

PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE SABORES, PIGMENTOS Y AROMAS A PARTIR DE HONGOS MICELIALES Y LEVADURAS

G. Reyes-González, M. Franco-Correa

*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 No. 43-82 Bogotá, Colombia
ginrey11@hotmail.com, franco@javeriana.edu.co*

RESUMEN

La obtención biotecnológica de compuestos biológicos con interés farmacológico ha adquirido un gran interés debido a que los procesos de síntesis química terminan siendo dispendiosos y contaminantes. El crecimiento del mercado de sabores, fragancias y pigmentos para el uso en alimentos, bebidas, cosméticos y detergentes, requiere nuevas estrategias de producción que no sean nocivas para el medio ambiente. Este cambio de mentalidad se basa en la idea de una nutrición sana, natural y económica, debido a que las fuentes de estos compuestos al ser de origen biológico son menos costosas y de fácil acceso. Los hongos por presentar un alto crecimiento y desarrollo, permiten que a través del metabolismo primario de fuentes precursoras, se logre la obtención de sus metabolitos secundarios, como sustancias de interés industrial por medio de procesos biotecnológicos, lo cual ha generado una alta expectativa en su uso. Como objetivo de esta revisión se pretende acercar al lector a una visión actualizada de numerosas e interesantes posibilidades de bioproducción de sustancias utilizadas en la industria como carotenoide, 6-pentil-á-pirona-2-feniletanol (2-PE) entre otros.

Palabras clave: bioproducción, colorantes, extracción, hongos, sabores.

ABSTRACT

The biotechnological generation of compounds which are of pharmaceutical interest has attracted a lot of interest because the processes of chemical synthesis are expensive and a source of pollutants. The growth of the market of flavors, fragrances and pigments used in foods, drinks, cosmetic and detergents requires new strategies that are less harmful to the environment. This change of mentality is based on the idea of healthy, natural and less expensive nutrition, and since the sources of these compounds are of biological origin, they are of less expensive and of easy access. The fungi, because of their high rates of growth and development, make possible, through the primary metabolism of precursor sources, the production, by means of biotechnical process, of secondary metabolites which are substances of industrial interest, which has generate great expectation for their use. The objective of this review is give to the reader an up-to-date vision of the numerous and interesting possibilities for the bioproduction of substances used in the industry, such as carotenoids, 6-pentil-á-pyrro-na-2-phenilethanol, among others.

Key words: bioproduction, colorants, extraction, flavors, fungus.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento e identificación de aromas, colorantes y sabores, hacen que el área de productos naturales sea la de mayor crecimiento dentro del campo de la química orgánica mediante el uso de la biotecnología y bioingeniería. Los microorganismos constituyen una de las fuentes menos estudiadas, ofreciendo grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras y actividades biológicas (Brizuela *et al.*, 1998).

Los carotenoides por ejemplo son pigmentos orgánicos que ocurren de forma natural en plantas y otros microorganismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. La obtención de estos compuestos a partir de hongos es útil en la elaboración de numerosos productos alimenticios (Hui *et al.*, 2005). El mercado de los aromas extraídos de estos microorganismos ha evolucionado en los últimos años, debido a que los procesos físicos utilizados en la elaboración de alimentos causan pérdida de estos compuestos volátiles requiriendo de una suplementación posterior (Krings y Berger, 1998). Los sabores obtenidos de microorganismos además de asegurar una nutrición sana mejoran las propiedades organolépticas de los alimentos como en el caso de compuestos sulfurados en la elaboración y maduración del queso, entre otros (Berger *et al.*, 1999).

COLORANTES

Los hongos filamentosos tienen importantes propiedades en la producción de alimentos y productos medicinales. Su potencial bioquímico y su adaptación a condiciones de vida extremas en medios líquidos hacen que se explote industrialmente la producción de estas moléculas.

