

Producción y Aplicaciones Biotecnológicas del Xilitol

Juan Carlos González-Hernández*, Mariana Alvarez-Navarrete, Luz del Carmen Ornelas Hernández, Miguel Angel Zamudio Jaramillo

Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia; Avenida Tecnológico 1500. C. P. 58120. Morelia, Mich, México. E-mail: jcgh1974@yahoo.com

RESUMEN

El xilitol es un polialcohol de cinco carbonos, es un edulcorante no calórico que proporciona efectos benéficos a la salud y sirve como precursor de otros azúcares no convencionales. El xilitol tiene un amplio mercado a nivel mundial, por lo que actualmente se realizan investigaciones intensas sobre su producción. La producción industrial de xilitol se realiza mediante la hidrogenación química de la D-xilosa para convertirla en xilitol. Una alternativa importante del método químico se realiza mediante el uso de levaduras del género *Saccharomyces* y *Candida*, aplicando ingeniería metabólica. La investigación actual sobre la reducción microbiana de la D-xilosa a xilitol ha sido enfocada sobre la ingeniería metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* y cepas de *Candida*. Las cepas de *Candida* muestran una ventaja sobre otras cepas de *S. cerevisiae* en términos de la captación de D-xilosa, el equilibrio y mantenimiento del balance redox intracelular. El presente trabajo de revisión se centra en la síntesis bioquímica del xilitol, los problemas relacionados al balance redox intracelular y la producción microbiana del xilitol. Por último, se mencionan futuras aplicaciones del xilitol.

Palabras clave: xilosa, xilitol, levaduras.

ABSTRACT

Xylitol is a five carbon polialcohol which is a non-caloric sweetener with health related benefits and can be used as an intermediate in rare sugars production. Xylitol has a wide global market so intensive research is generated over its production. Industrial production of xylitol is done by chemical hydrogenation of D-xylose to convert it to xylitol. A method using metabolic engineering applied in yeast species like *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida* sp. has been studied as an alternative to chemical method. Actual research on microbial reduction has been focused over metabolic engineering of *S. cerevisiae* and *Candida* strains. The latter show an advantage over other *S. cerevisiae* strains in D-xylose assimilation and intracellular redox balance equilibrium and maintenance. The present review focuses in biochemical xylitol synthesis, intracellular redox

balance problems and microbial xylitol production. Finally, future perspectives for xylitol uses are mentioned.

Keys words: xylose, xylitol, yeasts.

INTRODUCCIÓN

El xilitol es un polialcohol de cinco átomos de carbono que proporciona beneficios a la salud. Previene la caries dental y la otitis (infección de oídos) en niños pequeños (Mäkinen, 1992). El xilitol puede ser encontrado en cantidades pequeñas, por ejemplo en frutas y vegetales. Industrialmente, es producido por hidrogenación química de la xilosa. El xilitol tiene casi el mismo poder edulcorante que la sacarosa, pero posee un contenido calórico de 2.4 Kcal/g comparado con 4 Kcal/g de la sacarosa. El xilitol tiene un calor de disolución negativo por lo que origina una sensación refrescante cuando es consumido oralmente, además de ser soluble en agua. Debido a sus efectos benéficos, el xilitol se ha convertido en un edulcorante usado mundialmente (Mellinghoff, 1961). Es utilizado para endulzar gomas de mascar, pastillas, dulces y pastas dentales. El xilitol fue originalmente producido para ser usado como edulcorante para personas diabéticas (Mellinghoff, 1961). La producción química y microbiana de xilitol fue reportada por Lohman (1957), Onishi y Suzuki (1966, 1969); respectivamente. Se ha reportado un método cromatográfico a escala industrial para la separación de diferentes azúcares de residuos hemicelulósicos, el cual fue desarrollado en Finlandia. Este método ha permitido obtener D-xilosa de manera eficiente. El método ha sido desarrollado de

tal manera que la D-xilosa separada es inmediatamente reducida a xilitol por medio de hidrógeno a alta presión, usando metales como catalizadores (Härkönen & Nuojuua 1979). El proceso químico requiere diversos pasos de purificación (Härkönen & Nuojuua, 1979) y el rendimiento del xilitol es aproximadamente de 50-60 % de la xilosa presente en los residuos hemicelulósicos (Nigam & Singh, 1995). Se ha reportado que la producción anual de xilitol es de 20,000 a 40,000 toneladas por año con un valor en el mercado de 40 a 80 millones de euros (Mäkinen, 2000). Al mismo tiempo; los efectos benéficos del xilitol sobre la prevención de caries dentales fueron reportados en Finlandia (Mäkinen, 2000). El uso de levaduras modificadas genéticamente como *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida* se ha considerado como una alternativa para la producción industrial de xilitol. Sin embargo, el método biotecnológico no ha superado las ventajas que tiene la hidrogenación química.

PRODUCCIÓN MICROBIANA DE XILITOL

La producción microbiana de xilitol utilizando ingeniería metabólica en *S. cerevisiae* ha sido reportada por Bruinenberg *et al.* (1983), evaluando el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción y consumo de NADPH en *Candida utilis*. Ellos concluyeron que durante el metabolismo de la xilosa, la

principal fuente de NADPH es la vía de la hexosa monofosfato y la enzima glucosa 6-P deshidrogenasa. En años anteriores, fue sugerido que el balance redox entre la xilosa reductasa dependiente de NADPH y la xilitol deshidrogenasa dependiente de NAD era la principal razón para la acumulación del xilitol (Bruinenberg, 1986).

Kötter *et al.* (1990) construyeron una transformante de *S. cerevisiae* capaz de utilizar la xilosa. Un año más tarde, Hallborn *et al.* (1991) reportaron un 95 % de rendimiento en la conversión de xilosa a xilitol con la cepa transformada de *S. cerevisiae*. Kötter y Ciriacy (1993) sugieren que la deficiencia de NADPH es el cuello de botella de la fermentación de la xilosa en el metabolismo de *S. cerevisiae*. Concluyeron que la vía de las pentosas fosfato en *S. cerevisiae* no puede regenerar suficiente cantidad de NADPH durante el metabolismo de la xilosa bajo condiciones limitadas de oxígeno (Hallborn *et al.*, 1994). Desde entonces, el papel del NADPH en el metabolismo de las levaduras ha sido intensamente estudiado. Han sido estudiadas diferentes estrategias para incrementar la generación de NADPH en *S. cerevisiae*. Los últimos estudios (Gombert *et al.*, 2001) se han enfocado en el metabolismo y flujo de la vía de las pentosas fosfato y consecuentemente en la regeneración del NADPH, la cual ha sido evaluada durante el metabolismo de la glucosa con diferentes levaduras (Gombert *et al.*, 2001). Durante el metabolismo de la glucosa en *S. cerevisiae*, los requerimientos de NADPH son abastecidos con un incremento del flujo hacia

la vía de las pentosas fosfato. Sin embargo, durante el metabolismo de la xilosa no se abastecen los requerimientos de NADPH. Para resolver esta situación se han desarrollado estrategias en la sobre expresión de la enzima glucosa 6-P deshidrogenasa (Minard *et al.*, 1998) o de la enzima D-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (Verho *et al.*, 2003). Estudios recientes incluyen la remoción de la vía de óxido-reducción de la xilosa en xilitol reemplazándola directamente por la isomerización de D-xilosa en D-xilulosa (Kuyper *et al.*, 2003). Con estos trabajos se elimina el cuello de botella en la generación de NADPH, permitiendo la captación de xilosa independientemente de la presencia y requerimiento de NADPH para la fermentación a etanol. El otro paso susceptible al bloqueo; es la captación de D-xilulosa dependiente de ATP, pero esto puede solucionarse con la multi-expresión de las enzimas de la fase no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (Johansson & Hahn-Hagerdal, 2002). Los principales objetivos de la ingeniería en *S. cerevisiae* para la producción industrial de xilitol, captación de D-xilulosa y regeneración de NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato, son: mejorar en forma definitiva la producción de NADPH para las reacciones intracelulares incrementando el flujo de la vía de las pentosas fosfato. La única forma de aumentar el flujo de la vía de las pentosas fosfato es incrementando la velocidad de crecimiento durante el metabolismo de la glucosa (Gombert *et al.*, 2001). Sin embargo,

la D-xilosa no es la fuente de carbono preferida por *S. cerevisiae*, ya que este sustrato no proporciona la suficiente energía para el crecimiento y metabolismo (Sonderegger *et al.*, 2004). Se sabe que la D-xilosa no induce ni incrementa la recirculación del flujo de carbonos a través de la vía de pentosas fosfato. Además, en una ruta alternativa, la D-xilulosa puede ser dirigida hacia la vía de la pentosas fosfato gracias a la enzima xilulocinasa o convertida a xilitol por la enzima xilitol deshidrogenasa. Esto puede abrir nuevas posibilidades para considerarla en la producción de bioetanol o xilitol utilizando levaduras.

