

300627



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

21  
2er

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**PULULANA,  
UN BIOPOLIMERO UTIL PARA SUBSTITUIR  
POLIMEROS SINTETICOS**

**TRABAJO ESCRITO VIA  
EDUCACION CONTINUA**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACENTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:**

**GEORGINA VARGAS AYALA**

**UNIVERSIDAD LA SALLE A.C.**



**MEXICO, D. F.**

**1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE PROF. PEDRO VALLE VEGA**

**VOCAL PROF. OLGA VELÁZQUEZ MADRAZO**

**SECRETARIO PROF. MARIA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ**

**1er SUPLENTE PROF. FERNANDO LUIS MALANCO COVARRUBIAS**

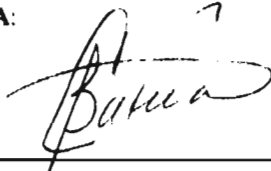
**2do SUPLENTE PROF. HILDA ELIZABETH CALDERON VILLAGÓMEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA**

**ASESOR DEL TEMA:**



---

**DRA. MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMINGUEZ**

**SUSTENTANTE:**



---

**GEORGINA VARGAS AYALA**

**A MIS PADRES**

**A MI HERMANA CLAUDIA**

**A MI ESPOSO**

**A MI HIJA**

**A MI ASESORA, DRA. MARIA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ**

**AL DR. JOSÉ DOMINGO MENDEZ FRANCISCO**

**A MIS MAESTROS**

**GRACIAS POR TODO SU APOYO Y ENSEÑANZAS.**

## ÍNDICE

### RESUMEN

1.	GENERALIDADES .....	1
	1.1 Introducción .....	3
	1.2 Organismos productores .....	5
2.	ESTRUCTURA PROPIEDADES .....	9
	2.1 Estructura .....	9
	2.2 Propiedades .....	14
	2.2.1 Propiedades físicas .....	14
	2.2.2 Propiedades químicas .....	18
	2.2.3 Propiedades bioquímicas .....	19
3.	PRODUCCIÓN Y APLICACIONES .....	21
	3.1 Producción .....	21
	3.2 Aplicaciones .....	33
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	40
	BIBLIOGRAFÍA .....	43

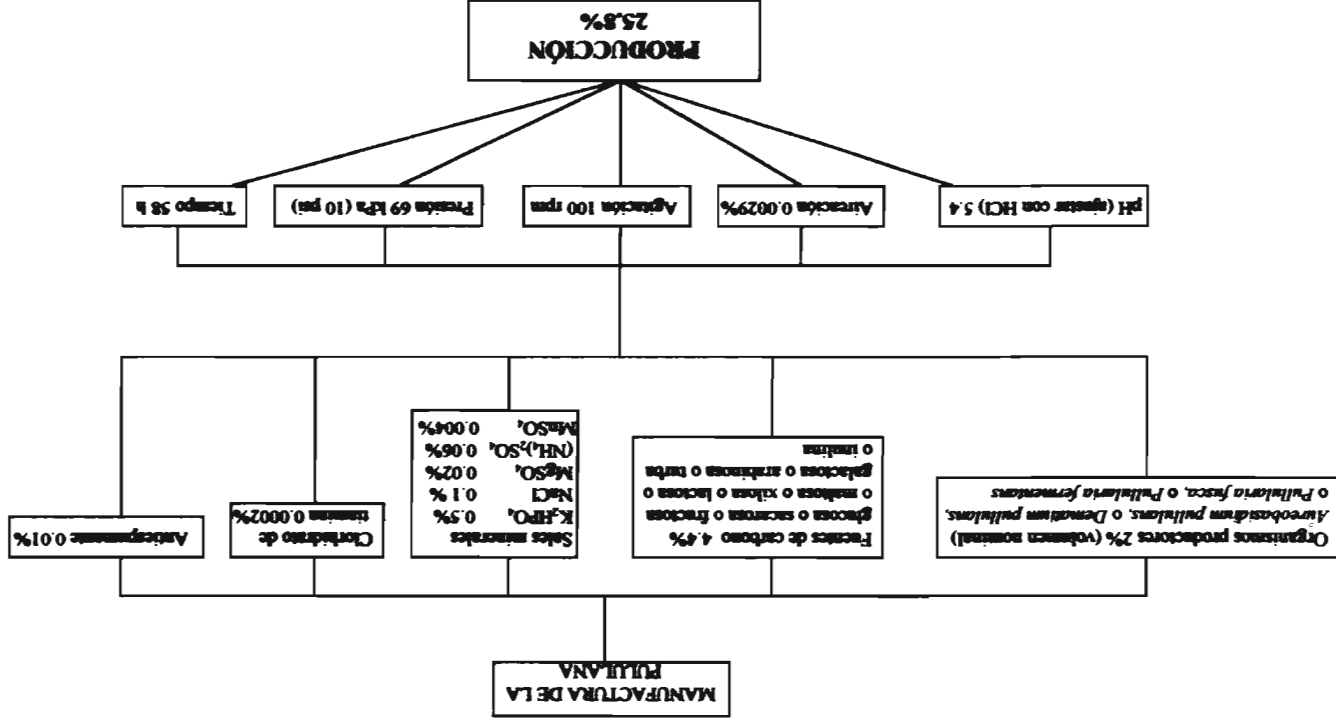
## RESUMEN

Algunos microorganismos como *Aureobasidium pullulans*, generan exopolímeros potencialmente útiles para la industria alimentaria. La pululana es un polímero biodegradable fácilmente moldeable y con propiedades físicas similares a las del poliestireno en cuanto a su dureza y resistencia. En cuanto a brillo, cuando se producen fibras, es similar al rayón y con una resistencia parecida al nilón ("nylon").

En este trabajo se presenta una revisión bibliográfica sobre su producción, tanto a partir de azúcares convencionales como empleando fuentes de carbono no convencionales (turba hidrolizada, suero lácteo, etc), dando un panorama de su producción y utilización que puedan resultar útiles para México.

Los medios de cultivo son relativamente baratos y el control de calidad requiere mediciones de pH y oxígeno disuelto para garantizar su producción sin pigmentación oscura.

Un proceso a nivel de planta piloto de los sugeridos en la literatura se representa en el siguiente diagrama:



## CAPÍTULO I. GENERALIDADES

En la producción de plásticos y fibras sintéticas, existen procesos microbianos que pueden competir con los procesos químicos convencionales, ya que existen rutas microbianas que permiten obtener productos útiles a partir de biomasa o de desechos industriales.

De los numerosos polímeros derivados de fuentes microbianas, algunos encuentran aplicaciones como plásticos, películas o fibras y, entre éstos, se encuentra la pululana. La pululana es un polisacárido soluble en agua, producido extracelularmente por *Aureobasidium pullulans*, también conocida como levadura negra.

Fue descubierta en 1938 por Bauer. Bender y col. (1959), la caracterizaron como un componente neutro de la glucana, además de proponer el nombre de pululana para el viscoso exopolisacárido.

Catley (1979), revisó la historia de la biosíntesis de la pululana. Wallenfels y col. (1965), determinaron la estructura. Actualmente se acepta que consiste de unidades de alfa-maltotriosa polimerizada a través de enlaces 1-6.



Recientemente se ha planteado un interés en las aplicaciones de la pululana, que ha llevado a la optimización de las condiciones de cultivo para la producción del polímero.

