

Producción de un biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnoliae* en cultivos sumergidos por carga

José Miguel Torres Gudiño* y José Antonio Sánchez Crispín

Laboratorio Planta Piloto de Fermentaciones. Insumos Biológicos PROULA,
Zona Industrial La Alegría Lagunillas. Mérida, Venezuela.

Recibido: 27-09-00 Aceptado: 22-07-01

Resumen

Los biosurfactantes son moléculas tensoactivas de origen biológico obtenidas de células animales, vegetales y microbianas. Se estudió la producción de biosurfactantes por varios microorganismos mediante técnicas de fermentación sumergida. Se seleccionó a *Torulopsis magnoliae* y las condiciones de producción óptima del surfactante por esta levadura en un fermentador de 15 litros y en medio melaza - aceite, fueron: Agitación 500 rpm, aireación 0,6 vvm, temperatura 30°C y pH inicial 5,0. El surfactante, medido por disminución de la tensión superficial, es excretado al medio durante el crecimiento de la levadura y la producción se detiene al agotarse los azúcares de la melaza. Este es soluble en agua aunque no lo es en éter dietílico a pH 9. No obstante, la extracción y purificación parcial se realiza con este solvente después de acidificar hasta pH 2 el medio de cultivo. La preparación de surfactante contiene azúcares, disminuye la tensión superficial del agua hasta 40 dinas/cm, lisa glóbulos rojos y forma rápidamente emulsiones acuosas de petróleo pesado (Tipo Cerro Negro 10° API).

Palabras claves: Biosurfactantes; fermentación; tensoactivos; *Torulopsis magnoliae*.

Production of a biosurfactant by *Torulopsis magnoliae* in submerged batch culture

Abstract

The biosurfactants are tensoactive molecules biologis from animals, vegetal and microbial cells. The production of biosurfactants was studied in several microorganisms using submerged fermentation techniques. *Torulopsis magnoliae* was selected as the best surfactant producer and the culture conditions in oil - molasses media in a fermentor of 15 liters were: 500 rpm agitation, 0.6 vvm aeration, 30°C temperature and initial pH 5.0. The surfactant, measured by the decrease of the superficial tension, is excreted to the medium during the growth stage of the yeast and its production stops when the sugar of the molasses is exhausted. This surfactant is soluble in water but not in diethyl ether at pH 9.0. Nevertheless, the extraction and partial purification was carried out with ether solvent after acidifying the cultivation medium to pH 2.0. The obtained preparation contained sugars, it lowered superficial tension of the

* Autor para la correspondencia. Telf-fax (0274) 996-1632. E-mail: manda@ciens.ula.ve

water to 40 dina/cm, it also produced hemolysis and quickly formed watery emulsions of heavy petroleum (Type Cerro Negro, 10° API).

Key word: Biosurfactants; fermentation; tnssoactives; *Torulopsis magnoliae*.

Introducción

Los biosurfactantes son moléculas con actividad superficial, producidas por células vivas (1-3). Suelen ser metabolitos secundarios excretados por microorganismos cuando crecen en medios con sustratos oleosos. Su presencia en medios acuosos modifica la tensión superficial y emulsifica los sustratos hidrófobos y se han clasificado de acuerdo con las moléculas que los estructuran. Así, se les ha denominado lípido de trehalosa, ramnolípidos, lípidos de soforosa, glucolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos (1, 2).

En general, los surfactantes están integrados a procesos que utilizan diversos tipos de industrias en áreas agrícolas, alimenticias, de cosméticos y petroquímica (3, 4). La demanda industrial de estas moléculas es alta en la industria petrolera, donde pueden ser empleadas en la emulsificación de bitúmenes. Ello, por una parte, permite una manipulación más fácil de los petróleos pesados durante su extracción y transporte y, por la otra, se pueden emplear para elaborar fórmulas de mezclas de carburantes y agua similares a la Orimulsión de INTEVEP (5).

Los surfactantes de origen biológico también se pueden emplear para desarrollar procesos que se han denominado biodesulfuración, biocraqueo y bioremediación que requieren de medios de cultivo con fases acuosas continuas. La ventaja de estos biosurfactantes sobre los de origen químico es que son degradables (3, 6).