Producción biotecnológica del xilitol

Existen varios métodos para la producción de xilitol. Puede extraerse de manera directa de algunos frutos o por medio de la hidrogenación de la xilosa. Dicha xilosa puede obtenerse de materiales lignocelulósicos (los cuales deben pasar por un proceso de hidrólisis previa). La hidrogenación de la xilosa puede llevarse a cabo por medios químicos o biotecnológicos. Los principales medios biotecnológicos de hidrogenación son los enzimáticos y microbiológicos.

Producción de xilitol usando células completas

Se sabe que el xilitol es producido por bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Sin embargo, la mayor parte de las exploraciones que se han realizado se centran en levaduras del género *Candida*. La razón de ello es debido a que pocos

organismos son capaces de utilizar la xilosa como fuente de carbono y, por otra parte acumular el xilitol, evitando que se transforme en D-xilulosa. Las especies que han reportado mayores productividades y rendimiento son *Candida tropicalis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida parapsilopsis*, fluctuando los rendimientos de xilitol respecto a la xilosa entre 0.73-0.88 % y las productividades entre 1.73 y 3.15 g l⁻¹ h⁻¹ (Gong *et al.*, 1981).

En 2002, Kim *et al.*, lograron incrementar la productividad de *C. tropicalis* en una mezcla de glucosa y xilosa. Sreenivas *et al.* (2006) reportaron modificaciones a la cepa de *C. tropicalis* utilizando rayos UV y una serie de mutaciones con N-metil, N-amino, nitrosoguanidina, obteniendo rendimientos de hasta 0.88 respecto a la xilosa inicial. López *et al.* (2004), aislaron una cepa de *C. tropicalis* en silages de maíz, obteniendo rendimientos de 0.91.

Se ha estudiado el metabolismo de la xilosa y del xilitol en *Pachysolen tannophilus* y se han realizado modificaciones genéticas, sin embargo la mayoría ha sido para desviar el metabolismo de la xilosa hacia etanol o para la comprensión del metabolismo de las pentosas en las levaduras (Jeffries, 1984).

D. hansenii es una levadura osmotolerante que puede crecer en presencia de hexosas y pentosas, aunque su crecimiento en presencia de pentosas es mucho más lento y su rendimiento de xilitol es muy similar en ambos casos (Nobre *et al.*, 1999). También se han estudiado sus sistemas de transporte de hexosas y

pentosas, encontrando que se trata de mecanismos de difusión facilitada y siendo simportadores de protones (Nobre *et al.*, 1999). *D. hansenii* fue inmovilizada en alginato de calcio por Domínguez (1998) encontrando productividades elevadas en biomasa, sin embargo las productividades de xilitol disminuyeron. Sampaio *et al.* (2005) observaron el crecimiento de *D. hansenii* representado en tres fases: una fase caracterizada por el aumento en la biomasa sin producción de xilitol, una de baja producción de xilitol y una tercera de alta producción de xilitol con bajo crecimiento celular. Nobre *et al.*, (2002), estudiaron los cambios en el comportamiento de las enzimas involucradas en la producción del xilitol en un quimiostato. Al modificar la velocidad de dilución, observaron que, a bajas velocidades de crecimiento, la xilosa deshidrogenasa tiene mayor actividad que la xilosa reductasa, sin embargo, al incrementarse la velocidad se da mayor actividad en la xilosa reductasa, indicando un cambio metabólico dirigido a satisfacer requerimientos mayores de NADPH (Naobre *et al.*, 2002).

C. parapsilopsis ha sido probada para la producción de xilitol a partir de xilosa, mostrando que dicha producción puede ser incrementada controlando el potencial redox y la concentración de glucosa y manosa (Nolleau *et al.*, 1993).

FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE XILITOL

Entre estos factores se encuentran la concentración inicial del inóculo, tipo de

sustrato, composición del medio de cultivo, temperatura, pH y el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La) (Rao *et al.*, 2004).

Efecto de la oxigenación

Entre los factores que se mencionaron anteriormente, el oxígeno se considera el más delicado para el rendimiento, pues la producción de xilitol se da bajo condiciones limitadas de oxígeno (Scoog *et al.*, 1990). Por otra parte, la actividad del xilitol deshidrogenasa también se incrementa con la baja concentración de oxígeno. La producción de biomasa en las levaduras generalmente se ve favorecida por la aireación como se menciona a continuación.

Ding *et al.* (2006) estudiaron el efecto de la aireación en la producción de xilitol por *Candida* sp. Utilizaron un método de dos fases, en la primera fase se aireó el medio de manera intensiva ($k_La = 37 \text{ h}^{-1}$), alcanzándose altas productividades de biomasa y la segunda fase consistió en someter al cultivo a condiciones limitadas de oxígeno ($k_La = 6 \text{ h}^{-1}$) para la acumulación de xilitol. Con este método se reportan rendimientos de 76 % en masa de xilitol.

Winkelhausen *et al.*, (2004), obtuvieron resultados similares con *Candida biodinii*. En este estudio, la aireación intensiva ($k_La = 46 \text{ h}^{-1}$) resultó en un incremento en la producción de biomasa y en una reducción de productos (xilitol, etanol, ribitol y glicerol). Al disminuir la transferencia de oxígeno ($k_La = 8 \text{ h}^{-1}$) la producción de xilitol alcanzó su máxima productividad.

Faria *et al.* (2002) estudiaron el mismo efecto utilizando coeficientes entre 12 y 70 h⁻¹ con la levadura *Candida guilliermondii*, determinando coeficientes de respiración de 12-26 mg de oxígeno por gramo de levadura por hora. Este valor indica el delicado balance entre la producción de biomasa y la de xilitol, ya que la saturación del oxígeno es de 30-50 mg l⁻¹ entre las temperaturas de 15-40 °C y la ley de Henry establece un valor de equilibrio de 6.3-10.5 mg l⁻¹ cuando se utiliza aire puro como fuente de oxígeno (Lee, 1992)

Sang *et al.* (1997) estudiaron la producción de xilitol con *Candida parasilopsis* y obtuvieron rendimientos cercanos al 70 % con valores de k_La de 30 h⁻¹. Dichos autores obtuvieron resultados similares manteniendo la concentración de oxígeno constante (0.7 % de la saturación).

Por otra parte, Kastner *et al.* (1996) observaron bajos rendimientos de xilitol bajo condiciones anaeróbicas con *Candida shehatae* (21-14 %) y la viabilidad de la cepa fue afectada severamente.

Es claro, a partir de estos estudios, que el equilibrio entre la producción de biomasa y la de xilitol es un balance delicado controlado por la concentración de oxígeno. Sin embargo, para que estos valores sean útiles, es necesario llevar a cabo mediciones adecuadas del balance entre la transferencia de oxígeno y la velocidad de consumo, así como la modelación del proceso para seleccionar criterios de escalamiento adecuados.

Aranda *et al.* (2000) modelaron el proceso utilizando ecuaciones diferenciales

considerando el consumo de xilosa y de oxígeno y la producción de xilitol y biomasa. Obtuvieron predicciones del comportamiento del proceso y del rendimiento de xilitol en función de k_La. Estos estudios pueden ser la base para obtener resultados escalables para poder traducir los datos experimentales a procesos industriales. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto del escalamiento en la producción biotecnológica de xilitol.

Efecto de la temperatura y el pH

Converti y Dominguez (2001) encontraron que la temperatura en *D. hansenii* modifica el comportamiento de sus rutas metabólicas, encontrando una temperatura en la cual la producción de xilitol es más eficiente (32-37 °C), así como la producción de etanol. En relación al pH, se observó un comportamiento similar; es decir, se encuentran valores de pH (4.5-5.5) que representan un pico en la producción de xilitol (Converti & Domínguez, 2001).

Las hipótesis más probables de este comportamiento son la alteración del sistema de transporte de la xilosa hacia el interior de la célula, incrementos en el pH interno de la célula o alteraciones en la permeabilidad de las membranas, disminuyendo la disponibilidad de algunos micronutrientes (Converti & Domínguez, 2001).

Sanchez *et al.* (2004) encontraron que la temperatura óptima para la producción de xilitol con *Pachysolen tannophilus* difiere por 15 °C de la que favorece la producción de etanol. Esto puede abrir puertas para

controlar la producción hacia cualquiera de las dos vías.

Muchos otros factores influyen en la producción de xilitol como la concentración de sales y la composición del medio y el inóculo. Rao *et al.* (2004) realizaron un estudio considerando ocho variables de manera simultánea usando arreglos ortogonales: temperatura, pH, agitación, nivel de inóculo, hidrolizado de maíz, xilosa, extracto de levadura y KH_2PO_4 . En dicho trabajo se puede observar que las variables que más influyen sobre el proceso son la temperatura, la agitación y el pH. La adición de extracto de levadura y el inóculo tienen una contribución despreciable (Rao *et al.*, 2004).

PRODUCCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE DIFERENTES MATERIAS PRIMAS

Las materias primas para la producción biotecnológica de xilitol suelen ser fuentes ricas en xilosa, principalmente residuos lignocelulósicos. Para la producción de xilitol a partir de este tipo de residuos se requiere una etapa de hidrólisis para liberar los xilanos contenidos en la hemicelulosa (Tabla 1).

Glucosa y Xilosa para la Producción de Xilitol

El xilitol se produce química o biológicamente por reducción de la D-xilosa, pero este proceso es costoso debido a los altos costos del sustrato (D-xilosa). Una gran variedad de polialcoholes se producen con buenos rendimientos por asimilación aeróbica de varias pentosas y hexosas a partir de levaduras. En 1969 Onishi y Suzuki, desarrollaron un método microbiológico que convierte la glucosa a xilitol vía D-arabitol y D-xilulosa, en el que se involucraron tres pasos secuenciales.

De acuerdo con sus estudios, si una levadura crece bien en D-xilulosa y produce xilitol con buenos rendimientos, se esperaría que el xilitol pudiera obtenerse eficientemente a partir de la glucosa, a través del siguiente proceso de fermentación secuencial (Onishi & Suzuki, 1969).



Sus resultados sugieren que el xilitol se puede producir a partir de glucosa con un rendimiento aproximado del 15 al 20 %, con una aplicación secuencial de tres procesos

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Tabla 1.- Materias primas para la producción de xilitol.

Material	Cepa	Yx/s g l ⁻¹	Q g l ⁻¹ h ⁻¹	Referencia
Eucalyptus	<i>D. hansenii</i>	0.57	0.4	Diaz <i>et al.</i> , 2002
Paja de arroz	<i>C. parapsilopsis</i>	0.72	-	Mayerhoff <i>et al.</i> , 1997
	<i>P. capsulata</i>	0.68	-	
	<i>P. tannophilus</i>	0.49	0.49	Converti <i>et al.</i> , 1999
Madera noble	<i>D. hansenii</i>	0.55	0.02	
	<i>C. guilliermondii</i>	0.46	0.02	
Alamo	<i>C. guilliermondii</i>	0.8	0.6	Preziosi <i>et al.</i> , 200
Residuos de granos de cervecería	<i>C. guilliermondii</i>	0.65	0.38	Mussato <i>et al.</i> , 2005
	<i>C. magnoliae</i>	0.74	0.02	Tada <i>et al.</i> , 2004
Mazorcas de maíz				
Paja de avena	<i>C. guilliermondii</i>	0.59	0.12	Canliha <i>et al.</i> , 2008
Bagazo de caña	<i>C. guilliermondii</i>	0.79	0.47	Alves <i>et al.</i> , 1998
Bagazo de caña	<i>C. guilliermondii</i>	0.54	0.44	Carvalho <i>et al.</i> , 2003
Bagazo de caña	<i>C. guilliermondii</i>	0.20	0.10	Canettieri <i>et al.</i> , 2001
Madera de Eucalyptus	<i>C. guilliermondii</i>	0.26	0.09	Villareal <i>et al.</i> , 2006
Paja de arroz	<i>C. guilliermondii</i>	0.72	0.61	Musatto <i>et al.</i> , 2001
Paja de trigo	<i>C. guilliermondii</i>	0.9	0.5	Canilha <i>et al.</i> , 2004
Alamo	<i>Candida sp.</i>	0.74	5.38	Dominguez <i>et al.</i> , 2004
Pasto varilla	<i>C. guilliermondii</i>	85.6	--	Ooi <i>et al.</i> , 2001

ARTÍCULO DE REVISIÓN

de fermentación, sin el aislamiento y purificación de los productos intermediarios (D-arabitol y D-xilulosa), lo que haría a esta técnica comercialmente muy atractiva (Onishi & Suzuki, 1969). *D. hansenii* ATCC 20212 se empleó para el primer paso (D-glucosa → D-arabitol). Se utilizó un medio modificado A, que contenía 15 % de glucosa y 4 % de licor de hidrolizado de maíz concentrado. Cuando la glucosa se consumió casi por completo y se produjo D-arabitol, se ajustó el pH 6.0 del caldo de fermentación con NaOH, sin remover las células y se esterilizó a 120 °C por 15 min. El medio fue luego enriquecido con los nutrientes que favorecieran el crecimiento de *Acetobacter suboxydans*, que oxidó casi por completo el D-arabitol a D-xilulosa. Para la reducción de la D-xilulosa a

xilitol, por *C. guilliermondii* var. soya (ATCC 20216), fue necesario agregar una cantidad adicional del 4 % de licor de hidrolizado de maíz concentrado al caldo fermentado por *A. suboxydans*, para tener un mejor rendimiento. (Onishi & Suzuki, 1969).

Por otro lado, Hickman y Ashwell (1958) reportaron la presencia de un sistema enzimático en mitocondrias de hígado de cerdos de guinea capaces de reducir de forma reversible tanto a la L-xilulosa como a la D-xilulosa hasta un intermediario común, el xilitol, proporcionando un mecanismo para la interconversión de los estereoisómeros de esta cetopentosa. Muestran la siguiente secuencia para la conversión de L-xilulosa a glucosa: DPNH (Difosfonucleótido reducido)



DPNH (Difosfonucleótido oxidado). Como puede observarse, la glucosa puede ser convertida a D-xilulosa-5-fosfato; sin embargo, no es posible la conversión de D-xilulosa-5-fosfato a D-xilulosa para la producción de xilitol. De acuerdo con la Figura 1, la producción de xilitol no parece estar directamente asociada al metabolismo de la glucosa (Senac y Hahn-Hagerdal, 1990).

Aerobacter aerogenes PRL-R3 posee enzimas inducibles para el catabolismo de la D-xilosa y del D-arabitol (Figura. 2). La D-xilosa es el inductor de la isomerasa y de la D-xilulocinasa para su propia conversión. El D-arabitol es el inductor de la deshidrogenasa del D-arabitol y de una D-xilulocinasa separada (Wilson & Mortlock, 1973) Senac y Hahn-Hagerdal (1990) compararon la fermentación de glucosa y

ARTÍCULO DE REVISIÓN

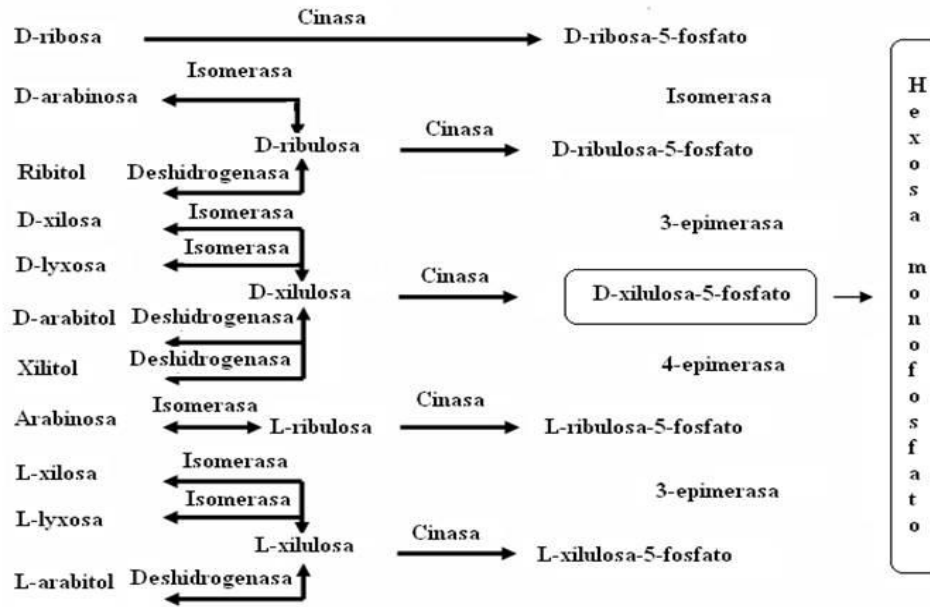


Fig. 1. Ruta de la asimilación de pentosas y pentitales en *A. aerogenes* (Tomado y modificado de Mortlock *et al.*, 1965).

xilulosa y la formación de productos por *S. cerevisiae* en cultivo batch bajo condiciones anaeróbicas. En ambas fermentaciones se

asimilaron cerca de 10 mM de xilosa y se produjeron pentitales, indicando la presencia de la enzima xilosa reductasa y posiblemente

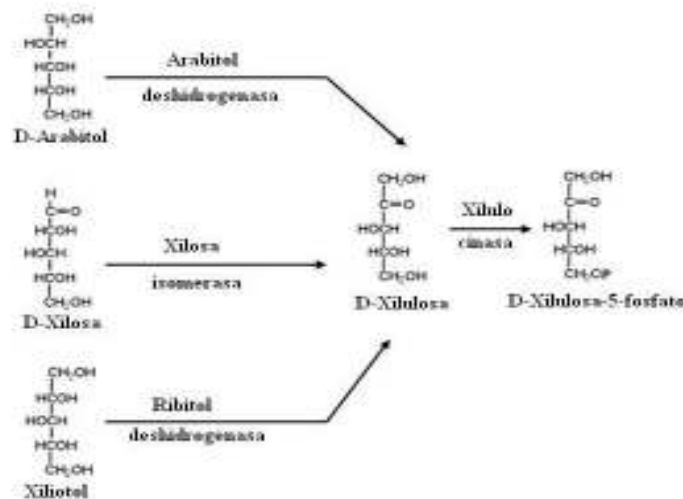


Fig. 2. Rutas del metabolismo del D-arabitol, D-xilosa, xilitol y D-xilulosa por *A. aerogenes* (Tomado y modificado de Wilson & Mortlock, 1973).

también de la enzima xilitol deshidrogenasa. Las bajas velocidades de consumo de azúcar

y de producción de etanol en células que fermentaron xilulosa comparado con las

células que fermentaron glucosa pudieron ser causadas por un bloqueo en la ruta (pentose-phosphate pathway) PPP, ya que hubo una acumulación de S7P en las células que fermentaron la xilulosa, lo cual no fue observado en las células que fermentaron glucosa.

