucosa, xilosa y xilitol se monitorearon por HPLC (Perkin Elmer series 200), usando un detector de índice de refracción (RI) y la columna Varian Carbohydrates Ca, con las siguientes condiciones: eluente H_2O , flujo de 0,5 mL/min., temperatura de la columna 90 °C, atenuación en el detector 8, volumen de la muestra 20 μL .

La determinación de la concentración celular se realizó indirectamente por correlación entre el peso seco de las células y su absorbancia a $\lambda = 600 \text{ nm}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de microorganismos. De un total de 128 muestras se aislaron y purificaron 25 cepas de levaduras cuya identificación correspondió a los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula* (tabla 1).

No fue posible establecer la identificación bioquímica de cuatro de las levaduras aisladas, indicando la necesidad de utilizar un método de identificación diferente para dichos microorganismos.

Tabla 1. Levaduras aisladas

Levadura	Fuente de aislamiento
<i>Candida famata</i>	Bagazo de caña Muestra de suelo Suelo sembrado de caña
<i>Candida glabrata</i>	Compostaje Guarapo de caña Bagazo de caña (2)
<i>Candida inconspicua</i>	Guarapo de caña
<i>Candida kefyr</i>	Suelo de trapiche Guarapo de caña (2)
<i>Candida lipolytica</i>	Guarapo de caña
<i>Candida parapsilosis</i>	Cáscara de tomate
<i>Candida pelliculosa</i>	Guarapo de caña (3)
<i>Cándida rugosa</i>	Guarapo de caña
<i>Candida tropicalis</i>	Muestra de suelo
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Bagazo de caña (2)
<i>Rhodotorula minuta</i>	Guarapo de caña
Levaduras no identificadas	Bagazo de caña (2) Muestra de suelo Guarapo de caña

Se seleccionaron las levaduras *Candida kefyri*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (figura 1) como las más promisorias, por presentar mayor crecimiento en el medio mínimo con xilosa en un menor tiempo.

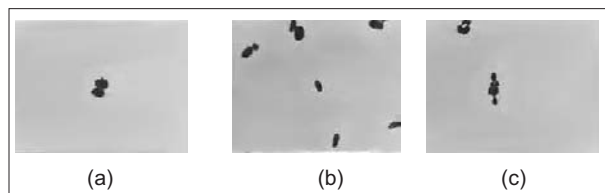


Figura 1. Levaduras seleccionadas para la producción de xilitol. a) *Candida tropicalis*, b) *C. kefyri* y c) *C. parapsilosis* observadas en microscopio (objetivo 100X).

Cultivos celulares. Las tres levaduras seleccionadas fueron sometidas a evaluación de su capacidad productora de xilitol, en cultivos celulares discontinuos. El seguimiento por TLC permitió establecer el tiempo final de los cultivos, el cual fue de 30 horas para *C. kefyri* y *C. tropicalis*. *C. parapsilosis* se monitoreó hasta las 48 horas, tiempo en el cual se finalizó su evaluación, aunque en el medio aún había presencia de xilosa.

Las figuras 2, 3 y 4 representan los resultados de la evaluación cromatográfica de los cultivos, a las 6, 12, 18, 24 y 30 horas. Sólo para *C. parapsilosis* hasta las 48 horas.

Las muestras fueron diluidas en proporción 1:20 para la cuantificación por HPLC. En las etapas de mayor producción fue necesario realizar diluciones por un factor de 200. Para *C. kefyri* se hicieron nuevas diluciones a partir de las 24 horas (figura 3) y para *C. tropicalis* a la hora 30. *C. parapsilosis* no requirió posteriores diluciones debido a su baja producción.

Los resultados del consumo de xilosa y producción de xilitol evaluados por HPLC se presentan en las figuras 5 y 6 para las tres levaduras seleccionadas.

En las seis primeras horas del cultivo ocurrieron los mayores cambios en cuanto a consumo de xilosa por las tres cepas (figuras 2, 3, 4 y 5). Se presume que en este tiempo las células utilizaron la xilosa principalmente para su crecimiento y estimulación de la producción enzimática. Con *C. parapsilosis* fue notorio el bajo consumo, lo que aparentemente está relacionado de forma directa con su baja producción.