Se ha propuesto como recubrimiento de alimentos y empaques, ya que es incoloro, insípido y no tóxico, además de que no requiere plastificantes o estabilizantes.

Es un plástico moldeable y con propiedades físicas cercanas al poliestireno en cuanto a su dureza y resistencia. En cuanto a la producción de fibras, la pululana tiene un radiante brillo, similar al del rayón y una gran resistencia, comparable a la del nilón ("nylon"). Estas propiedades indican las aplicaciones potenciales de este valioso y flexible polímero que, además, es biodegradable.

En este trabajo se describen los avances alcanzados para su producción y la metodología que, a nivel industrial, podría seguirse en México para fomentar su producción y uso, en sustitución de sus contrapartes sintéticas, disminuyendo los residuos plásticos no biodegradables.

## 1.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, gran parte de la industria química está dedicada a la manufactura de macromoléculas o polímeros orgánicos, entre los que se incluye una gran variedad de plásticos y fibras sintéticas.

El objeto de las primeras síntesis de polímeros fue la obtención de substitutos de materiales y macromoléculas naturales, tales como madera, algodón, vidrio y papel. No obstante, se ha desarrollado una vasta tecnología que ahora produce cientos de sustancias que no tienen análogos naturales.

Esta industria depende, casi en su totalidad, de productos petroquímicos y, a menudo, la resistencia de estos materiales frente a los fenómenos de la naturaleza es indeseable, sobre todo cuando constituyen un residuo.

También debido al incremento de su costo en los últimos años se ha reenfocado la atención hacia los recursos renovables.

Muchos microorganismos tienen la habilidad de producir polímeros con propiedades de plásticos. Además, la producción microbiana tiene ciertas ventajas específicas:

- La capacidad de los microorganismos para liberar su útil almacén de intermediarios químicos o monómeros de fuentes de carbono renovables.
- Los intermediarios químicos o monómeros pueden ser procesados por rutas tradicionales en plásticos y fibras sintéticas.
- Los polímeros son biodegradables.
- La producción puede efectuarse a presión y temperatura ambiente y es fácilmente controlable.
- Los procesos son, generalmente, más seguros para el medio ambiente y el consumidor.

La finalidad de este trabajo es recopilar la información bibliográfica actualizada sobre el biopolímero conocido como pululana, destacando sus propiedades y su posible aprovechamiento.

## 1.2 ORGANISMOS PRODUCTORES

En 1958, Bernier publicó sus observaciones sobre un polisacárido extracelular, que era producido por el hongo dimorfo *Pullularia pullulans* también denominado *Dematium pullulans*. El nombre actualmente aceptado para dicho microorganismo es *Aureobasidium pullulans* (Catley, 1979).

*Aureobasidium pullulans* tiene un complejo ciclo de vida exhibiendo una variedad de formas, que fluctúan desde células análogas a la levadura, a través de filamentos multicelulares hasta clamidoesporas (Griffin y Magor, 1987; Ramos y García-Acha, 1975).

La transición de una forma a otra parece depender de condiciones que no están bien definidas o entendidas (Heald y Kristiansen, 1985; Slodki y Cadmus, 1978). Se cree que estas formas pueden derivar del agotamiento de un componente nutrimental o bien de su completa eliminación. Alternativamente pueden resultar de la acumulación de un metabolito intracelular o extracelular (Catley, 1980; Silman y col., 1990).

Variantes de *Aureobasidium pullulans* producidas por mutagénesis con bromuro etílico, una alta concentración de D-glucosa, la presencia del ión cianuro y oligomicina dan origen a un incremento en el número de organismos levaduriformes (Catley, 1979; 1980).

Probablemente, las investigaciones más extensas sobre la morfología del microorganismo y sobre la síntesis de la pululana, fueron conducidas por Catley (1980) que, por procedimientos mecánicos, separó la forma de levadura de la forma micelial, en diferentes intervalos durante la fermentación (Takeo y col., 1993).

Las células levaduriformes fueron separadas del micelio por filtración a través de una red esterilizada de nylon, (con un poro de 45  $\mu\text{m}$ ). La estera micelial residual fue lavada, resuspendida y refiltrada en papel previamente pesado y seco (Catley, 1980).

Diversos trabajos muestran que las formas análogas a la levadura del organismo son responsables y las mayores productoras del polímero. Las hifas son capaces de elaborar el polisacárido aunque con menos eficiencia. Esto es debido a que durante el ciclo de crecimiento precede la aparición de esporas (Catley, 1980; Simon y col., 1993; Takeo y col., 1993).

Un cultivo levaduriforme de 48 h o 72 h rápidamente cambia a forma filamentosa y después retrocede a su forma original de células levaduriformes.

En un estado transicional las dos formas pueden ser separadas por centrifugación en un gradiente de manitol (0.12-1.5 M). Las hifas sedimentan más rápidamente y sólo las células levaduriformes producen el polisacárido extracelular (Catley, 1973; Simon y col., 1993).

*Aureobasidium pullulans*, está presente en aguas residuales o agua no tratada. Se le conoce como levadura negra, hongo de carbón negro o fango levaduriforme. Ayuda a descomponer desechos vegetales, deteriora la pintura, decolora la madera, contamina cervecerías y produce fango durante la fabricación de papel.

Se aísla del suelo, de nódulos linfáticos de pacientes con granuloma de Hodgking y de las articulaciones inflamadas de pacientes con artritis reumatoide (Le Duy y col., 1988).

Otras cepas típicas que producen pululana en una proporción relativamente alta son:

*Pullularia fusca* y *Pullularia fermentans*.

Las cepas deben ser seleccionadas de acuerdo a las necesidades; por ejemplo, el peso molecular de la pululana varía desde un nivel inferior a diez mil hasta un millón o más, dependiendo de la selección de la cepa y de variaciones en las condiciones de cultivo (Seviour y col., 1992).

Cuando se selecciona la cepa productora de pululana, se debe tener precaución, porque algunas cepas de las llamadas comúnmente "levadura negra" excretan sustancias de color oscuro, algunas de las cuales son muy difíciles de separar o remover (Yuen, 1974).

A continuación, en el siguiente capítulo, se presentan la estructura y propiedades de la pululana.

## CAPÍTULO 2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

### 2.1 ESTRUCTURA

*Aureobasidium pullulans* produce grandes cantidades de polisacáridos, varios tipos de los cuales se han aislado e identificado.

La estructura química de estos polisacáridos varía de acuerdo al sustrato, la cepa y método de purificación empleado (Le Duy y col., 1988; Seviour y col., 1992).

Bender y col., en 1959, examinaron la naturaleza del polisacárido extracelular producido durante el desarrollo de *Aureobasidium pullulans* en un medio modificado Czapek Dox que contiene glucosa. Aislaron la glucana neutra y, con base en la rotación óptica, la hidrólisis parcial con ácido, el análisis de metilación y espectros de infrarrojo, demostraron una predominancia de enlaces alfa 1-4 y alfa 1-6 glucosídicos.

Estudios de Wallenfels y col., en 1961, indican que por tratamiento con ácido fórmico caliente puede convertirse en restos de pululana o dextrinas con un 90% de producción.



Análisis periódicos de oxidación y metilación revelaron que la pululana tiene enlaces glucosídicos alfa 1-4 y alfa 1-6 en una proporción de 2:1.