Para producir biosurfactantes es necesario contar con microorganismos seleccionados según determinadas características. En experiencias anteriores relacionadas con la degradación de asfaltenos y solubilización de crudo, hemos producido biosurfactantes

sintetizados por microorganismos del género *Pseudomonas* (7, 8). En este trabajo se reporta la búsqueda y selección de un microorganismo, preferiblemente no patógeno productor de biosurfactantes bajo condiciones aeróbicas y en un medio de cultivo de bajo costo.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos

Se utilizaron cepas de las bacterias *Pseudomonas sp* Mez 2 y *Pseudomonas sp* Mez 3 aisladas y caracterizadas previamente (7). También se estudiaron las levaduras *Torulopsis petrophylum* ATCC 20225, *Torulopsis magnoliae* ATCC 12573 y *Saccharomyces lipolitica* ATCC 8662. Las bacterias fueron conservadas a 20°C en cuñas de agar nutritivo y las levaduras en agar papa-dextrosa (6).

2. Selección del microorganismo productor de biosurfactantes

Los inóculos de cada uno de los diferentes microorganismos se hicieron en fio-las de 125 mL con 50 mL de medio de producción (MP) que contiene peptona 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L y glicerol 10 g/L. El pH inicial fue de 5,0 para las levaduras y de 7,0 para las bacterias. Este medio fue esterilizado a 120°C y 15 psi durante 30 min: una vez inoculados, los cultivos se incubaron en un agitador orbital TORMASAN a 160 rpm y 30°C y a las 48 horas se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min. A 40 mL de cada uno de los sobrenadantes se le agregaron 5,0 g de crudo pesado tipo Cerro Negro (10°API). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos con un vortex y se observó a simple vista si se formó o no una emulsión. En caso positivo se seleccionó el microorganismo como probable productor

del biosurfactante. Se hicieron observaciones al microscopio de luz de muestras de cada cultivo. El objetivo fue comprobar que la morfología de los microorganismos fuera similar al inicio y al final del cultivo para eliminar la posibilidad de contaminación. Como controles se dispusieron medios sin inocular y cultivos inoculados con microorganismos que no producen surfactantes. Como será discutido posteriormente, se decidió escoger a *Torulopsis magnoliae* y con esta levadura se realizaron todas las experiencias que se indican en lo sucesivo.

3. Producción de biosurfactantes por fermentación sumergida en fermentadores de 2,5 y 15,0 litros

Cultivos de 200 mL de MP contenido en fioas de 500 mL, se incubaron bajo las mismas condiciones indicadas arriba. A las 24 ó 48 horas estos cultivos sirvieron como inóculos para 2 litros del mismo medio dispuestos en un fermentador TORMASAN de 2,5 litros (6, 9) e incubados durante 24 horas a 30°C, 2,5 vvm y 500 rpm. Al final de las 24 horas, 1,2 litros de este cultivo sirvieron, a su vez, como inóculo de 12 litros del mismo medio contenidos en un fermentador L.K.B Bromma Ultraferm modelo 1601 - 13 de 15 litros. El cultivo creció a 30°C, 1,5 vvm y 500 rpm. En los casos donde se indica se cambió la composición del medio de cultivo para lograr menores costos del proceso y para inducir la producción del biosurfactante se añadió 10% de aceite de maíz marca COPO-SA. Todas las fermentaciones se hicieron por carga y los fermentadores no fueron esterilizados antes de la adición del medio que se esterilizó bajo las condiciones antes señaladas. Cuando fue necesario la espuma se controló con pequeñas cantidades (0,5 - 3 mL) de aceite de silicona.

A diferentes tiempos durante la fermentación se retiraron de los cultivos muestras de 6 mL y se centrifugaron a 5000 x g durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en agua destilada y, con el fin de cuantificar el crecimiento celular, se deter-

minó en él densidad óptica (D.O Abs 410 n.m), peso seco (estufa a 80°C) y número de células (cámara de Neubauer) (6). En los sobrenadantes de esa centrifugación se midieron pH (sonda combinada) y tensión superficial. Esta última mediante un tensiómetro de superficie (marca Fisher, modelo 20). El procedimiento consistió en depositar 4 mL de cada sobrenadante en una cápsula de Petri e introducir el anillo del tensiómetro de manera que estuviera en contacto con la superficie de la muestra. Accionando la manilla del aparato se fue separando el anillo de la superficie. La fuerza requerida para lograr la separación completa del anillo se registra como tensión superficial en un dial con una escala en dinas/cm (1, 6). Como controles se midieron las tensiones superficiales del agua pura y del medio de cultivo antes de inocular.