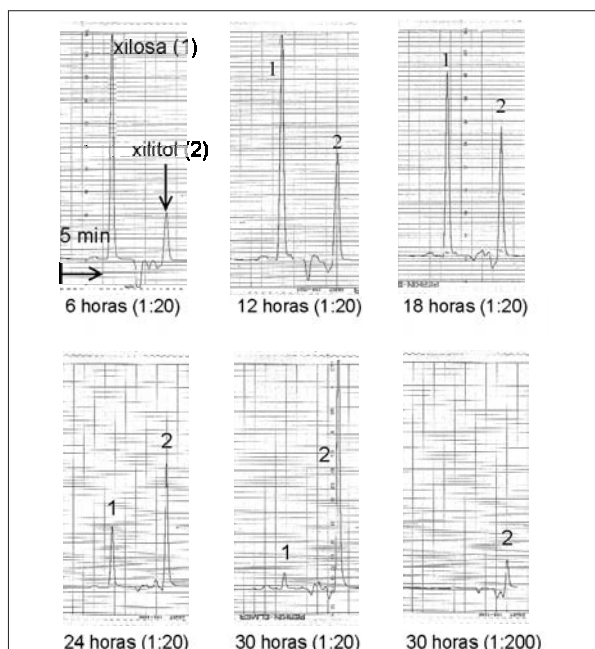


Figura 2. Producción de xilitol por *Candida tropicalis*.

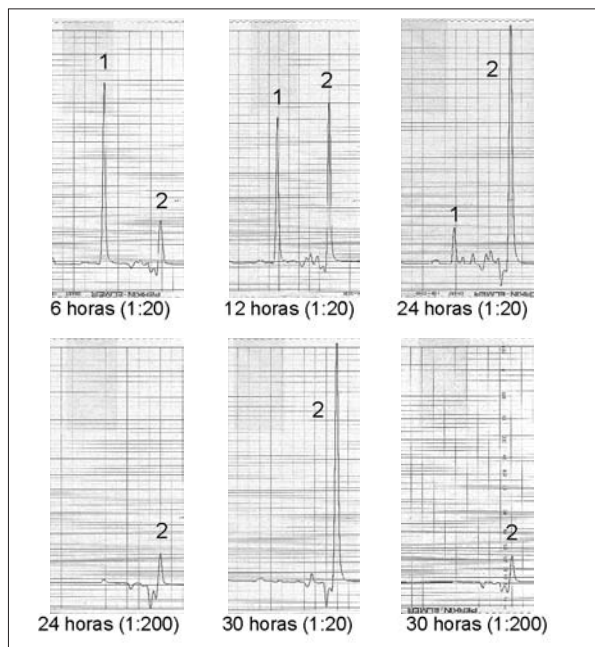


Figura 3. Producción de xilitol por *Candida kefyri*.

En relación con la producción de xilitol, *Candida kefyri* representa un potencial importante seguida muy de cerca por *C. tropicalis*, mientras que *C. parapsilosis* tuvo un bajo desempeño con muy poca producción en un periodo bastante largo de tiempo

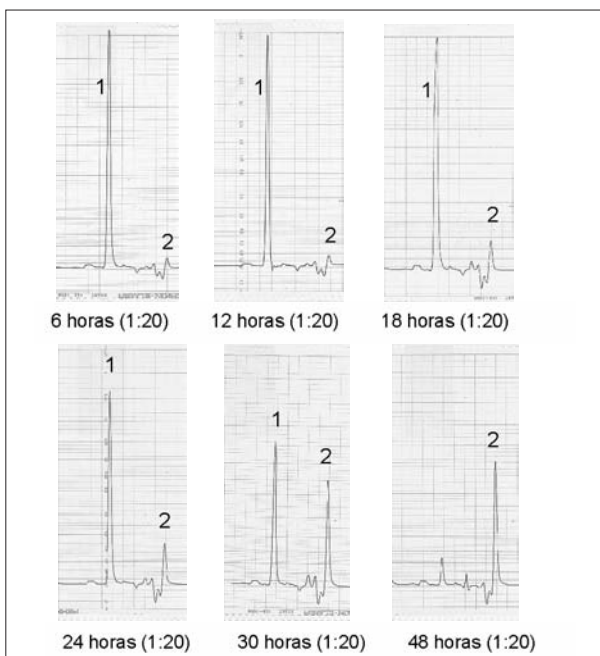


Figura 4. Producción de xilitol por *Candida parapsilosis*.