Por su parte, Van Zyl *et al.* (1993) investigaron la influencia de la D-ribosa como cosustrato en la absorción y metabolismo de la D-xilosa por *S. cerevisiae* ATCC 26602, un sustrato que no puede utilizar para su crecimiento. La presencia de un solo sistema de baja afinidad para el transporte de xilosa en cultivos frescos y la presencia de ambos sistemas de baja y alta afinidad en células privadas de alimento, indicó que la xilosa es transportada por ambos sistemas de transporte de glucosa. La glucosa inhibe fuertemente el transporte de xilosa en cultivos frescos creciendo en glucosa, probablemente como resultado de la competencia de los dos azúcares por un acarreador de baja afinidad. La ribosa también inhibe el transporte de baja afinidad de la xilosa, pero en menor grado que la glucosa. El sistema de alta afinidad, operativo en células expuestas a xilosa y ribosa, fue inhibido de manera similar por la glucosa, pero no fue significativamente inhibido por la ribosa. El xilitol y ribitol fueron indicadores de que ambos azúcares son reducidos inicialmente a sus

correspondientes polioles (Figura 3). La enzima que cataliza la conversión de xilosa a xilitol es aparentemente constitutiva y no está sujeta a represión por glucosa, ya que su actividad fue similar, independientemente del crecimiento en glucosa o etanol (Van Zyl *et al.*, 1993).

Una cepa de *S. cerevisiae* fue modificada genéticamente para que pudiera metabolizar la xilosa (Walfridsson *et al.*, 1995). Los genes *XYL1* y *XYL2* de *Pichia stipitis* CBS 6054, que codifican para xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, fueron clonados en *S. cerevisiae*. Los productos de estos genes catalizaron las dos etapas iniciales de utilización de la xilosa, de las cuales carece *S. cerevisiae*. Para incrementar el flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato, fueron sobre-expresados los genes *TKL1* y *TAL1* de *S. cerevisiae* que codifican para transcetolasa y transaldolasa. La xilosa y glucosa se consumieron simultáneamente, indicando que el transporte de xilosa no es una etapa limitante. El consumo de xilosa fue más rápido en presencia de glucosa, en un rango de 0.14 a 0.43 g l⁻¹ h⁻¹. Después de consumida la glucosa, la velocidad de consumo de xilosa se volvió más lenta. Esto se debió probablemente a que el transporte de xilosa pudo haberse limitado, debido a su baja concentración. Se cree que la xilosa es transportada por los mismos sistemas de transporte de la glucosa, pero con valores de

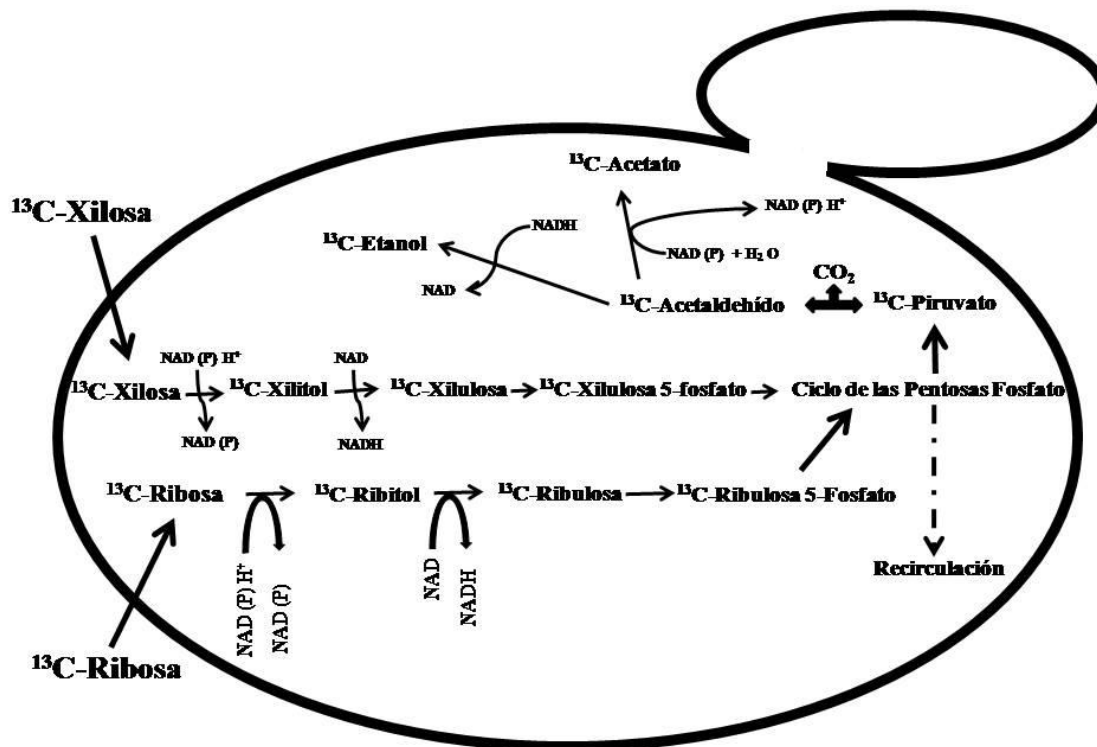


Fig. 3. Rutas metabólicas posibles para la utilización de xilosa y ribosa por levaduras y distribución de la [^{13}C]-D-xilosa o [^{13}C]-D-ribosa; NAD, Nicotinamida adenindinucleótido en su forma oxidada; NADH, H^+ , Nicotinamida adenindinucleótido en su forma reducida; NADP, Nicotinamida adenindinucleótido fosforilado su forma oxidada; NADPH, H^+ , Nicotinamida adenindinucleótido fosforilado en su forma reducida (Tomado y modificado de Van Zyl *et al.*, 1993).

K_m mucho mayores. La producción de xilitol comenzó hasta que la glucosa se consumió y no se produjo una cantidad adicional de etanol a partir de xilosa. El hecho de que la producción de xilitol comenzara inmediatamente después de que la glucosa se consumiera, indica que la fermentación de xilosa, como única fuente de carbono, da como resultado concentraciones de metabolitos intermediarios muy bajas para la inducción de enzimas etanogénicas clave. La xilosa reductasa (XR) de *P. stipitis* puede utilizar tanto NADH como NADPH como cosustratos, mientras que la xilitol deshidrogenasa (XDH) utiliza exclusivamente NAD^+ . Mediciones *in vitro* han demostrado

que la XR, en cepas transformadas de *S. cerevisiae* y en *P. stipitis*, tiene una preferencia por NADPH. Esto conduce a la acumulación de NADH, dando como resultado la oxidación de xilitol a xilulosa por la XDH dependiente de NAD^+ . En ausencia de oxígeno, el NADH no se puede reoxidar. Como resultado, el xilitol se acumula y es excretado (Walfridsson *et al.*, 1995).

Como se puede observar en la Figura 3, *S. cerevisiae* puede utilizar la xilulosa, que es fosforilada a xilulosa-5-fosfato y canalizada a través de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) hacia la glucólisis. En base a esta ruta, a partir de xilosa y glucosa se puede

producir etanol, pero sólo a partir de la xilosa se puede producir xilitol, no así con glucosa.