Existen varios géneros de hongos implicadas en la producción de colorantes como *Monascus* sp, el cual produce pigmentos amarillos llamados monascina y ankaflavina, naranjas como monascorubrin y rubropuctatín y rojos como monascorubramina y rubropuctamina. Estos pigmentos se usan para colorear arroz, vino, queso, pescado y carnes principalmente en China, Taiwan, Japón e Indonesia. Hajjaj *et al.* (2000) aseguran que *Monascus ruber* produce pigmentos rojos al igual que la citrinina la cual se clasifica como una micotoxina nefrotóxica. Wang *et al.* (2005) resaltan que la producción de los pigmentos es independiente a la producción de citrinina. En el estudio de Hajjaj *et al.* (2000) se evidencia que la producción de pigmentos y citrinina aumenta durante la fase inicial del cultivo y luego decrece para los dos compuestos. La adición de ácidos orgánicos como el L-málico y el succínico inhiben la producción de los pigmentos.

Carotenoides

Los carotenoides son una clase de pigmentos naturales, generalmente encontrados en plantas, algas y bacterias fotosintéticas que son utilizados como aditivos y colorantes en la elaboración de mantequilla, quesos, dulces, helados, entre otros.

Georgiou *et al.* (2001) proponen que los β -carotenos producidos por *Sclerotium rolfsii* se forman posiblemente para reducir la tensión que se produce cuando el hongo se cultiva en condiciones de luz pero también oscuridad. La máxima producción de β -carotenos es de aproximadamente 50-60 nmol/g de peso seco. Rodríguez *et al.* (2004) afirman que *Blakeslea trispora* es otro microorganismo que sintetiza β -carotenos y que la clonación de los genes *carRA* y *carB* de este hongo puede ser utilizada para alterar la expresión genética de algunas cepas, logrando producir β -carotenos.

Thraustochytrium sp, ha sido aislado de ambientes marinos tropicales y subtropicales; es sintetizador de β -carotenos, astaxantina, fenocoxantina, cantaxantina, y equinenona en medio YPG a determinadas intensidades de luz. La identificación de estos carotenoides producidos por *Thraustochytrium* sp se realiza mediante HPLC utilizando como fase móvil la mezcla hexano, tetrahydrofurano, 2-propanol, trietilamina (77:17:3:3) y RMN (resonancia magnética nuclear) (Yamaoka *et al.*, 2004). *Phycomyces* sp también produce β -carotenos aunque en cantidades pequeñas, aproximadamente 0.05 mg/ g de peso seco (Cerdá, 2001).

La astaxantina (3,3-dihidroxi- β -caroteno-4,4-diona) es un pigmento rojo-rosado que está adquiriendo interés en la industria piscícola (colores de salmones y crustáceos), es el ingrediente más costoso utilizado en esta industria además de tener propiedades antioxidantes y anticancerígenas. La astaxantina es sintetizada químicamente pero sus costos son muy elevados, es por esto que se han estudiado algunos microorganismos capaces de producir este compuesto optimizándoles niveles de glucosa, oxígeno y fosfato, además adicionando estimulantes químicos como el etanol y últimamente realizando manipulación genética para que las cantidades obtenidas sean mayores. La levadura *Phaffia rhodozyma* o *Xanthophyllomyces dendrorhous* (estado perfecto) es un microorganismo que produce altas concentraciones de este metabolito, considerado como una excelente fuente de astaxantina cuando es estimulada sinérgicamente por *Epicoccum nigrum*, este microorganismo acumula carotenoides en concentraciones de 500-2000 mg, de la cual entre el 45 y 95% corresponde a astaxantina (Echavari *et al.*, 2004). Según Hui *et al.* (2005) el β -caroteno es un importante intermediario en la biosíntesis de la astaxantina y frecuentemente coexisten, también resalta que los