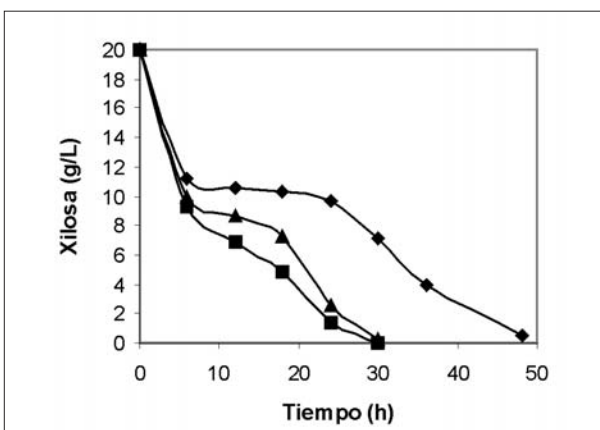


Figura 5. Consumo de xilosa por *Candida tropicalis* (▲), *C. Kefyr* (■), y *C. parapsilosis* (◆).

(figura 6), lo que es poco deseable para procesos a nivel industrial. El pH pudo haber sido uno de los parámetros de mayor incidencia en el comportamiento de *C. parapsilosis*, pues se reporta que ésta es una de las cepas de mayor producción (Oh *et al.*, 1998; Winkelhausen y Kuzmanova, 1998; Mayerhoff *et al.*, 1997; Preziosi-Belloy *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997).

Rendimiento de la producción de xilitol. La tabla 2 sintetiza los valores de productividades volumétricas y rendimientos obtenidos con *Candida kefy*, *C.*

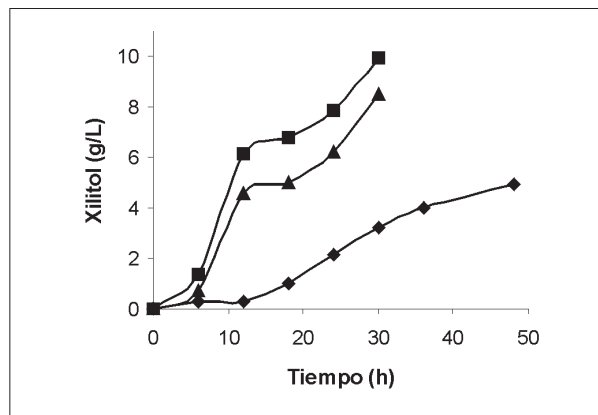


Figura 6. Producción de xilitol por *Candida tropicalis* (▲), *C. Kefyr* (■), y *C. parapsilosis* (◆).

Tabla 2. Rendimiento de la producción de xilitol

Levadura	Xilitol (g/L)	Qp s/s (g/L-h)	Yp s/s (g/g)
<i>Candida kefy</i>	9,93	0,331	0,50
<i>C. tropicalis</i>	8,50	0,283	0,43
<i>C. parapsilosis</i>	3,19	0,106	0,16

Qp s/s : velocidad volumétrica de producción
Yp s/s : rendimiento de xilitol a partir de xilosa

tropicalis y *C. parapsilosis* a las condiciones de fermentación, partiendo de 20 g/L de xilosa, en un tiempo total de 30 horas.

El mayor rendimiento se obtuvo a partir de *C. kefy*, seguida muy de cerca por *C. tropicalis*. Para *C. parapsilosis* el valor fue significativamente menor. Es importante entonces considerar estos resultados para una posterior optimización de las variables que pueden afectar la producción del edulcorante por *C. kefy* y *C. tropicalis*. También sería oportuno un estudio de las condiciones en las cuales se pueda mejorar la producción a partir de *C. parapsilosis*, teniendo en cuenta que es una de las más reconocidas en el ámbito investigativo por su producción.

CONCLUSIONES

Las levaduras nativas del género *Candida* son los microorganismos que presentaron mayor capacidad para metabolizar xilosa, además fueron las más difundidas en las fuentes de muestreo.

Candida glabrata se aisló de fuentes tan diversas como el compostaje, bagazo y guarapo de caña de azúcar, constituyéndose en la levadura nativa de más amplia distribución.