En 1965, Wallenfels y col., realizaron pruebas con la pululanasa (isoamilasa), una enzima específica para catalizar la hidrólisis de enlaces alfa 1-6 glucosídicos. Con esas pruebas convirtieron el polisacárido en prácticamente maltotriosa y un poco de 2,3,4,6 tetra o-metil glucósido (Catley, 1979).

De esta manera se determinó que la pululana consiste en unidades de maltotriosa polimerizadas de manera lineal a través de enlaces alfa 1-6 (Catley y Whelan, 1971).

Cuidadosas investigaciones por cromatografía en papel mostraron que la pululana sometida a hidrólisis contiene rastros de un tetrasacárido que se consideró componente minoritario y constituye la secuencia terminal del polisacárido. El sitio de acción de la enzima parece estar internamente localizado en la maltotetraosa (Fig.1)(Catley, 1979; Catley y Whelan, 1971; Seviour y col., 1992).

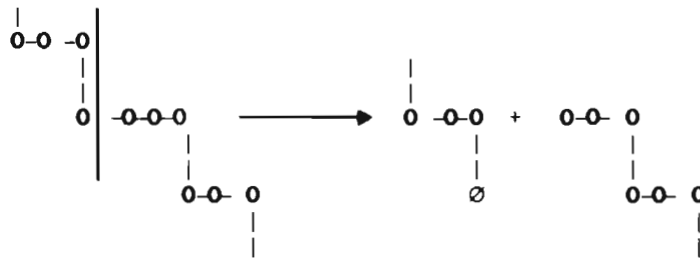


Fig.1 Generación de la estructura de la pululana, descrita por Wallenfels y colaboradores (1965). La línea vertical indica el sitio donde actúa la pululanasa.

Los enlaces alfa 1-6 están representados por  $\vdots$ ,  
 los enlaces alfa 1-4 por  $-$ ,  
 las unidades glucosídicas no reductoras por  $\text{O}$  y  
 las unidades reductoras por  $\emptyset$

Catley y colaboradores, en 1966, propusieron la presencia de un pequeño número de unidades de maltotetraosa localizadas dentro de la estructura básica de la polimaltotriosa y demostraron que están enlazados a través de enlaces alfa 1-6 en sus residuos terminales (Fig.2)(Catley, 1970).

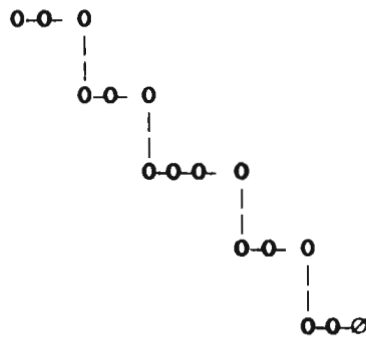


Fig.2 Estructura propuesta por Catley y col., (1966), con unidades de maltotetraosa localizadas dentro del polímero

Posteriormente, en 1971, se observó que dependiendo de la cepa del organismo empleada, la pululana contiene aproximadamente el 6.6% de esta subunidad de maltotetraosa (Caroland y col., 1983).

Una evidencia adicional que muestra una estructura con una mezcla de enlaces fue vista con la acción de saliva humana (alfa-amilasa). Puede observarse la susceptibilidad de los tetrasacáridos a esta hidrólisis, separando la pululana en estos puntos (Fig.3)(Caroland y col., 1983; Catley y Whelan, 1971).

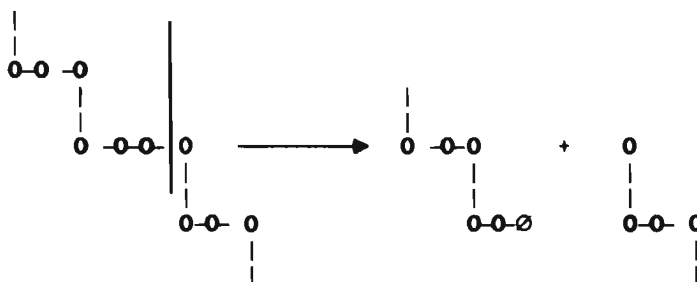


Fig.3 Acción de la saliva humana (alfa amilasa)(Catley y Whelan, 1971)

Sin embargo, la localización y contenido del tetrasacárido descrito por Wallenfels, Catley y otros, no ha entrado en conflicto, puesto que se ha observado, que la estructura de la pululana depende de la cepa y la variedad de condiciones y sustratos empleados.

Actualmente, la pululana es aceptada como una glucana neutra soluble en agua, la cual consiste de cadenas lineales de unidades de D-glucopiranosil que alterna regularmente enlaces alfa D(1-6) y alfa D(1-4), o un polímero lineal de unidades de maltotriosisil conectadas por enlaces alfa D(1-6)(Fig.4)(Le Duy y col., 1988; Seviour y col., 1992).

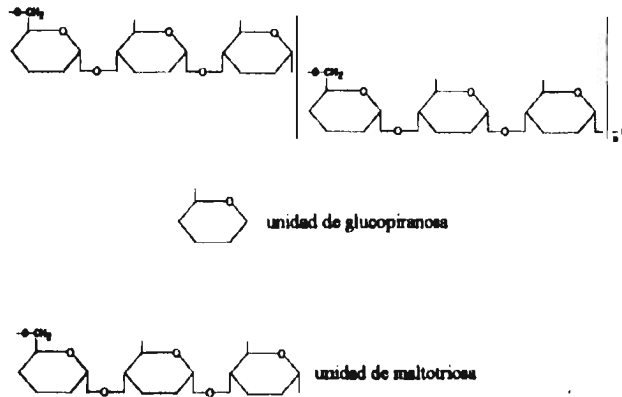


Fig.4 Estructura de la pululana (Le Duy y col., 1988)

## **2.2 PROPIEDADES**

### **2.2.1 Propiedades físicas**

La pululana liofilizada es inodora, sin sabor y no es higroscópica bajo condiciones normales de temperatura. Es insoluble en metanol o acetona, pero se disuelve en agua para formar una solución adhesiva, transparente, viscosa y sin color. Algunas de estas propiedades pueden mejorarse y algunas otras pueden ser incorporadas (Le Duy y col., 1988; Stankovic y col., 1991).

La esterificación parcial o eterización de la cadena del polímero puede reducir su solubilidad en agua. La completa eterización o esterificación le confiere insolubilidad (Nishinari y col., 1991; Yuen, 1974).

La hidrogenación incrementa su resistencia al calor. La pululana hidrogenada es producida por la reacción de una solución acuosa de la pululana con hidrógeno gaseoso bajo presión y en presencia de catalizadores, hasta que la propiedad reductora de la solución desaparece.

La carboxilación aumenta su solubilidad en agua fría. La pululana carboxilada es producida por la oxidación de la pululana hasta que uno de los grupos hidroximetílicos de las unidades glucosídicas es convertido en un grupo carboxilo (Le Duy y col., 1988).

Las ligaduras cruzadas crean un gel iónico capaz de absorber y retener agua en un alto grado. La alta constante dieléctrica y la gran resistencia al calor son obtenidos con la pululana ciano-etílica (Le Duy y col., 1988).

La pululana molida y mezclada con una pequeña cantidad de agua, puede ser transformada en moldes de compresión a membranas, películas o fibras. Como plástico moldeable es similar al poliestireno en transparencia, brillo, dureza y resistencia, pero es mucho más elástica (Donabedian y col., 1994; Yuen, 1974).