4. Recuperación y Propiedades del biosurfactante

Los cultivos de 2 y de 12 litros, obtenidos como se indicó anteriormente, se centrifugaron a 5000 x g en una centrifuga Sharples de Flujo continuo, nº 77-T-1- 496. Los sedimentos se utilizaron en algunos casos como inóculos para otras fermentaciones. Los sobrenadantes se acidificaron hasta pH = 3 con ácido sulfúrico 98% y se mezclaron en un embudo de decantación con éter dietílico en relación 2:1. Después de agitar, las mezclas se dejaron en reposo durante 15 minutos. En cada caso el surfactante se extrajo completamente por la fase orgánica. Esta se retiró y el éter dietílico se evaporó a 40°C, bajo vacío, en un evaporador rotativo marca BÜCHI modelo RE/B. El residuo sólido, que denominamos Biosurfactante Parcialmente Purificado (BPP) se resuspendió (10:1) en una solución 0,1 M de bicarbonato de sodio y la solución se guardó a 20°C hasta su utilización.

Para determinar la capacidad surfactante de los BPP, 0,1 mL de cada preparación se añadieron en pozos abiertos en placas de agar sangre de conejo. Las placas se

incubaron a 30°C y a las 24 horas se observó si había halos de bbb hemólisis (6).

Las capacidades de las diferentes muestras de BPP para disminuir la tensión superficial del agua fueron medidas con el tensiómetro como se indicó anteriormente. Cada experiencia consistió en mezclar 0,05 mL de muestra con 10 mL de agua destilada. Los valores obtenidos fueron comparados con el valor medido para el agua pura. La diferencia entre este valor y los de las muestras, midió aquella capacidad.

La emulsificación de petróleo pesado Cerro Negro (10° API) por las muestras del BPP se midió cualitativamente. Para ello se añadieron 10 mL del BPP en una fiola que contenía 5 g de petróleo pesado Cerro Negro (10° API) en 75 mL de agua, mantenida a 30°C. Después de agitar durante 20 seg, se observó si existía o no emulsificación del petróleo (6).

La presencia de azúcares en muestras de BPP se determinó por el método de Antroña (10).

Resultados y Discusión

1. Selección del microorganismo productor

De acuerdo con sus capacidades de emulsionar petróleo pesado (Tabla 1), se preseleccionaron dos cepas de *Pseudomonas sp.* y una de *Torulopsis magnoliae*. Por el aspecto de los filtrados de las emulsiones y por la capacidad observada de permitir o no la adsorción del petróleo a las paredes de las fiolas, se deduce que son diferentes los biosurfactantes producidos por ambos tipos de microorganismos, bacterias y levaduras. Se siguieron tres criterios para escoger entre las tres cepas preseleccionadas: El primero tiene que ver con el mayor tamaño y densidad de la levadura. Este hecho puede contribuir a una mayor facilidad para separarla de los cultivos que contienen surfactantes. Por otra parte, el nicho ecológico de esta levadura está relacionado con las plantas de *Mag-*

nolia sp. de cuyas flores ha sido aislada (11, 12). Su inocuidad para los humanos no ha sido establecida pero es muy probable que como ocurre en otros casos similares de microorganismos aislados de vegetales, esta levadura no sea parásito de animales (13). El tercer criterio se relaciona con *Pseudomonas* y es preventivo pues no pudimos precisar con exactitud la especie a la que pertenecen las dos cepas de *Pseudomonas* Mez 2 y Mez 3. En vista de su conocida capacidad para resistir los antibióticos (14) y de que no pudimos descartar la posibilidad de que pudieran ser patógenas, decidimos no utilizarlas en este trabajo, a pesar de ser buenas productoras de biosurfactantes. Así, en todas las experiencias que siguen, se empleó a *T. magnoliae* como agente productor de biosurfactantes.

2. Producción de biosurfactantes por fermentación sumergida

Resultados previos indican que las condiciones óptimas para el crecimiento de *T. magnoliae* son 30°C y pH = 4 - 5 (11, 12, 15). Nuestros resultados (no mostrados) confirman estos valores óptimos (6). La levadura es facultativa y utiliza una amplia variedad de fuentes de carbono (sacarosa, dextrosa, galactosa, xilosa y, glicerol) (6, 11, 12, 15). Las experiencias que realizamos en fiolas con agitación en el MP, nos permitieron comprobar cualitativamente que *T. magnoliae* produce un surfactante que emulsiona petróleo y que el suministro de oxígeno es importante para la producción del surfactante. En vista de que la agitación en fiolas no lo aporta en las cantidades requeridas por la levadura, se decidió utilizar un fermentador TORMASAN de 2,5 litros provisto de un sistema de aspersión de aire y un agitador de tres aspas. Varias pruebas realizadas con este fermentador bajo similares condiciones que en las fiolas, pero modificando el medio con adición de sacarosa como substrato complementario, nos permitieron seleccionar una agitación de 500 rpm y un aporte de aire de 2,5 vvm, como óptimos para producir el surfactante a 30°C