carotenoides se pueden analizar por HPLC, pero debido a que es un método dispendioso se pueden analizar por medio de espectrofotometría. En este estudio las concentraciones de astaxantina y β -carotenos a las 18 horas de cultivo son del mismo nivel, de 18-36 horas la concentración de astaxantina incrementa levemente y la concentración de β -carotenos alcanza su máximo valor de 0.5 mg/l a las 30 horas. De las 36-54 horas la producción de astaxantina incrementa a 4.5 mg/l y la de β -carotenos decrece. Las concentraciones se determinan en un rango de 360–520 nm. Otros estudios como el de Visser *et al.* (2003) señalan que la carotenogénesis en algunas cepas de *X. dendrorhous*, cuya producción es foto-inducible especialmente bajo el estímulo de la luz azul, se ve disminuida por el exceso de esta luz.

AROMAS

Los aromas y fragancias utilizadas en la industria de alimentos, productos de limpieza y cosméticos tienen gran interés comercial y muchas de ellas se sintetizan químicamente mediante largos procesos de producción generando contaminación ambiental. Es por esto que se han buscado alternativas biotecnológicas para la obtención de estos productos, mediante el uso de microorganismos (Krings y Berger, 1998).

Trichoderma sp es uno de los géneros que poseen la habilidad de producir ciertos aromas utilizados en la industria de alimentos. Un ejemplo de lo anterior es el 6-pentil- α -pirona (6PP), un compuesto con aroma a coco. Bonnarme *et al.* (1997) señalan que *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* tienen la habilidad de producir este compuesto en concentraciones de 19 mg/l y 376 mg/l respectivamente, a partir de aceites vegetales como el aceite de castor, el cual incrementa la producción de 6PP y reduce su toxicidad. El compuesto es ex-

traído mediante un sistema de dos fases acuosas como lo hace Palomares (2000) a partir de una cepa de *T. harzianum*, en el cual utilizan como fases acuosas el polietileno glicol (PEG) y fosfato, estimando la concentración del metabolito que genera la biomasa producida y el aroma, separado mediante cromatografía de gases y la técnica de peso seco, respectivamente. A nivel de laboratorio se obtienen entre 15–50 ml del metabolito y en un fermentador el rendimiento aumenta en un 25%. *T. harzianum* se encuentra en la fase fermentativa y el metabolito genera el aroma en la fase extractiva, permitiendo disminuir el efecto de inhibición que presenta el 6-pentil-alfa-pirona sobre el microorganismo. Según Bonnarne *et al.* (1997), la molécula 6PP, presenta actividad antimicrobiana ya que tiene cierta toxicidad en la membrana celular.

Ceratocystis fimbriata al igual que *C. moniliformis* son otra clase de hongos utilizados en la producción de aromas debido a su crecimiento rápido y a la variedad de compuestos aromáticos sintetizados. *C. fimbriata* a partir de un cultivo sólido con cascarilla y pulpa de café como fuente de carbono, genera compuestos aromáticos frutales como acetato de etilo, etanol y acetaldehído principalmente (Bluemke *et al.*, 2003). *Ceratocystis moniliformis* crece rápidamente y sintetiza gran cantidad de compuestos como permeato de etilo, acetato de etilo, acetato de propilo y alcohol isoamílico entre otros. Estos compuestos son extraídos por preevaporación y analizados por cromatografía de gases (Bluemke, 2003).

El aroma a rosas es muy utilizado en la elaboración de perfumes y cosméticos. El 2-feniletanol (2-PE) es un compuesto aromático con olor a rosas. Su producción sintética no difiere significativamente de la natural. Estchmann *et al.* (2002) señalan una gran variedad de microorganismos pro-

ductores de este compuesto entre los que se encuentran: *Phenillus ignarius*, *P. laevigatus* y *P. tremulae*, pero los microorganismos más prominentes en producción son las levaduras, entre las que se encuentran *Saccharomyces vini* y *Torulopsis utilis* produciendo 12 mg/l de 2-feniletanol en 7 días. Otros microorganismos son *Pichia fermentans* L-5, con 453 mg/l en 16 horas; *Kloeckera saturnus* con 1.7 g/l en 24 horas y *S. cerevisiae* Giv 2009 que alcanza concentraciones de 2.35 g/l en 48 horas.