En una investigación realizada por Lee *et al.* (1996) se utilizaron varios azúcares, incluyendo algunos que son comúnmente encontrados en sustratos lignocelulósicos, para estudiar su capacidad para inducir las actividades de XR y XDH en *C. guilliermondii*. Se obtuvo muy baja actividad de XR utilizando celobiosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, D-fructosa o glicerol. Sin embargo, para la XDH se observó una inducción parcial con celobiosa (28.3 %) y D-fructosa (53.8 %), mientras que se observó una actividad despreciable (< 2 %) con D-manosa, D-glucosa, D-galactosa o glicerol. La D-xilosa y la L-arabinosa fueron los mejores inductores, mientras que las hexosas o el glicerol son inductores débiles de las actividades de XR y XDH. Se encontró que la D-manosa, D-glucosa y D-fructosa reprimieron la inducción de ambas actividades, XR y XDH. Sin embargo, varió el patrón y grado de represión para la XR y XDH. Con D-glucosa y D-manosa, la XR fue reprimida en un mayor grado que la XDH, mientras que la D-fructosa, reprimió en mayor medida a la XDH. Los resultados indicaron que la represión catabólica, un fenómeno en el que la síntesis de ciertas enzimas es inhibida en presencia de D-glucosa u otras fuentes de carbono relacionadas, también opera en esta levadura. De estos azúcares, la velocidad de utilización de D-glucosa fue la más elevada. Con la D-glucosa y la D-fructosa, el etanol fue el único producto de fermentación. También se estudió la capacidad de *C.*

guilliermondii para utilizar y fermentar la D-xilosa en presencia de otros azúcares. Cuando estuvieron presentes la D-glucosa, D-manosa o D-galactosa en el medio con la D-xilosa, se observó un patrón secuencial de utilización, siendo consumidas las hexosas antes que las pentosas. La utilización de estas hexosas no se vio afectada por la D-xilosa. Sin embargo, la utilización de la D-xilosa fue afectada claramente por la presencia de hexosas. El consumo de D-glucosa comenzó inmediatamente, mientras que el consumo de la D-xilosa comenzó después de un periodo de latencia.

En otro estudio se utilizaron células inmovilizadas de *C. tropicalis* IFO 0618 para la producción de xilitol a partir de D-xilosa. La productividad de xilitol se incrementó desde 12.5 g l⁻¹ en 80 h hasta 86.6 g l⁻¹ en 64 h, alimentando D-glucosa a una velocidad de 50 g l⁻¹ · día (Yahashi *et al.*, 1996).

La presencia de glucosa en hidrolizados hemicelulósicos puede inhibir el metabolismo de la xilosa por represión o inactivación de las enzimas catabólicas y del sistema de transporte de esta pentosa (Walker, 1998). Estudios previos han demostrado que la presencia de glucosa puede mejorar la producción de xilitol durante las fermentaciones en medio sintético. Rosa *et al.* (1998) observaron una mejora en la formación de xilitol por *C. guilliermondii* en medio sintético que contenía xilosa (60 g l⁻¹) y glucosa (5 g l⁻¹), y de acuerdo con Felipe *et al.* (1993), esta mejora depende de la relación glucosa/xilosa. Sugai y Delgenes (1995) reportaron que la glucosa reprime de manera parcial la aldosa reductasa de *C.*

guilliermondii inducida por la xilosa, y la intensidad de la represión catabólica se correlaciona con la concentración de glucosa en el sistema de inducción. La estimulación del metabolismo de la xilosa por la glucosa se puede explicar por la generación de metabolitos intermediarios en las etapas iniciales del metabolismo de la xilosa y la vía de las pentosas fosfato a través del metabolismo de la glucosa, ya que las coenzimas tales como NADH y NADPH son esenciales para la reducción enzimática de la xilosa por la xilosa reductasa (Meinander *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2002).

El patrón general observado en las levaduras, en cultivos por lotes, en mezclas de azúcares, es la inhibición o retardo de la utilización de la xilosa por la presencia de glucosa en el medio de crecimiento. La presencia de esta hexosa, que es rápidamente metabolizable, puede inducir problemas regulatorios debido a una interacción entre diferentes azúcares, dando como resultado una asimilación pobre de xilosa, y por lo tanto, una gran influencia en el rendimiento y productividad de xilitol (Tavares *et al.*, 2000).

En 2002, Carvalho *et al.*, inmovilizaron células de *C. guilliermondii* en esferas de alginato de calcio, que utilizaron para la producción de xilitol por lotes a partir de hidrolizados de bagazo de caña concentrado. La fracción de xilosa consumida para producir xilitol alcanzó un valor máximo (0.70), después del consumo de glucosa y oxígeno.

Suzuki *et al.* (2002) lograron incrementar la producción de xilitol a partir de D-arabitol por *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 (Figura 4), de 29.2 g l⁻¹ a 51.4 g l⁻¹, con la adición de 5% (v/v) de etanol y 5 g l⁻¹ de D-glucosa al medio de fermentación. El D-arabitol se puede producir de manera eficiente a partir de D-glucosa por fermentación con levaduras osmófilas, tales como las especies de *Pichia*, *Candida* o *Debaryomyces*.

El desarrollo de un método microbiano para la producción de xilitol a partir de D-glucosa sigue siendo una propuesta atractiva (Sugiyama *et al.*, 2003).

En una revisión de Leathers (2003), se menciona que las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contienen el gen de la xilosa reductasa de *P. stipitis* o de *C. shehatae* pueden convertir la xilosa a xilitol. Sin embargo, estas cepas recombinantes requieren cosustratos tales como glucosa para su crecimiento y la regeneración de cofactores. Al mismo tiempo, los niveles elevados de glucosa bloquean el transporte de xilosa en *Saccharomyces*. Una característica común de las levaduras productoras de xilitol es que están sujetas a represión por glucosa. De manera característica, la cepa *P. guilliermondii* NRRL-Y 12723 convierte la xilosa a xilitol y convierte una mezcla de xilosa y arabinosa a xilitol y arabinol. Sin embargo, si la glucosa

ARTÍCULO DE REVISIÓN

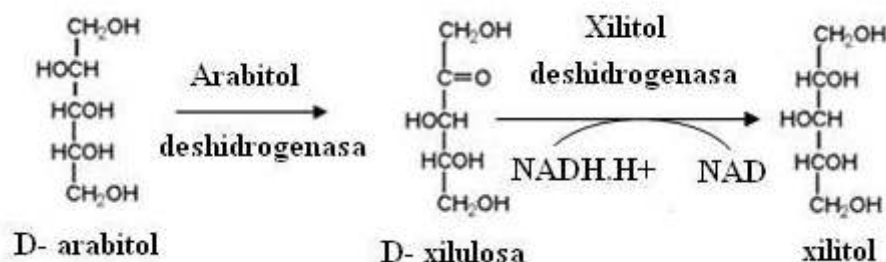


Fig. 4. Esquema enzimático propuesto para la producción de xilitol a partir de D-arabitol por *G. oxydans*. AraDH, D-arabitol deshidrogenasa unida a la membrana; XDH, xilitol deshidrogenasa soluble dependiente de NAD (Tomado y modificado de Suzuki *et al.*, 2002).

también está presente, la cepa utiliza preferentemente glucosa y metaboliza lentamente la xilosa y arabinosa con poca acumulación de alcoholes de azúcar. Como solución a este problema, se desarrolló un proceso de fermentación en dos etapas en que las células reprimidas por glucosa se remueven del cultivo en cuanto la glucosa se ha agotado y el medio es reemplazado con células que crecerán sólo en xilosa. Este método restablece la producción de xilitol. En la práctica, este esquema puede realizarse utilizando una serie de columnas con células inmovilizadas.

Lee *et al.* (2003) suplementaron glucosa como cosustrato, para regenerar el cofactor reducido en los cultivos de *C. tropicalis*. Sin embargo, la adición de glucosa en los cultivos de *C. tropicalis* BN-1, dio como resultado una acumulación de subproductos, tales como etanol y glicerol. Cuando el medio de cultivo fue reemplazado únicamente con xilosa, *C. tropicalis* BN-1 exhibió un incremento significativo en la producción de xilitol y una disminución significativa en la producción de etanol y glicerol. El etanol, que se puede difundir libremente a través de la

membrana celular, no sólo reduce el rendimiento de xilitol, sino que también inhibe de forma no competitiva al sistema de transporte de hexosas, debido a que interfiere con las regiones hidrofóbicas en la membrana celular. El glicerol generalmente se produce durante fermentación anaeróbica, oxidando el exceso de NADH. La disminución en la formación de etanol y glicerol probablemente se debe al consumo de equivalentes reducidos en la reacción de la xilosa reductasa en lugar de la reacción de la alcohol deshidrogenasa o glicerofosfato deshidrogenasa. La acumulación de glicerol y etanol representa un problema serio para la purificación de xilitol a partir de caldos de fermentación.

Por otro lado, Sugiyama *et al.* (2003) demostraron que la adición de etanol a la mezcla de reacción aumenta la producción de xilitol a partir de D-arabitol por *Gluconobacter oxydans*, el cual podría obtenerse a partir de glucosa durante la glucólisis en condiciones anaeróbicas.

Sonderegger y Sauer (2003) observaron que, para la producción de etanol, durante la fase inicial de crecimiento exponencial de la

mutante TMB3001 de *S. cerevisiae* en glucosa, casi no se consumió la xilosa, pero cuando la glucosa se agotó, el crecimiento cesó y la xilosa comenzó a consumirse en una segunda fase.