Las soluciones de pululana en concentraciones de 5-10% pueden ser aplicadas a superficies suaves y ser secadas con calor bajo presión, formando una película de aproximadamente 0.01 mm de espesor.

Esta película es incolora, transparente, insípida, tenaz, resistente al aceite y grasa, sin ser afectada por una variación térmica razonable ( $\approx T = -10$  a  $30^{\circ}\text{C}$ ), impermeable al oxígeno y no es tóxica (Le Duy y col., 1988; Yuen, 1974).

Las películas resistentes al agua o insolubles en agua son preparadas parcial o totalmente por eterificación o esterificación. La flexibilidad de la película se debe a la adición de una pequeña cantidad de plastificante, como el sorbitol, manitol o glicerol (Bender y col., 1959; Yuen, 1974).

La pululana es dextrorrotatoria ( $[\alpha]_D = +80$  a  $+190^{\circ}$ ) en solución acuosa. Con la espectroscopía infrarroja muestra una fuerte banda de absorción a  $850\text{ cm}^{-1}$ , indicando la presencia de unidades de alfa-D-glucopiranosil. Las absorciones a  $755$  y de  $915$  a  $930\text{ cm}^{-1}$  revelan que las ligaduras predominantes son enlaces alfa-D (1-4) y alfa-D (1-6). El espectro infrarrojo generalmente aceptado no muestra ninguna de las absorciones a  $793 \pm 3\text{ cm}^{-1}$  y  $890\text{ cm}^{-1}$  que caracteriza los enlaces alfa-D (1-3) y las unidades beta-D glucopiranosilicas (Le Duy y col., 1988).

El tamaño de las moléculas de la pululana se debe a las condiciones de fermentación y difiere de acuerdo a la variedad de hongo empleada. El peso molecular aumenta gradualmente durante el cultivo del microorganismo, alcanzando un punto máximo y, posteriormente, decae.

Los mecanismos de polimerización y de despolimerización durante el cultivo no se han comprendido completamente, pero las evidencias sugieren que ocurre una pululanólisis desde una temprana etapa de la fermentación, tal vez catalizada por una endoamilasa superficial intracelular o extracelular de *Aureobasidium pullulans* (Ball y col., 1994; Catley, 1970; Le Duy y col., 1974).

Se cree que el peso molecular tiene que ver con la viscosidad de la solución acuosa. Esto último se propone como un medio para estimar el peso molecular y controlar la extensión a la que la pululana se polimeriza durante la fermentación.



### 2.2.2 Propiedades químicas

La oxidación de la pululana, con ácido peryódico (0.2M) produce ácido fórmico como producto derivado. De las cantidades consumidas de ácido peryódico y la producción del ácido fórmico, la proporción de los enlaces glucosídicos alfa-D-(1-4) y alfa-D-(1-6) puede ser calculada teóricamente y es de 2:1. La proporción de enlaces se puede determinar por permetilación (Le Duy y col., 1988).

La hidrólisis completa con ácidos (por ejemplo HCl 1N a 100°C durante 120 min) solamente da glucosa como producto derivado. La hidrólisis parcial produce varios mono y oligosacáridos dependiendo de las condiciones en las que se lleve a cabo (Le Duy y col., 1988).

La pululana muestra una reacción sin color en una solución de yodo. En un estudio específico, la solución de Fehling produjo un complejo insoluble azuloso de cobre, mientras que, con otras soluciones de pululana no se encontró tal reacción. La prueba con ninhidrina de antes y después de la hidrólisis produce resultados negativos (Bender y col., 1959; Le Duy y col., 1988).

La combustión sólo libera CO<sub>2</sub> y un calor moderado; el calor de combustión es de aproximadamente 16.7 kJ (4 kcal/g)(Yuen, 1974).

La molécula de la pululana es neutral. Una modificación puede conferirle una carga negativa, como en la pululana carboxilada, sulfato de pululana y otros; o bien, una carga positiva como en el caso de alquilaminopululana. Como un gel iónico puede ser aniónico o catiónico.

### 2.2.3 Propiedades bioquímicas

La pululana es hidrolizada enzimáticamente por pululanasa que atacan específicamente los enlaces alfa-D(1-6) y alfa-D-(1-4).

La pululanasa que ataca la unión alfa-D(1-6) glucopiranosídica, se aísla intra y extracelularmente de *Aerobacter aerogenes* y *Streptomyces flavochromogenes*. La hidrólisis completa produce maltotriosa como producto principal con trazas de maltotetraosa (Taguchi y col., 1973a; Zajic y Le Duy, 1973).

La pululanasa que actúa en los enlaces alfa-D-(1-4), se aísla de *Aspergillus niger*. Actúa en las terminales reductoras adyacentes a las uniones alfa-D-(1-6) en la pululana. La hidrólisis completa produce dextrinas como producto principal con trazas de un tetrasacárido, que se cree es una 6-alfa-maltrosilglucosa (Ball y col., 1994).

La pululana puede ser degradada por bacterias existentes en la tierra y en el agua (Bender, 1994; Israilides y col., 1994; Yuen, 1974).

Con base en esta información en el siguiente capítulo se contempla el interés en la producción de la pululana que es, particularmente, por su uso potencial en alimentos y en productos farmacéuticos.

## CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

### 3.1 PRODUCCIÓN

#### **En el laboratorio:**

Se prepara principalmente por la fermentación de medios de cultivo ricos en carbohidratos por *Aureobasidium pullulans*. Puede ser biosintetizada a partir de glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, xilosa, lactosa, galactosa, arabinosa, turba, que son residuos vegetales hidrolizados e inulina, sustancia parecida al almidón extraída de la alcachofa de Jerusalén (Boa y Le Duy, 1984; Imshenetskii y col., 1981; Le Duy y Boa, 1983; Yong y col., 1989).

Si se utiliza glucosa como fuente de carbono se obtiene un polímero que contiene 83.3% de carbohidratos, 3.2% de proteínas y 8.1% de agua. Posteriormente, se encontró que cuando se hidroliza el polisacárido extracelular, la glucosa es el monómero principal, con trazas (menos del 5%) de galactosa y manosa (Slodki y Cadmus, 1978; Zajic y Le Duy, 1973). La conversión de la glucosa inicial al polisacárido es de 25.8%.

En otros estudios, la sustancia empleada como fuente de carbono fue la sacarosa, obteniendo como resultado una producción del 20-70% dependiendo de las condiciones de cultivo. Intentos de producción usando uno o más mono y disacáridos no dieron mejores resultados (Kato y Shiosaka, 1975; Taguchi y col., 1973a; Schuster y col., 1993).

El medio basal es un Czapek-Dox o un medio sintético que contiene sales minerales como:  $K_2 HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $MgSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $FeSO_4$  ó  $FeCl_3$ . Además, contiene trazas de nutrimentos tales como la tiamina, que incrementa la producción de la pululana (Bender y col., 1959; West y Reedhamer, 1992).

El pH inicial del medio de cultivo puede variar de 4.5 a 7.5. La más alta producción se ha encontrado en condiciones ligeramente ácidas (Le Duy y col., 1988). *Aureobasidium pullulans* puede crecer en un intervalo de pH muy bajo; hasta de 2.0. Sin embargo, ninguna pululana es sintetizada en condiciones ácidas (Lacroix y col., 1985; Lee y Yoo, 1993).