En la industria de los quesos se ha usado una gran variedad de microorganismos para efectos del sabor y aroma. Para esto se han utilizado asociaciones microbianas entre *Geotrichum candidum*, bacterias como *Corynebacterium* sp y algunas levaduras como *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolitica* entre otras asociaciones que producen compuestos sulfurados aromáticos. Estos son extraídos, analizados y comparados con aromatizantes comerciales. La optimización de esos métodos analíticos genera grandes resultados debido a que las sustancias son fácilmente detectables en los medios de cultivo. Asociando *K. lactis* con una bacteria, se producen ésteres y alcoholes en cantidades relativamente grandes. *Y. lipolitica* en asociación con bacterias produce compuestos aromáticos como 2-propanol, cetonas como 2-butanona entre otros. *Geotrichum candidum* produce compuestos sulfurados que al interactuar con las sustancias producidas por *Yarrowia lipolitica* hace que el nivel de estos compuestos aumente y los aromas se intensifiquen en el producto (Martin *et al.*, 2001).

SABORES

En la industria, uno de los usos más conocidos de los microorganismos productores de sabores es en bebidas alcohólicas, estas fermentaciones dan como resultado etanol, CO₂ y otras sustancias que ayudan a extraer el sabor de los componentes de las

uvas, producir enzimas y metabolitos secundarios. El principal microorganismo implicado es *Saccharomyces cerevisiae*, encontrándose otros géneros como *Candida* sp y *Hanseniaspora* sp los cuales se caracterizan por presentar tolerancia a altas concentraciones de etanol (Graham, 2003). Lilly *et al.* (2000) concluyen que los alcoholes y ésteres derivados de la fermentación como acetato de alquilo, contribuyen significativamente a la presencia de aromas frutales en vinos.

El ácido cítrico es ampliamente utilizado en la industria de alimentos para la producción de bebidas no alcohólicas, sales efervescentes y medicinas, para el plateado de espejos y como aditivo en las tintas. El 99% del ácido cítrico mundial es producido por fermentación con algunas bacterias y hongos. *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *A. clavatus*, *Penicillium citrinum* y *Mucor piriformis* son microorganismos típicos usados en su producción (Ghassempour *et al.*, 2003). Para su obtención se utilizan fuentes de carbono como sacarosa, glucosa, fructosa entre otros. En el trabajo de Bizukojc y Ledakowicz (2004) se estudia si la glucosa y fructosa obtenidas por hidrólisis de la sacarosa son fuentes de carbono equivalentes para *Aspergillus niger*, concluyendo que la utilización de la fructosa es inhibida por concentraciones elevadas de ácido cítrico y que esto está ligado probablemente con la interferencia del ácido cítrico en el sistema de transporte de la fructosa. En el trabajo de Sánchez *et al.* (2004) se describe una alternativa diferente para la producción de ácido cítrico a partir del suero de la leche, en cultivo sumergido con hongos del género *Aspergillus* sp, con miras al aprovechamiento de este subproducto que es uno de los principales desechos de la industria láctea. Los autores concluyen que este medio de cultivo proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo del hongo así como para la biosíntesis de ácido cítrico, aunque *A.*

niger no asimila adecuadamente la lactosa del suero de leche. Este ácido se puede determinar mediante análisis gravimétricos, cromatografía de gases, espectrometría de masas, potenciometría y biosensores, siendo la HPLC y métodos espectrofotométricos los más utilizados (Ghassempour *et al.*, 2003).