Yablochkova *et al.* (2003) mencionan que las levaduras utilizan, en primera instancia, las hexosas por la vía de la glucólisis y, por lo tanto, la presencia de glucosa en el medio de fermentación acompañada con D-xilosa, inhibe la producción de xilitol. Los sustratos ricos en glucosa y que contienen cantidades insignificantes de D-xilosa, tales como hidrolizados acidificados de madera de coníferas, son prometedores solo para la producción de etanol por fermentación.

Silva *et al.* (2005) observaron que la presencia de cosustratos para el crecimiento y producción de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, como glucosa y arabinosa, puede favorecer o perjudicar la bioconversión de xilosa a xilitol, dependiendo de sus concentraciones. Mientras que las concentraciones de estos azúcares por debajo de 10 g l^{-1} mejoraron la bioenergética de la bioconversión de xilosa a xilitol, llevada a cabo con un hidrolizado que contenía una cantidad inicial de xilosa de 70 g l^{-1} , concentraciones mayores de glucosa (38 g l^{-1}) y arabinosa (14 g l^{-1}) inhibieron la bioconversión de xilosa a xilitol, llevada a cabo con un hidrolizado que contenía una concentración inicial de xilosa de 80 g l^{-1} .

La variedad de productos químicos de valor agregado producidos por *Escherichia coli* a partir de azúcares simples se ha expandido, incluyendo al xilitol. Esto se logró llevando a cabo una búsqueda de la actividad

in vivo de un número de enzimas heterólogas que producen xilitol. Las xilosa reductasas de *Candida biodinii* (CbXR), *Candida tenuis* (CtXR), *P. stipitis* (PsXR) y *S. cerevisiae* (ScXR), y las xilitol deshidrogenasas de *G. oxydans* (GoXDH) y *P. stipitis* (PsXDH) fueron todas funcionales en varios niveles en *E. coli*. El uso de una mutante de *E. coli* independiente de AMP cíclico (CRP*) facilitó el consumo de xilosa y la producción de xilitol a partir de mezclas de glucosa y xilosa, con la glucosa como sustrato de crecimiento y fuente de equivalentes reductores. (Cirino *et al.*, 2006).

Mussatto *et al.* (2006) observaron que en un medio de cultivo con azúcares simples, el xilitol fue producido por *C. guilliermondii* a partir de xilosa y arabinosa, pero no a partir de glucosa, que fue utilizada únicamente para el crecimiento celular. El xilitol se produjo con el mayor rendimiento y productividad a partir de la xilosa. Consecuentemente, este azúcar fue el sustrato preferencial utilizado por este microorganismo para la producción de xilitol. De acuerdo con los resultados de su trabajo, la presencia de glucosa en el medio de fermentación a una concentración de 1/5 en relación a la concentración de xilosa, fue suficiente para causar una fuerte inhibición en la producción de xilitol por esta levadura. Sin embargo, de acuerdo con Kwon *et al.* (2006) la adición de glucosa a un medio suplementado con xilosa, fue importante para incrementar la productividad de xilitol por *C. tropicalis*. La concentración final de xilitol aumentó a 234 g l^{-1} a las 48 h, en un cultivo fed-batch con xilosa y glucosa, y la

productividad volumétrica de xilitol aumentó a $4.88 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, debido a que la glucosa fue metabolizada en lugar de la xilosa para la producción de biomasa y para el mantenimiento celular.

Por su parte, Sánchez *et al.* (2007) observaron que la ausencia de D-glucosa en los medios de cultivo reducía significativamente las velocidades específicas de producción de xilitol por *C. tropicalis*. Ellos comentan que varios autores han llegado a la conclusión de que la presencia de D-glucosa en el medio de cultivo promueve la transformación de D-xilosa a xilitol por *C. tropicalis*. El rendimiento máximo de xilitol (0.28 g g^{-1}) y el valor máximo de la velocidad de formación específica de este bioproducto fueron alcanzados en el cultivo con una concentración elevada de D-xilosa (24 g l^{-1}) acompañado por una concentración baja de D-glucosa (1 g l^{-1}).

Kumar *et al.* (2009) aislaron células de la levadura *Kluyveromyces* sp. IIPE453 (MTCC 5314), a partir de desechos de bagazo de caña molido. Esta levadura fue capaz de utilizar un amplio rango de sustratos, tales como glucosa, xilosa, manosa, galactosa, arabinosa, sacarosa y celobiosa, tanto para su crecimiento como para la fermentación a etanol. La cepa también mostró producción de xilitol a partir de xilosa. La cepa fue capaz de usar de forma simultánea glucosa y xilosa,

a una concentración de 75 g l^{-1} y 25 g l^{-1} , respectivamente, logrando una concentración máxima de etanol de $38 \pm 0.5 \text{ g l}^{-1}$ y una concentración de xilitol de $14.5 \pm 0.2 \text{ g l}^{-1}$ en fermentación por lotes. Se observó una alta estabilidad de la cepa en fermentación continua, alimentando una mezcla de glucosa (75 g l^{-1}) y xilosa (25 g l^{-1}), recirculando las células, logrando una concentración máxima de etanol de $30.8 \pm 6.2 \text{ g l}^{-1}$ y una concentración de xilitol de $7.35 \pm 3.3 \text{ g l}^{-1}$, con una productividad de etanol de $3.1 \pm 0.6 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una productividad de xilitol de $0.75 \pm 0.35 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, no mencionan en este estudio si la presencia de glucosa en los medios de fermentación tiene algún efecto o relación directa con la producción de xilitol por la levadura.

CONVERSIÓN DE XILOSA A XILITOL

La obtención de xilitol a partir de xilosa involucra varios tipos de microorganismos y varias rutas metabólicas, una es la fermentación de la xilosa por *Pichia quercuum*, para producir ácido xilónico y xilitol al mismo tiempo (Suzuki & Onishi, 1973) (Figura 5), otra es por medio de la isomerización de la xilosa a xilulosa y posteriormente la reducción de la xilulosa a xilitol por dos deshidrogenasas ligadas a un nucleótido de piridina, como se mostró en la Figura 2.

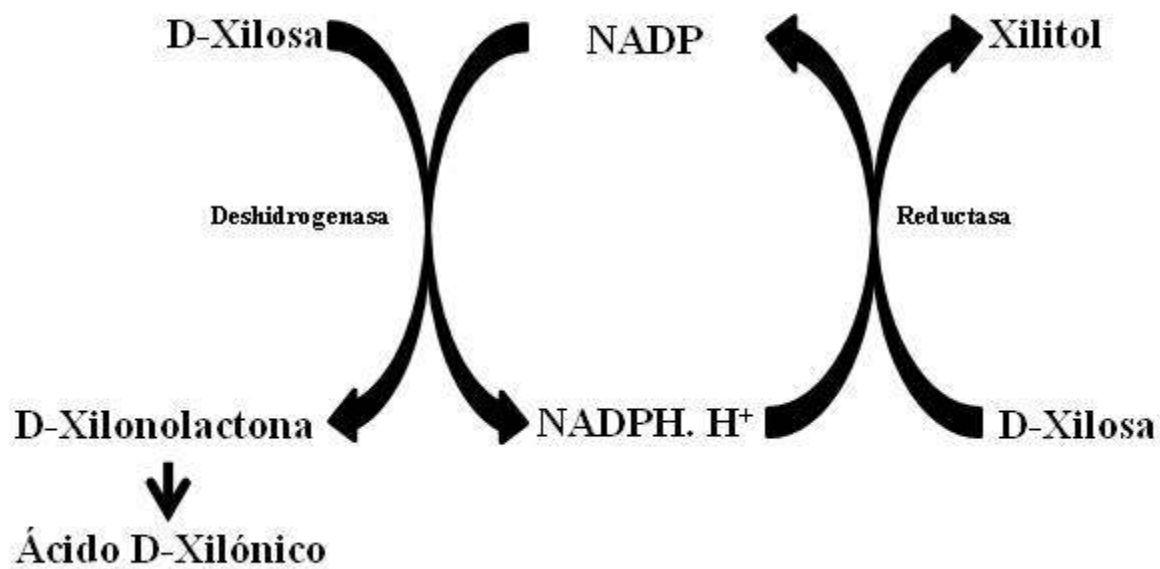


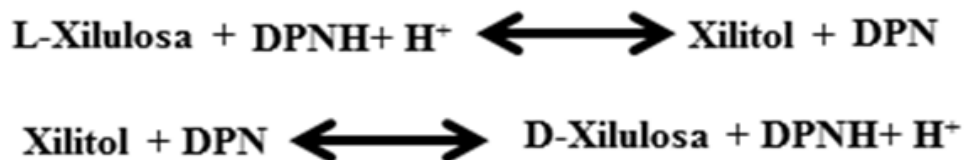
Fig. 5. Mecanismo probable de oxidación y reducción de D-xilosa por *Pichia quercuum*; NADP, Nicotinamida adenindinucleótido fosforilado su forma oxidada; NADPH. H⁺, Nicotinamida adenindinucleótido fosforilado en su forma reducida. (Tomado y modificado de Suzuki & Onishi, 1973).