Se ha encontrado que la mayor proporción de síntesis de pululana ocurre cuando se tiene la forma de levadura más que con la fracción micelial. La síntesis es más activa durante las etapas tempranas del desarrollo celular, predominando la forma de levadura cuando el valor del pH se mantiene en 6 mientras que la forma micelial predomina en un valor de pH de 2.7 (Heald y Kristiansen, 1985; West y Reedhamer, 1993b).

La fermentación puede llevarse a cabo entre 15 y 40°C obteniéndose mejores resultados entre 25 y 28°C. Se necesita una mayor aireación y fuerte agitación debido a la alta viscosidad del caldo de fermentación (Le Duy y col., 1974; West y Reedhamer, 1993c).

La máxima producción generalmente se obtiene después de 48-120 horas de cultivo, dependiendo del tipo de sustrato y la concentración inicial, así como de las condiciones de fermentación.

La pululana cruda se recupera usualmente del primer caldo de cultivo usando la centrifugación para remover las células y adicionando metanol, etanol o acetona para precipitar el polisacárido. La pululana se purifica redisolviendo y lavando el producto en agua y reprecipitando con los mismos disolventes varias veces.

La pululana purificada puede ser liofilizada o criodesecada y almacenada en forma de polvo. En algunas ocasiones se aplica una purificación más compleja (Kato y Shiosaka, 1975).

Taguchi y colaboradores (1973b), demostraron que la pululana puede ser sintetizada a partir de sacarosa utilizando células secas en acetona del *Aureobasidium pullulans*, o bien, a partir del azúcar del nucleótido uridina difosfoglucosa (UDPG), en presencia de trifosfato de adenosina. También pueden ser utilizadas células vivas o enzimas libres ( Leathers y Gupta, 1994; Taguchi y col., 1973b; Yuen, 1974).

#### **Manufactura a nivel de planta piloto e industrial:**

La producción de pululana a partir de glucosa en una planta piloto, fue primeramente intentada en un pequeño fermentador en el cual *Aureobasidium pullulans* fue desarrollado en 175 litros de medio de cultivo (Zajic y Le Duy, 1973).

El medio cultivo consiste de 4.4% de glucosa, 0.5% de  $K_2HPO_4$ , 0.1% de NaCl, 0.02% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.06% de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.04% de extracto de levadura, 0.0002% de clorhidrato de tiamina, 0.004% de  $MnSO_4 \cdot H_2O$  y 0.01% de agente antiespumante (Kondrateva y Lobacheva, 1990).

El pH inicial se ajustó en 5.4 por adición de HCl antes de la esterilización. El medio fue esterilizado bajo presión a 103 kPa (15 psi) y 121°C por 30 minutos, por inyección directa de vapor. Una vez frío, se adicionaron 3.5 litros de inóculo (2% del volumen nominal).

Inmediatamente después de la inoculación, se fijaron los siguientes parámetros en el tanque : la aireación a 0.0029 m<sup>3</sup>/s, la agitación a 100 r.p.m., la presión del tanque a 69 kPa (10 psi) y la temperatura 25-28°C. Después de 58 horas de fermentación, la producción basada en la concentración inicial de glucosa, fue de 25.8% (Le Duy y col., 1988; Zajic y Le Duy, 1973).

Haciendo pruebas en una planta piloto (una tonelada métrica por mes), la pululana es ahora manufacturada por ciertos laboratorios bioquímicos japoneses (Le Duy y col., 1988).

Inicialmente produjeron la pululana como sustrato para determinar la actividad de la pululanasa (isoamilasa) en la producción de hidrolizados de almidón, tales como amilosa y maltosa; además de producir pululana y pululanasa comercialmente como reactivos.



También se han hecho estudios para evaluar el uso de fuentes no convencionales de azúcares para obtener pululanas.

Un ejemplo son los llamados jarabes de "almidón" que se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática de almidones de origen vegetal. Estos jarabes contienen oligosacáridos y dextrinas. Cualquier almidón, ya sea el obtenido de maíz o papa pueden ser utilizados para los jarabes, sin reducción en la producción de la pululana (Griffin y Magor, 1987).

Se puede obtener lo mismo con harina de arroz, arroz dañado, fibra de arroz, etc, utilizando un extracto de sus hidrolizados obtenidos con amilasa a bajas temperaturas (50 a 70°C). También pueden hidrolizarse los almidones químicamente.

Los efectos de la concentración de almidón hidrolizado en la producción de pululana se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Producción de la pululana a partir de diferentes  
 substratos y diferentes microorganismos (Yuen, 1974)

Fuente de carbono		A A.P. AHU 9553 (%)	B A.P. IFO 6353 (%)	C D.P. IFO 4464 (%)
Fuente de carbono convencional	glucosa	35	31	43
	sacarosa	51	35	54
Almidón hidrolizado parcialmente	Maltosa (90%)	52	51	61
	Jarabe (ca)	65	76	75
	Jarabe (ce)	63	63	72

Nota: A.P.=*Aureobasidium pullulans* AHU 9553, IFO 6353

D.P.=*Dematium pullulans* IFO 4464

ca =conversión ácida

ce =conversión enzimática

Un equivalente de dextrosa (ED) en el intervalo de 50-60% es el grado óptimo de hidrólisis de la fuente de carbono. Un equivalente de dextrosa mayor reduce la producción de la pululana, debido a las altas cantidades de mono y disacáridos. Y un equivalente de dextrosa menor trae como consecuencia la inhibición, por la presencia de grandes moléculas de dextrina, como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2. Efecto del ED en la producción de la pululana (Yuen, 1974)**

<b>ED %</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>
<b>Jarabe (ca)</b>	45	53	68	76	75	58
<b>Jarabe (ce)</b>	47	58	65	—	—	—

**ED = equivalente de dextrosa**

**ca = conversión ácida**

**ce = conversión enzimática**

En cuanto a la concentración de los hidrolizados como fuente de carbono se prefiere alrededor de 10 a 15%, ya que proporciona los resultados más favorables (Yuen, 1974). La tabla 3 muestra los resultados.

**Tabla 3. Producción de pululana con base en la concentración de sustrato (Yuen, 1974)**

<b>Concentración sustrato %</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>30</b>
<b>Jarabe (ca)</b>	65	75	73	55	50
<b>Jarabe (ce)</b>	63	72	70	60	54

**ca = conversión ácida**

**ce = conversión enzimática**

Otros ingredientes para el medio de cultivo son  $K_2HPO_4$ , NaCl,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . El pH inicial se fija entre 5 y 7.5. El cultivo se fermenta por 3-8 días a 27-30°C, calentando para desactivar la enzima y centrifugando para remover las células del caldo de fermentación. La pululana se precipita del sobrenadante con metanol 1:1 v/v.

Tal proceso produce una pululana con un peso molecular de 540,000 - 900,000. El peso molecular es controlado por el pH inicial. Con un pH inicial de 5 ó 6 produce un peso molecular arriba de  $4 \times 10^6$ ; un pH inicial de 6.5 o más alto produce un peso molecular de 50,000 - 100,000.

La sucesiva precipitación con disolventes se usa para extraer y purificar la pululana. Se pueden utilizar metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de metilo, tetrahidrofurano, dioxano, etilenglicol, éter monoetilico, metil etil cetona, alcohol diacetona y acetilacetona (Le Duy y col., 1988).