En la industria quesera es muy frecuente el uso de microorganismos para mejorar las características organolépticas del producto, es el caso de *Leptographium procerum*, que además mejora el sabor de algunas salsas y cereales. Estos sabores son producidos por hidrólisis del RNA de las levaduras mediada por enzimas como la 5-fosfodiesterasa producida por el hongo, el cual se cultiva en agar extracto de levadura y sus metabolitos se analizan por HPLC (Steensma *et al.*, 2004). La especie *Geotrichum candidum* es igualmente utilizada en la industria quesera debido a la producción de sabores sulfurados asociados con la producción de metan-etiol (MTL). Berger *et al.* (1999) encontraron que cultivando el hongo en medio PDA y posteriormente en un medio líquido de queso, se produce MTL y otros derivados como tioacetato de S-metilo, tiobutirato de S-metilo, trisulfito de dimetilo entre otros, los cuales son analizados por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas. También se analizó que el uso de esta cepa junto con *Penicillium camemberti* confiere un sabor más típico que el obtenido sólo con *G. candidum*. Otro hongo utilizado en asociación con *P. camemberti*, es *Penicillium caseifulvum*, cultivado y fermentado en medio Czapek, mediante el cual se logra extraer compuestos sulfurados entre los que se encuentran: 2-metil-1-propanol, 2-pentanona, 3-metil-1-butanol, 2-heptanona y 2-undecanona principalmente (Ostenfeld 1999). Park (1999), en su artículo confirma lo presentado por Ostenfeld, (1999), señalando que *P. roquefortii* utilizado en la elaboración del queso azul, también produce

2- alcanonas, estos compuestos son extraídos de microcápsulas que contienen las esporas del hongo y posteriormente son analizados por cromatografía de gases.

En el trabajo de Lomascolo *et al.* (2000) realizado en el Laboratorio de Biotecnología de los Champiñones y el Centro Superior de Biotecnología de Francia, se considera que el uso biotecnológico de hongos filamentosos para producir sabores ha adquirido gran interés, ya que estos sabores son definidos como naturales y considerando el incremento de la producción de sabores por procesos biotecnológicos se ofrece una alternativa viable como fuente de diversas sustancias. La vainillina es obtenida usando hongos con habilidades complementarias de bioconversión como *Aspergillus niger* que transforma el ácido ferúlico a ácido vainílico y, *Phanerochaete cinnabarinus* y *P. chrysosporium* que transforman el ácido vainílico a vainillina, logrando recuperar más de 200 mg de vainillina (Lomascolo *et al.*, 2000). Priefert *et al.* (2001) coinciden con Lomascolo *et al.* (2000) en que *A. niger* interviene en la bioconversión del ácido ferúlico, en este estudio *A. niger* produce 3.6 g/l de ácido vainílico, *Phanaerochaete chrysosporium* produce 0.628 g/l de vainillina y *P. cinnabarinus* 0.481 g/l de la misma.

Los metabolitos producidos por hongos seguirán abriéndose paso en el mercado, ya que numerosos estudios acreditan su efectividad logrando competir con las sustancias sintetizadas químicamente en calidad y aportando significativamente en la disminución de la contaminación ambiental.

LITERATURA CITADA

- BERGER, C, KHAN, J.; MOLIMARD P.; MARTIN N.; SPINNLER, H. 1999. Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 5510-5514.
- BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. 2004. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochem* 39: 2261-2268.
- BLUEMKE, W. 2003. Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. *International journal of food microbiology* 86: 11-22.
- BONNARNE, P.; DJIAN, A.; LATRASSE, A.; FERON, G.; GINIES, C.; DURAND, A.; LE QUERRE, L. 1997. Production of 6-pentyl-alfa-pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *Journal of Biotechnology* 56:143-150.
- BRIZUELA, M.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. 1998. Basidiomicetes: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista. Iberoamericana de Micología* 15: 69-74.
- CERDA, E. 2001. *Phycomyces* and the biology of light color. *FEMS microb. Reviews* 25: 503-512.
- DEMIREL, G.; VAYKASCI, K.; YASAR, A. 2005. The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. *Food chemistry* 89: 393-396.
- ETSCHMANN, M.; BLUEMKE, W.; SELL, D. and SCHRADER, J. 2002 Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microb Biotech.* 59: 1-8.
- ECHAVARRI, C.; JOHNSON, A. 2004. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast

- Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS yeast research* 4: 511-519.
- GHASSEPOUR, A.; MASHKOURI, N.; AMIRI, A. 2003. Determination of citric acid in fermentation media by pyrolysis mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrolysis* 70: 251-561.
- GEORGIU, C.; ZERVOUDAKIS, G.; TAIRIS, N.; KORNAOS, M. 2001. Carotene production and its role in sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*. *Fungal genetics and biology* 34: 11-20.
- Graham, F. 2003. Yeast interaction and wine flavour. *Internat. Journal of Food Microbial* 86:11-22.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J.; GOMA, G. and LOUBIERE, P. 2000. Kinetic analysis and red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme microbiol and technol* 27: 619-625.
- HUI, H.N.; GUO-QUING, R.; HUI, CHEN QI-BE; FENG, C. 2004. Application of derivate ratio spectrophotometry for determination of B-carotene and Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. *Journal of Zhejiang University Science* ISSN 1009-3095.
- KRINGS, U.; BERGER, R. 1997. Biotechnological production of flavors and fragrances. *Appl Microb and Biotech* 49: 1-8.
- LOMASCOLO, A.; STENTELAIRE, C.; ASTHER, M.; LESAGE, L. 2000. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Enzyme and microb, technol* 26: 235-314.
- LILLY, M.; LAMBRECHTS, M.; PRETORIUS, I. 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl and Environ Microb* 744-753.
- MARTIN, N.; BERGER, C.; DU, C.; SPINNIER, H. 2001. Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. *J Dairy Sci* 84: 2125-2135.
- OSTENFELD, T. 1999. Volatile flavour production by *Penicillium caseifulvum*. *Internat. Dairy Journal* 8: 883-887.
- PARK, O. 1999. Production of flavour ketones in aqueous organic two phases systems by using free and microencapsulated fungal spores as biocatalyst. *Trends and biotechnol* 17: 282-289.
- PALOMARES, M. 2000 Recuperación de aromas mediante sistemas de extracción de dos fases acuosas. *Transferencia* 13, No. 50.
- PEDRONI, P.; CHRISTEIN, S.; ROUSSOS, GERN J.; SOCCOL, C. 2003. Coffe residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microb* 34: 245-248.
- PRIEFERT, H.; RABENHOST, J.; STEINBUCHER, A. 2001. Biotechnological production of vainillin. *Appl Microb Biotech* 56: 296-314.
- RODRÍGUEZ, M.; B. PAZ, DE LA FUENTE, J.; LÓPEZ, M.; CABRI, W. AND BARREDO, J. 2004. *Blakeslea trispora* genes for carotenoid biosynthesis. *Appl Environ Microb* 5589-5594.
- SÁNCHEZ, O.; ORTIZ, M.; BETANCOURT, A. 2004. Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con

Aspergillus sp. *Rev Colomb Biotechnol* 6: 43-53.

STEENSMA, A.; DJICK, M.; HEMPENIUS, R. 2005. Safety evaluation of phosphodiesterase derived from *Leptographium procerum*. *Food and chemical toxicology* 43: 1567.

VISSER, H.; OUYEN, A.; VERDOES, J. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin biosynthetic pathway of *Xantolophyllum dendrorhous*. *FEMS yeast research* 4: 221-231.

WANG, Y.; JU, X.; ZHOU, Y. 2005. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food microbiol* 22: 145-148.

YAMAOKA, Y.; CARMONA M.; OOTA, S. 2004. Growth and Carotenoid production of *Thraustochytrium* sp CNH-1 Cultured under superbright red and blue light-emitting diodes. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 68 (7): 1594-1597.

Recibido: 15.11.2005

Aprobado: 31.08.2006