La cepa nativa *Candida kefir* fue la levadura que exhibió la mayor producción de xilitol, durante un tiempo total de 30 horas, lo que la ubica en un lugar especial con respecto a las otras cepas aisladas.

C. tropicalis presentó un buen desempeño en la producción de xilitol bajo las condiciones evaluadas en esta investigación. Este resultado está en concordancia con los reportes que se han hecho sobre ella.

C. parapsilosis no se manifestó como una gran productora de xilitol bajo las condiciones ensayadas. No obstante, esta levadura se reporta en otras investigaciones con una gran capacidad productora. En este caso la cepa que se aisló utilizó la xilosa principalmente para su crecimiento.

La variedad de cepas de levaduras que presentaron potencial para la producción de xilitol se aislaron de fuentes muy diversas, lo que corrobora la biodiversidad que existe en el país. Colombia brinda la oportunidad de aislar numerosas cepas microbianas nativas, potencialmente productoras de gran cantidad de metabolitos de interés industrial, como es el xilitol.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen muy especialmente a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (DIME) por su apoyo financiero a esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Affleck, R. P. 2000. Recovery of xylitol from fermentation of model hemicellulose hydrolysates using membrane technology. Thesis for the degree of Master of Science in Biological Systems Engineering. Virginia Polytechnic Institute and State University. 114.

Barbosa, M. F. S.; De Madeiros, M. B.; et al. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3: 241-251.

Choi, J.-H.; Moon, K.-H.; Ryu, Y.-W. and Seo, J.-H. 2000. Production of xilitol in cell recycle fermentations of *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters*. 22: 1625-1628.

Converti, A.; Perego, P.; Torre, P. and Silva, S. S. 2000. Mixed inhibitions by methanol, furfural and acetic acid on xylitol

production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*. 22: 1861-1865.

Emodi, A. 1978. Xylitol: It's properties and food applications. *Food Technology*. 28-32.

Glasnapp, A. and Tribble, P. A. 2000. Xylitol in the Prevention of Otitis Media. Xylitol can be useful as prophylaxis in children. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* May/June. 1-4.

Granström, T. 2002. Biotechnological production of xylitol with *candida* yeasts. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy Helsinki University of Technology, Department of Chemical Technology.

Heikkila, H.; Juha, N.; Rahkila, L. and Tyryla, M. 1992. Method for the production of Xylitol. United States Patent No. 5,081,026.

Hugill, J. A. C. 1981. El ámbito de los edulcorantes. *La industria azucarera*. 87 (1003): 46-52.

Kim, S. Yo.; Kim, J.-H. and Oh, D.-K. 1997. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 83 (3): 267-270.

Martínez, E. A.; Villarreal, M. L. M., Almeida E. Silva, J. B.; Solenzal, A. I. N.; Canilha, L.; Mussatto, S. I. 2001. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (5): 295-301.

Mattila, P. 1999. Dietary xylitol in the prevention of experimental osteoporosis. Beneficial effects on bone resorption, structure and biomechanics. Oulu, Finland: Oulu University Library. 65.

Mayerhoff Zea, D.V.L.; Roberto, I. C.; Silva, S. S. 1997. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotechnology Letters*. 19 (5): 407-409.

Oh, D.-K.; Kim, S.-Y.; Kim, J.-H. 1998. Increase of Xylitol Production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 58 (4): 440-444.

Ooi, B. G.; Le, T. T. B.; Markuszewski, B. M. 2002. The effects of glucose on the yeast conversion of xylose into xylitol by *C. Guilliermondii* and *C. Tropicalis*. En: *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 1 (3).

Preziosi-Belloy, L.; Nolleau, V.; Navarro, J. M. 1997. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 21: 124-129.

Tapiainen, T. 2002. Microbiological effects and clinical use of xylitol in preventing acute otitis media. Academic Dissertation to be presented with the assent of the Faculty of Medicine, University of Oulu, Department of Pediatrics, University of Oulu, Finland.

Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S. 1998. Review: Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86 (1): 1-14.

Yahashi, Y.; Horitsu, H.; Kawai, K.; Suzuci, T. ; Takamizawa, K. 1996. Production of Xylitol from D-Xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-Glucose feeding. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 81 (2): 148-153.