El *Aureobasidium pullulans* puede desarrollarse y sintetizar el polisacárido a partir de una extensa gama de carbohidratos como substrato incluyendo hexosas y pentosas. Por consiguiente, se han aceptado carbohidratos residuales como substrato, como el suero de leche proveniente de la manufactura del queso y la turba hidrolizada.

La turba hidrolizada es un líquido, resultado del tratamiento térmico de turba cruda en una solución ácida y en un autoclave. Industrialmente, este proceso se llama carbonización húmeda. Contiene más del 5% del total de carbohidratos, principalmente glucosa, xilosa, galactosa, ramnosa, manosa, arabinosa y varios compuestos orgánicos que pueden ser metabolizados por diferentes microorganismos (Le Duy y Boa, 1983).

En 1984, Boa y Le Duy, reportaron un estudio de la formulación de un medio para el desarrollo del *Aureobasidium pullulans* y para la producción del polisacárido a partir de la turba hidrolizada como única fuente de carbono (Boa y Le Duy, 1984).

Se encontró que la adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  como fuentes de nitrógeno y fosfato, respectivamente, no son necesarias para la producción del polisacárido. El medio de cultivo económicamente optimizado para la producción en gran escala de pululana contiene turba hidrolizada, 0.05% de  $\text{NaCl}$ , 0.02% de  $\text{MgSO}_4$  y 0.01% de antiespumante.

El pH inicial del medio se ajusta a 6.0 con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . El costo total de los ingredientes para la producción de cada kilogramo de pululana con este medio optimizado es de sólo 1/10 parte del costo en un medio no optimizado (Boa y Le Duy, 1984).

El efecto del oxígeno en un proceso microbiano varía de especie en especie. Este efecto en la producción de la pululana se estudió en medios con nitrógeno y libres de nitrógeno (Wecker y Onken, 1991).

Rho y colaboradores, en 1988, encontraron una alta producción de la pululana en un medio libre de nitrógeno con baja concentración de oxígeno disuelto (OD), mientras que en un medio que contiene nitrógeno, se observó el efecto inverso (Moscovici y col., 1993; Seviour y col., 1992).

Posteriormente, se encontró que no hay diferencia si el medio contiene o no nitrógeno, pues se comprobó que la síntesis de pululana no empieza hasta que el nitrógeno ha sido totalmente consumido (especialmente el ion  $\text{NH}_4^+$ ). De esta manera, el medio está libre de nitrógeno cuando la síntesis de pululana empieza. Por tanto, no hay diferencia entre el efecto del oxígeno y la fuente de nitrógeno (Seviour y col., 1992; Schuster y col., 1993).

McNeil y Kristiansen, en 1987, encontraron que la producción de la pululana se incrementa aumentando la velocidad de agitación. Esto no ha sido comprobado, ya que se desconoce si el aumento fue producido por el aumento de la velocidad *per se* o por un aumento en la concentración de oxígeno disuelto (Wecker y Onken, 1991).

Simultáneamente a la síntesis de la pululana, se obtiene un pigmento que va de verde oscuro a negro, parecido a la melanina, el cual contamina a la pululana (Pollock y col., 1992; Wecker y Onken, 1991).

Un proceso múltiple de decoloración con carbón activado, seguido por filtración, es comúnmente usado para remover el pigmento. Algunas variantes del *Aureobasidium pullulans* acumulan menos melanina, pero la producción del polisacárido es relativamente baja (20-30%) (Tarabasz-Szymaska y Galas, 1993; West y Reedhamer, 1993a).

Un tratamiento con bromuro de etilo exhibe una incrementada tendencia al crecimiento levaduriforme y reduce la pigmentación observándose también una acumulación de la pululana con un peso molecular relativamente alto en los medios de cultivo (Pollock y col., 1992).

## **3.2 APLICACIONES**

### **Películas**

Las películas pueden ser preparadas disolviendo la pululana en agua dando una concentración de 5-10% y secando continuamente la solución aplicada, con calor o presión sobre una superficie lisa; el espesor de las películas puede ser tan delgado como 0.01 mm.

Pueden elaborarse artículos a partir de la pululana, usando métodos similares a los usados para polímeros sintéticos ya que, comparada con productos de origen petroquímico, tiene características parecidas al estireno, en transparencia, brillo y dureza y, además, es mucho más elástica. La pululana tiene características similares a las del polivinilalcohol (Griffin y Magor, 1987).

Como es muy conocido, las películas poliméricas sintéticas, los recipientes de plástico, etc, causan problemas cuando se les desecha. Las películas y recipientes preparados con pululana se disuelven en agua 3 ó 4 veces más rápido que los preparados con polivinilalcohol (PVA) y no dejan vestigios.



Es importante mencionar que la biodegradación de los productos hechos con pululanas, al ser utilizados como una fuente de nutrimentos por microorganismos los hace superiores a sus contrapartes sintéticas.

Las películas de pululana son incoloras, transparentes, insípidas, inodoras, resistentes al aceite y la grasa y capaces de sellar en caliente. Exhiben pequeños cambios en la variación térmica y pueden llegar a ser comestibles.

Ya que las películas de pululana no requieren plastificantes o estabilizantes, los problemas de contaminación son nulos. Por esterificación y etoxilación la pululana llega a ser insoluble en agua.

Debido a su natural solubilidad, la pululana es compatible con polímeros solubles en agua, tales como la gelatina, PVA y amilosa; las películas preparadas con estas mezclas son ventajosas para ciertas aplicaciones.

Si lo que se busca es flexibilidad, se puede adicionar sorbitol o glicerina, pero la adición de más del 20% causa engomado.

Otra característica de las películas o membranas de pululana es su gran impermeabilidad al oxígeno. Por tanto, pueden ser utilizadas como una barrera para prevenir la oxidación de los alimentos. Se han obtenido resultados satisfactorios por inmersión de los alimentos en una solución acuosa o bien rociando los alimentos con la misma. Posteriormente, se efectúa el secado al aire, formando una membrana o capa sobre los productos alimenticios (Roller y Dea, 1992; Yuen, 1974).

Este método es fácil cuando se compara con aquellos que usan amilosa. Las soluciones acuosas de amilosa deben ser mantenidas a una temperatura superior a 90°C , mientras que las películas de pululana pueden ser aplicadas en productos alimenticios sin calor.

#### **Como ingrediente en alimentos**

La pululana puede reemplazar parcialmente al almidón. Como ingrediente, imparte a los alimentos y bebidas propiedades de textura, viscosidad, dispersabilidad y retención de humedad satisfactorias. Además, prolonga el almacenamiento y la vida de anaquel de los productos porque inhibe el desarrollo de hongos (Kondrateva y Lobacheva, 1990; Roller y Dea, 1992).

En suma, la pululana tiene las siguientes características como ingrediente alimenticio:

- bajo en calorías, ya que los alimentos y bebidas pueden ser hechos por el reemplazo de un gran porcentaje de almidón y con la pululana se reduce el valor energético final, imparte una textura satisfactoria y un sentido de saciedad sin afectar el sabor,
- la pululana es insípida, inodora y de una coloración blanquizca y puede ser teñida si se desea,
- su incorporación previene la sobredeshidratación de los alimentos ya que retiene la humedad y
- debe cuidarse la selección de pululanas con la viscosidad adecuada para cada producto (Yuen, 1974).