Isomerización de Xilosa a Xilulosa

A. aerogenes PRL-R3 posee enzimas inducibles para el catabolismo de la D-xilosa y del D-arabitol. La D-xilosa es el inductor de la isomerasa y de la D-xilulokinasa. El D-arabitol es el inductor de la deshidrogenasa del D-arabitol y de una D-xilulokinasa separada (Figura 2) (Wilson & Mortlock, 1972).

Reducción de la Xilulosa a Xilitol

Hickman y Ashwell (1958) reportaron que la L-xilulosa es convertida a D-xilulosa por dos deshidrogenasas ligadas a un nucleótido de piridina, para producir un sustrato común, el xilitol. Las reacciones pueden escribirse como sigue:



DPNH (Difosfonucleótido reducido) DPN (Difosfonucleótido oxidado)

CONCLUSIONES

Las modificaciones en la producción de xilitol usando ingeniería metabólica con *S. cerevisiae* han sido descritas detalladamente en los trabajos de investigación reportados. La captación de glucosa puede inducir la regeneración de NADPH a través de la vía de pentosas fosfato; sin embargo, cuando la D-xilosa es usada como fuente de carbono su captación y metabolismo no es eficiente. Esto sucede debido al hecho de que la D-xilosa no es la fuente de carbono y sustrato preferido por *S. cerevisiae*. Recientemente, se ha desarrollado un trabajo que permite la asimilación de xilosa a través de técnicas de mutación espontáneas; lo cual, abre las puertas y posibilidades que también consideran la producción de bioetanol. En términos de la producción microbiana de xilitol, la prominente o deseada cepa para la producción de xilitol debe tener una xilosa reductasa dependiente de NADH, la cual parcialmente debe de bloquear la regeneración de NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato. En términos de acumulación de xilitol, dos reacciones bioquímicas son importantes: la inhibición de la actividad de la xilitol deshidrogenasa por la concentración intracelular de NADH y la regeneración de NAD. Además, la cepa debe tener un sistema de transporte natural para la D-xilosa y mantener un balance redox intracelular. La mayoría de las cepas del género *Candida* tienen todas estas características. La investigación ha generado nueva información acerca del balance de óxido-reducción de *S. cerevisiae* y *Candida* y acerca de la captación de sustratos

diferentes a la glucosa. El xilitol ha sido definido como un azúcar extraño y está presente en bajas concentraciones en la naturaleza. Aunque la productividad microbiana en las reacciones de reducción para obtener xilitol puede ser incrementada por diferentes métodos de producción (Kwon *et al.*, 2006; Granström, 2002), la reducción química puede ser todavía competitiva en relación a la producción industrial. La aplicación de los hidrolizados de azúcares es uno de los más grandes avances en la síntesis microbiana de compuestos químicos de interés industrial. Sin embargo, la purificación de diferentes azúcares derivados de residuos hemicelulósicos y su aplicación como materia prima para la conversión bioquímica desde un punto de vista industrial, es un punto de investigación actual; debido a su aplicación y escala industrial; nuestro grupo de trabajo, está realizando investigaciones relacionado con la obtención de hidrolizados a partir de residuos lignocelulósicos de agave y tamarindo con la posible aplicación y aprovechamiento de los azúcares fermentables producidos para llevar la fermentación microbiana con la aplicación y uso de levaduras no-convencionales.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece los donativos parciales de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) en sus Convocatorias de Investigación Científica y Tecnológica: 2008, 2009 y 2010.

REFERENCIAS

- Almeida J, Modig T, Röder A, Lidén G & Gorwa-Grauslund M (2008) Pichia stipitis xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnol. Biofuels*. 1: 12.
- Alves LA, Felipe MGA, Almeida e Silva JB, Silva SS & Prata AMR (1998) Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/72: 89-98.
- Aranda-Barradas JS, Delia ML & Riba JP (2000) Kinetic study and modelling of the xylitol production using *Candida parapsilosis* in oxygen-limited culture conditions. *Bioprocess Eng.* 22: 219-225.
- Barbosa MFS, de Medeiros MB, de Mancilha IM, Schneider H & Lee H (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.* 3: 241-251.
- Bruinenberg PM (1986) The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 52: 411-429.
- Bruinenberg PM, van Dijken JP & Scheffers WA (1983) An enzymatic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 965-971.
- Canilha L, Carvalho W, Almeida FM & de Almeida e Silva J (2008) Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Braz. J. Microbiol.* 39: 333-336.
- Carvalho W, Silva SS, Converti A & Vitolo M (2002) Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. *Biotechnol. Bioeng.* 79: 165-169.
- Carvalho W, Silva SS, Vitolo M, Felipe MGA & Mancilha IM (2002) Improvement in Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Achieved by the Use of a Repeated-Batch Immobilized Cell System. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*, Tubingen.
- Carvalho W, Silva SS, Santos JC & Converti A (2003) Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation system. *Enz. Micro. Technol.* 32: 553-559.
- Converti A & Dominguez JM (2001) Influence of Temperature and pH on Xylitol Production from Xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 39-45.
- Converti A, Perego P & Dominguez JM (1999) Xylitol Production from hardwood hemicelluloses hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 82: 141-151.
- Canettieri EV, Almeida E Silva JB & Felipe MGA (2001) Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24: 159-168.
- Cirino PC, Chin JW & Ingram LO (2006) Engineering *Escherichia coli* for xylitol

- production from glucose-xylose mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 1167-1176.
- Chung YS, Kim MD, Lee WJ, Ryu YW, Kim JH & Seo JH (2002) Stable expression of xylose reductase gene enhances xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Micro. Technol.* 30: 809-816.
- Da Silva DDV, de Mancilha IM, da Silva SS & de Almeida Felipe MdasG (2007) Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during cultivate of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50: 207-215.
- Xinghong D & Liming X (2006) Effect of aeration rate on production of xylitol from corncob hemicellulose hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 133: 263-270.
- Diaz J, Cruz JM, Domínguez H & Parajó J (2002) Xylitol Production from *Eucalyptus* Wood Hydrolysates. *Food Technol. Biotechnol.* 40: 191-197.
- Dominguez JM (1998) Production in free and immobilized *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Lett.* 20: 53-56.
- Dominguez JM, Cao NJ, Krishnan MS, Gong CS & Tsao GT (1997) Xylitol production from hybrid poplar wood chips pretreated by the ammonia steeping process. *Biotechnol. Tech.* 11: 339-341.
- Faria LF, Gimenes MA, Nobrega R & Pereira N Jr (2002) Improvement of Xylitol Production by Controlling Oxygen Supply in *Candida parapsilosis*. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 267-270.
- Felipe MGA, Mancilha I, M, Vitolo M, Roberto IC, Silva SS & Rosa SA (1993) Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolyzate of hemicellulose obtained from sugarcane bagasse. *Arq. Biol. Technol.* 36: 103-114.
- Girio FM, Roseiro JC, Sa-Machado P, Duarte-Reis AR & Amaral-Collaco MT (1994) Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 1074-1078.
- Gong CH, Chen LF & Tsao GT (1981) Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnol. Lett.* 3: 130-135.
- Gombert A K, dos Santos MM, Christensen B & Nielsen J (2001) Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J. Bacteriol.* 183: 1441-1451.
- Granström T (2002) Biotechnological production of xylitol with *Candida* yeasts, PhD thesis, Helsinki University of Technology, Finland.
- Hallborn J, Walfridsson M, Airaksinen U, Ojamo H, Hahn-Hägerdal B, Penttilä M & Keränen S (1991) Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology.* 9: 1090-1095.
- Hallborn J, Gorwa MF, Meinander N, Penttilä M, Keränen S & Hahn-Hägerdahl B (1994) The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing XYL1 gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 326-333.