### **Fabricación de fibras**

Las fibras pueden elaborarse de una solución acuosa de pululana, que tenga un apropiado grado de polimerización y una alta concentración de pululana. Las fibras tienen un brillo parecido al del rayón pero su resistencia al ser estiradas es comparable con la del nilón ("nylon") (Yuen, 1974).

### **Aplicaciones médicas**

Las soluciones de pululana ayudan a mantener la presión coloidosmótica normal en la sangre y pueden proporcionar reserva de plasma.

Son utilizadas como un método de extensión del plasma, confiriendo los efectos terapéuticos deseados sin provocar efectos colaterales no deseados. Dichas soluciones después de ser esterilizadas, pueden ser suministradas vía intravenosa con seguridad, como método de expansión del plasma.

La pululana puede ser metabolizada y excretada sin problemas. También puede ser combinada con antígenos o virus en animales para producir anticuerpos o vacunas antivirales (Le Duy y col., 1988).

### **Otras aplicaciones**

Los derivados esterificados y eterificados de la pululana pueden ser usados en la manufactura de pegamentos y adhesivos, los cuales pueden emplearse en madera, para sobres y gran variedad de sustratos. La viscosidad y adhesividad de una solución de pululana depende del grado de polimerización (Le Duy y col., 1988; Yuen, 1974).

La pululana esterificada puede comprimirse y moldearse, los artículos fabricados con ella son biodegradables y resistentes al calor; se descomponen arriba de los 200°C sin formar gases tóxicos (Le Duy y col., 1988).

Como agente floculante es muy eficiente, en medio acuoso flocula lodos con fosfatos, uranio, hidróxido férrico, aluminio y otros minerales en procesos metalúrgicos. Su actividad floculante es comparable a la de acrilamida polimerizada (Zajic y Le Duy, 1973).

Puede utilizarse como aglutinante de sólidos en fertilizantes; la pululana y sus derivados proporcionan una idónea solubilidad en agua, controlan la salida de la composición del fertilizante en el suelo, incrementando el efecto de fertilización (Le Duy y col., 1988).

Pueden producirse fibras solubles en agua que son usadas en la fabricación de papel con o sin la presencia de otras fibras vegetales. Debido a su alta hidrofilia es ideal para impresiones y escrituras.

Cuando se emplea como agente encapsulante de medicamentos o en forma de polvo en sazonadores de comidas instantáneas, té, o café, la película de pululana se desintegra y no tiene que ser removida (Le Duy y col., 1988).

Como se puede observar en estas y muchas otras aplicaciones, la pululana puede reemplazar materiales naturales y sintéticos utilizados hasta nuestros días.

## **CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

En general, es necesario que el proceso de la producción de la pululana comprenda:

- Un medio de cultivo acuoso que contenga las fuentes de carbono y nitrógeno asimilables y los nutrimentos necesarios para el desarrollo del microorganismo.
- Un valor de pH adecuado del medio de cultivo. Es ideal que se controle en un intervalo de 5.0 - 7.5. Normalmente, la fermentación de la pululana en matraces de agitación, en un medio de cultivo con un pH no controlado, conduce a la producción de muchos pigmentos de melanina. Entonces, las preparaciones de pululana están fuertemente pigmentadas y requieren de una decoloración con carbón activado. Cuando la producción se lleva a cabo a un pH adecuado se obtiene un rendimiento de 50-70%.
- Es recomendable el uso de 0.2-0.4% de iones fosfato en el medio de cultivo para obtener una pululana con un alto peso molecular. Esto corresponde a 0.1-0.4g aproximadamente de  $K_2HPO_4$  por decilitro.

- Una cantidad mayor disminuye considerablemente el peso molecular promedio.
- Una adecuada selección de la cepa resulta importante. Algunas cepas de las llamadas comúnmente "levadura negra" excretan sustancias de color oscuro, que son muy difíciles de separar o remover.

En todos los casos la pululana precipitada debe ser un sólido blanco, una característica de potencial importancia si el producto es requerido para uso comercial en alimentos o en la industria farmacéutica.

Queda claro que el *Aureobasidium pullulans* es un organismo levaduriforme que está muy distribuido en la naturaleza. Numerosas referencias sobre la ecología del organismo muestran que su existencia no está limitada a una localización específica ni a un material en particular.

La producción de la pululana ofrece una solución alternativa para la reducción de contaminantes mientras que suministra, al mismo tiempo, un producto valioso.



En el caso de México podría probarse como fuente de carbono a las mieles incristalizables de azúcar de caña, ya que es una materia prima ampliamente disponible a bajo costo.

Los experimentos a nivel de laboratorio y piloto se diseñarían para optimizar la producción de pululana minimizando la formación de pigmentos indeseables.

Después se haría el desarrollo de los diferentes productos haciendo una evaluación económica para cada uno, con objeto de seleccionar los más adecuados.

Una vez definidos los productos más prometedores se realizarían las pruebas a nivel prototipo para afinar los estudios de factibilidad técnico-económica.

## BIBLIOGRAFÍA

Ball, D.H., Cimecioglu, A.L., Kaplan, D.L. y Huang, S.H. 1994. Site selective modification of polysaccharides under homogeneous conditions-new anhydro and cationic polymers derived from amylose an pullulan. Abst. Pap. Am. Chem. Soc., 208:4.

Bauer, R. 1938. Physiology of *Dematium pullulans* deBary. Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II., 98:133-167.

Bender, H. 1994. Studies of the degradation of pullulan by the decycling maltodextrinase of *Flavobacterium sp.* Carb. Res., 260:119-130.

Bender, H., Lehmann, J. y Wallenfels, K. 1959. Pullulan, ein extracelluläres Glucan von *Pullularia pullulans*. Biochim. Biophys. Acta., 36:309-316.

Bernier, B. 1958. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. Can. J. Microbiol., 4:195-204.

Boa, J.M. y Le Duy, A. 1984. Peat hydrolysate medium optimization for pullulan production. Appl. Environ. Microbiol., 48:26-30.

Caroland, G., Catley, B.J. y Mc Dougal, F. J. 1983. The location tetrasaccharide units in pullulan. Carbohydr. Res., 114:237-243.

Catley, B.J. 1970. Pullulan, a relationship between molecular weight and fine structure. FEBS. Lett., 10:190-193.

Catley, B.J. 1973. The rate of elaboration of the extracellular polysaccharide, pullulan, during growth of *Pullularia pullulans*. J. Gen. Microbiol., 78:33-38.

Catley, B.J. 1979. "Pullulan synthesis by *Aureobasidium pullulans*". En Microbiol. polysaccharides and polysaccharases. Ed. R.C.W. Berkeley, G.W. Gooday y D.C. Ellwood. Pp. 69-84. Academic Press Ltd., Londres, Inglaterra.

Catley, B.J. 1980. The extracellular polysaccharide pullulan produced by *Aureobasidium pullulans*: A relationship between elaboration rate and morphology. J. Gen. Microbiol., 120:265-268.

Catley, B.J., Robyt, J.F. y Whelan, W.F. 1966. A minor structural feature of pullulan. Biochem. J., 100:5p-6p.

Catley, B.J. y Whelan, W.J. 1971. Observations on the structure of pullulan. Arch. Biochem. Biophys., 143:138-142.

Donabedian, D., Gross, R.A. y McCarthy, S.P. 1994. Plasticization, chemical modification and graft-copolymerization of pullulan. Abst. Pap. Am. Chem. Soc., 207:153.