- Härkönen M & Nuojua P (1979). Eri tekijöiden vaikutus ksyloosin katalyyttiseen hydraukseen ksylytoliksi. *Kemia-Kemi*. 6: 445-447.
- Hickman J & Ashwell GJ (1958) Purification and properties of D-xylulokinase in liver. *J Biol. Chem.* 232, 737.
- Jeffries T. W. 1984. Mutants of *Pachysolen tannophilus* showing enhanced rates of growth and ethanol formation from D-xylose. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 254-258.
- Johansson B & Hahn-Hagerdal B (2002). The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Res.* 2: 277-282.
- Kastner J, Roberts R & Jones W (1996). Effect of xylitol on the metabolism and viability of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* 18: 31-34.
- Kim JH, Han KC, Koh YH, Ryu YW & Seo JH (2002) Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 16-9.
- Kwon SG, Park SW & Oh DK (2006) Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 13-18.
- Kötter P, Amore R, Hollenberg CP & Ciriacy M (1990) Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Curr. Genet.* 18: 493-500.
- Kötter P & Ciriacy M (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 776-83.
- Kuyper M, Harhangi HR, Stave AK, Winkler AA, Jetten MSM, de Laat WTAM, den Ridder JJJ, Op den Camp HJM, van Dijken JP & Pronk JT (2003) High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4: 69-78.
- Kumar S, Singh S P, Mishra IM & Adhikari DK 2009 Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces sp.* IPE453. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1483-1489.
- Kwon SG, Park SW & Oh DK (2006) Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 13-18.
- Leathers TD (2003) Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. MiniReview. *FEMS Yeast Research.* 3: 133-140.
- Lee JM (1992) Biochemical engineering. Washington State University. Prentice Hall, New Jersey.
- Lee JK, Koo BS & Kim SY (2003) Cloning and characterization of the *xyl1* gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6179-6188.

- López F, Delgado OD, Martínez MA, Spencer JF & Figueroa LI (2004) Characterization of a new xylitol-producer *Candida tropicalis* strain. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 85, 281-286.
- Lohman RL (1957) The polyols. In: Pigman W (ed) The carbohydrates: chemistry, biochemistry and physiology. Academic, New York, pp 245-246.
- Mayerhoff Z, Roberto I & Silva S (1997) Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotechnol. Lett.* 19: 407-409.
- Mäkinen KK (1992) Dietary prevention of dental caries by xylitol clinical effectiveness and safety. *J. App.I Nutr.* 44: 16-28.
- Mäkinen KK (2000) The rocky road of xylitol to its clinical application. *J. Dent. Res.* 79: 1352-1355.
- Meinander NQ, Boels I & Hahn-Hängerdal B (1999) Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without overexpression of TAL1. *Biores. Technol.* 68: 79-87.
- Mellinghoff CH (1961) Über die verwendbarkeit des xylit als ersatzzucker bei diabetikern. *Klin Wochenschr.* 39: 447.
- Minard KI, Jennings GT, Loftus TM, Xuan D & McAlister-Henn L (1998) Sources of NADPH and expression of mammalian NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 31486-31493.
- Mussatto S, Dragone G & Roberto I (2005) Kinetic Behavior of *Candida guilliermondii* Yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. *Biotechnol. Prog.* 21: 1352-1356.
- Mussatto SI & Roberto IC (2001) Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* 23: 1681-1684.
- Mortlock RP, Fossitt DD & Wood WA (1965) A basis for utilization of unnatural pentoses and pentitols by *Aerobacter aerogenes*. *Biochemistry.* 54: 572-579.
- Mussatto SI, Silva CJS & Roberto IC (2006) Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 681-686.
- Nigam P & Singh D (1995) Process for fermentative production of xylitol-a sugar substitute. *Proc. Biochem.* 30: 117-124.
- Nobre A, Duarte L, Roseiro J & Gírio FA (2002) Physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose- and oxygen-limited chemostats volume. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 509-516.
- Nobre A, Lucas C & Leão C (1999) Transport and Utilization of Hexoses and Pentoses in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3594-3598.
- Nolleau V, Preziosi_belloy L, Delgenes JP & Navarro JM (1993) Xylitol production from

- xylose by two yeast strains- Sugar tolerance. *Current Microbiol.* 27: 191-197.
- Onishi H & Suzuki T (1966) The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by yeasts. *Agric. Biol. Chem.* 30: 1139-144.
- Onishi H & Suzuki T (1969) Microbial production of xylitol from glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 18: 1031-1035.
- Ooi BG, Le TTB & Markuszewski BM (2002) The effects of glucose on the yeast conversion of xylose into xylitol by *C. guilliermondii* and *C. tropicalis*. *EJEAFChe*, 1: 189-202.
- Preziosi-Belloy L, Nollet V & Navarro JM (2000) Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* 22: 239-243.
- Preziosi-Belloy L, Nollet V & Navarro JM (1997) Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 124-129.
- Rao RS, Prakasham RS, Krishna Prasad K, Rajesham S, Sarma PN & Venkateswar Rao VL (2004) Xylitol production by *Candida sp.*: parameter optimization using Taguchi approach. *Proc. Biochemistry.* 39: 951-956.
- Rao RS, Jyothi CP, Prakasham RS, Rao CS, Sarma PN & Rao LV (2006) Strain Improvement of *Candida tropicalis* for the Production of Xylitol: Biochemical and Physiological Characterization of Wild-type and Mutant Strain CT-OMV5. *J. Microbiol.* 44: 113-120.
- Rao RS, Pavana C & Rao LV (2008) Biotechnological production of xylitol by mutant *Candida tropicalis* OMV5: Process optimization using statistical approach. *Indian J. Biotechnol.* 7: 218-224.
- Rao RS, Prakasham RS, Krishna K, Rajesham S, Sarma Venkateswar PN & Rao VL (2004) Xylitol production by *Candida sp.*: parameter optimization using Taguchi approach. *Proc. Biochemistry.* 39: 951-956.
- Roberts IC, Mancinho IM & de Sato S (1999) Influence of kLa on bioconversion of rice straw and hemicellulose hydrolysate hydrolyrate to xylitol. *Bioproc. Eng.* 21: 505-508.
- Rosa SMA, Felipe MGA, Silva SS & Vitolo M (1998). Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70-72: 127-135.
- Sampaio F, Mantovani H, Vieira F, Alencar C, Converti A & Lopes F (2005) Bioconversion of D-xylose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. *Proc. Biochemistry.* 40: 3600-3606.
- Scoog K & Hahn-Hägerdal B (1990) Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3389-3394.
- Sánchez S, Bravo V, Moya A, Castro E & Camacho F (2004) Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. *Proc. Biochemistry.* 39: 673-679.
- Sang-Yong K, Jung-Hoe K & Deok-Kun O (1997) Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida*

- parapsilosis*. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 267-270.
- Sánchez S, Bravo V, García JF, Cruz N & Cuevas M (2007) Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 709-716.
- Senac T & Hahn-Hagerdal B (1990) Intermediary metabolite concentrations in xylulose- and glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 120-126.
- Silva SS, Matos ZR & Carvalho W (2005) Effects of sulfuric acid loading and residence time on the composition of sugarcane bagasse hydrolysate and its use as a source of xylose for xylitol bioproduction. *Biotechnol. Prog.* 21: 1449-1452.
- Sonderegger M & Sauer U (2003) Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1990-1998.
- Sugai JK & Delgenes JP (1995) Catabolite repression of inductin fo aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*. *Current Microbiol.* 31: 239-244.
- Sugiyama M, Suzuki SI, Tonouchi N & Yokozeki K (2003) Cloning of the xylitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* and improved production of xylitol from D-arabitol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 584-591.
- Suzuki T & Onishi H (1973) Oxidation and reduction of D-xylose by cell-free extract of *Pichia quercuum*. *Appl Environ Microbiol.* 25: 850-852.
- Suzuki S, Sugiyama M, Mihara Y, Hashiguchi K & Yokozeki K (2002) Novel enzymatic method for the production of xilitol from D-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2614-2620.
- Sonderegger M, Jeppsson M, Hahn-Hagerdal B & Sauer U (2004) Molecular basis for anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* on xylose, investigated by global gene expression and metabolic flux analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2307-2317.
- Tadaa K, Horiuchi JI, Kannob T & Kobayashia M (2004) Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 228-230.
- Tavares JM, Duarte LC, Amaral-Collaço MT & Gírio FM (2000) The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enzyme Microbial. Technol.* 26: 743-747.
- Van Zyl C, Prior BA, Kilian SG & Brandt EV (1993) Role of D-ribose as a cometabolite in D-xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1487-1494.
- Verho R, Londesborough J, Penttila M & Richard P (2003) Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5892-5897.
- Villarreal MLM, Prata AMR, Felipe MGA & Almeida e Silva JB (2006) Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 17-24.
- Walfridsson M, Hallborn J, Penttilä M, Keränen S & Hahn-Hägerdal, B (1995) Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4184-4190.
- Walker GM (1998) Yeast physiology and biotechnology. pp. 350. West Sussex: John Wiley and Sons Ltd.
- Wilson BL & Mortlock RP (1973) Regulation of D-xylose and D-arabitol catabolism by *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 113: 1404-1411.
- Winkelhausen E, Amartey SA, Kuzmanova S (2004) Xylitol production from D-xylose at different oxygen transfer coefficients in a batch bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 4, 150-154.
- Yablochkova EN, Bolotnikova O., Mikhailova NP, Nemova NN & Ginak AI (2003) Specific features of fermentation of D-xylose and D-glucose by xylose-assimilating yeasts. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39: 265-269.
- Yahashi Y, Hatsu M, Horitsu H, Kawai K, Suzuki T & Takamizawa K (1996) D-glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on a non-woven fabric. *Biotechnol. Lett.* 18: 1395-1400.