Griffin, M. y Magor, A.M. 1987. Plastics and synthetic fibres from microorganisms: A dream or a potential reality? Microbiol. Sci., 4:357-361.

Heald, P.J. y Kristiansen, B. 1985. Synthesis of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Bioeng., 27: 1516-1519.

Imshenetskii, A.A., Kondrateva, T.T y Smutko, A.N. 1981. Influence of the acidity of the medium, condition of aeration and temperature on pullulan biosynthesis by polyploid strains of *Pullularia (Aureobasidium) pullulans*. Microbiol., 50:330-333.

Israilides, C., Bocking, M., Smith, A. y Scanlon, B. 1994. A novel rapid coupled enzyme assay for the estimation of pullulan. Biotechnol. Appl. Biochem., 19:285-291.

Kato, K. y Shiosaka, M. 1975. Process for the production of pullulan. U.S. Patent 3912591. Washington, D.C. EEUUA.

Kondrateva, T.F. y Lobacheva, N.A. 1990. Use of a mathematical planning method for optimizing the growth medium composition to increase the quantity of pullulan synthesized by *Pullularia pullulans*. Microbiol., 59:699-703.

Lacroix, C., Le Duy, A., Noel, G. y Choplin, L. 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. Biotechnol. Bioeng., 27:202-207.

Le Duy, A., Marsan, A.A. y Coupal, B. 1974. A study of the rheological properties of a non-Newtonian fermentation broth. Biotechnol. Bioeng., 16:61-76.

Le Duy, A. y Boa, J.M. 1983. Pullulan production from peat hydrolyzate. Can. J. Microbiol., 29:143-146.

Le Duy, A., Zajic, J.E., Luong, J.H.T. y Choplin, L. 1988. "Pullulan". En Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. 2a. ed. Vol 13, pp 650-660. Wiley, Nueva York. EEUUA.

Leathers, T.D. y Gupta, S.C. 1994. Production of pullulan from fuel ethanol by products by *Aureobasidium sp* straw NRRL y-12, 974. Biotechnol. Lett., 16:1163-1166.

Lee, K. Y., y Yoo, Y.J. 1993. Optimization of pH for high molecular weight pullulan. Biotechnol. Lett., 15:1021-1024.

Mc Neil, B. y Kristiansen, B. 1987. Influence of impeller speed upon the pullulan fermentation. Biotechnol. Lett., 9:101-104.

Moscovici, M., Ionescu, C., Oniscu, C., Fotea, O y Hanganu, L.D. 1993. Exopolysaccharide biosynthesis by a fast producing strain of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett., 15:1167-1172.

Nishinari, K., Kohyama, K., Williams, P.A., Phillips, G.O., Burchard, W. y Ogino, K. 1991. Solution properties of pullulan. Macromolecules., 24:5590-5593.

Pollock, T.J., Thorne, L. y Armentrout, R.W. 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high molecular weight pullulan with reduced pigmentation. Appl. Environ. Microbiol., 3:877-833.

Ramos, S. y García-Acha, I. 1975. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. Trans. Br. Mycol. Soc., 64: 129-135.

Rho, D., Mulchandani, A., Luong, J.H.T. y Le Duy, A. 1988. Oxygen requirement in pullulan fermentation. Appl. Microbiol Biotechnol., 28:361-365.

Roller, S. y Dea, I.C.M. 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. Crit. Rev. Biotechnol., 12:261-277.

Schuster, R., Wenzig, E. y Mersmann, A. 1993. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39:155-158.

Seviour, R.J., Stasinopoulos, S.J., Aver, D.P.F. y Gibbs, P.A. 1992. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. Crit. Rev. Biotechnol., 12:279-298.

Shabtai, Y. y Mukmenev, I. 1995. Enhanced production of pigment - free pullulan by a morphogenetically arrested *Aureobasidium pullulans* (ATCC 42023) in a two-stage fermentation with shift from soy bean oil to sucrose. Appl. Microbiol. Biotechnol., 43:595-603.

Silman, R.W., Bryan, W.L. y Leather, T.D. 1990. A comparison of polysaccharides from strains of *Aureobasidium pullulans*. FEMS. Microbiol. Lett., 71:65-70.

Simon, L., Cayevaugien, C. y Bouchonneau, M. 1993. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. J. Gen. Microbiol., 139:979-985.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Slodki, M.E. y Cadmus, M.C. 1978. Production of microbial polysaccharides. Adv. Appl. Microbiol., 23:19-54.

Stankovic, R.I., Ilic, L., Nordmeier, E., Jovanovic, S. y Lechner, M.D. 1991. Dilute solution properties of pullulan by dynamic light scattering. Polymer Bull., 27:337-344.

Taguchi, R., Kikuchi, Y., Sakano, Y. y Kobayashi, T. 1973a. Structural uniformity of pullulan produced by several strains of *Pullularia pullulans*. Agric. Biol. Chem., 37:1583-1588.

Taguchi, R., Sakano, Y., Kikuchi, Y., Sakuma, M. y Kobayashi, T. 1973b. Synthesis of pullulan by acetone-dried cells and cell free enzyme from *Pullularia pullulans*, and the participation of lipid intermediate. Agri. Biol. Chem., 37:1635-1641.

Takeo, K. Mine, H., Nishimura, K. y Miyaji, M. 1993. The existence of a dispensable fibrillar layer on the wall surface of mycelial but not yeast cells of *Aureobasidium pullulans*. FEMS Microbiol. Lett., 111:153-158.

Tarabasz - Szymanska, L. y Galas, E. 1993. Two - step mutagenesis of *Pullularia Pullulans* leading to clones producing pure pullulan with high - yield. Enzyme Microbiol. Technol., 15:317-320.



Wallenfels, K., Bender, H., Keilich, G. y Bechtler, G. 1961. Über Pullulan, das Glucan der Schleimhülle von *Pullularia pullulans*. Angew. Chem., 73:245-246.

Wallenfels, K., Keilich, G., Bechtler, G. y Freudenberger, D. 1965. Untersuchungen an Pullulan. IV. Die Klärung des Strukturproblems mit physikalischen chemischen und enzymatischen Methoden. Biochem. Z., 341:433-450.

Wecker, A. y Onken, U. 1991. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett., 3:155-16.

West, T.P. y Reedhamer, B. 1992. Influence of vitamins and mineral salts upon pullulan synthesis by *Aureobasidium pullulans*. Microbios., 71:115-123.

West, T.P. y Reedhamer, B. 1993a. Polysaccharide production by a reduced pigmentation mutant of the fungus *Aureobasidium pullulans*. FEMS Microbiol. Lett., 113:345-349.

West, T.P. y Reedhamer, B. 1993b. Effect of pH on pullulan production relative to carbon source and yeast extract composition of growth medium. Microbios., 75:75-82.

West, T.P. y Reedhamer, B. 1993c. Effect of temperature on pullulan production in relation to carbon source. Microbios., 75:261-268.

Yong, C.S., Young, H.K., Hyun, S.L., Sook, J.C. y Si, M.B. 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnol. Bioeng., 33:129-133.

Yuen, S. 1974. Pullulan and its applications. Process Biochem., 9:7-9, 22.

Zajic, J.E. y Le Duy, A. 1973. Flocculant and chemical properties of a polysaccharide from *Pullularia pullulans*. Appl. Microbiol., 25:628-635.