Tabla 1
Características de los Microorganismos Productores de Biosurfactantes

Cepa Microbiana	Morfología al microscopio óptico	Emulsificación de crudo Cerro Negro en el medio
<i>Pseudomonas sp.</i> Mez 2	Bacilos	++
<i>Pseudomonas sp.</i> Mez 3	Bacilos	++
<i>Saccharomycopsis lipolitica</i>	Levaduras	+
<i>Torulopsis petrophylum</i>	Levaduras	+/_
<i>Torulopsis magnoliae</i>	Levaduras	++
<i>Aspergillus niger*</i>	Hifas	-
Medio de producción		+/_

++ = Se emulsificó el 100% del crudo (5 gramos)
 + = Se emulsificó el 50% del crudo
 +/_ = Se emulsificó el 10% del crudo
 = No se emulsificó crudo

(Figura 1). El pH inicial varió durante el proceso y no fue ajustado. La disminución de la tensión superficial ocurre durante todo el crecimiento y se estabiliza a las 20 horas coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento. Se ha reportado (15-17) que en *Pseudomonas aeruginosa* la producción del surfactante ocurre al final de la fase exponencial de crecimiento. Este no es el caso para *T. magnoliae* (Figura 1) lo que le otorga una ventaja adicional sobre *Pseudomonas*, pues el tiempo de producción del surfactante se reduce.

Se realizaron otras experiencias cambiando completamente el medio de cultivo con el fin de estudiar la producción del biosurfactante en un medio de bajo costo como la melaza. También se utilizó aceite vegetal que ha sido reportado como un inductor efectivo de la producción de surfactantes en otras levaduras (18-20). Finalmente, se eliminó la fase de latencia utilizando como inóculos cultivos en fase exponencial. En la Figura 2 se observa que las células comienzan a crecer y producir el surfactante inmediatamente después del inóculo sin que se aprecie una fase de latencia. Con medio melaza y en ausencia de aceite, la producción del biosurfactante por *T. magnoliae* no es detectable. Cuando se le

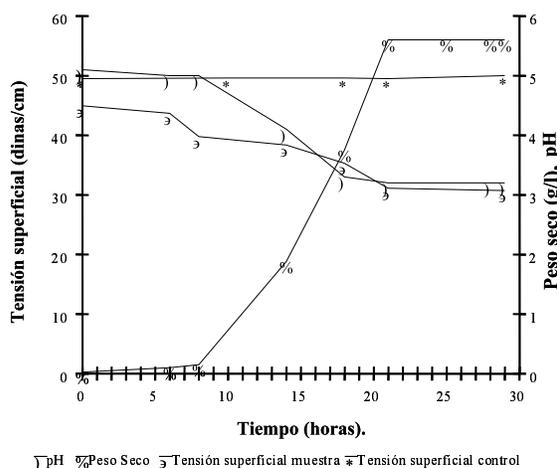


Figura 1. Producción de Biosurfactante y Biomasa por *Torulopsis magnoliae* en medio de producción. Se utilizó un fermentador TORMASAN de 2,5 litros con 2 litros de medio (5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 95 g/L de sacarosa y 100 g/L de glicerol). Agitación 500 rpm, aireación 2,5 vvm y temperatura 30°C. Las determinaciones se hicieron como se indica en materiales y métodos.

agrega aceite de maíz al medio melaza la producción final del biosurfactante, es 70% menor que la observada en MP (Figura 1). El surfactante producido por *T. magnoliae* durante la fase exponencial es excretado al caldo de cultivo pues se recupera totalmente en el sobrenadante y el tratamiento de las células con lavados sucesivos no condujo a incrementar esa recuperación. En el MP la biomasa que se obtiene es 12 veces menor que en medio melaza-aceite (Figura 2). Este resultado no parece ser razonable pues podría esperarse que a mayor cantidad de células y en presencia de aceite, se produjera una mayor cantidad de biosurfactante. Probablemente el flujo de aire y el diseño de los fermentadores estén involucrados en el resultado. Puede también ocurrir que en un medio melaza-aceite una parte sustancial del biosurfactante producido se una a moléculas de aceite para emulsificarlas. Esta situación impediría que el biosurfactante se encontrara libre, requisito necesario para disminuir la tensión superficial del sobrenadante del cultivo.

En la Tabla 2 se precisan las condiciones experimentales óptimas para la producción de biosurfactante en medio melaza-aceite. Con propósitos de comparación se indican también las características de otros procesos de producción reportados en la literatura (18-20). Se observa, en general, que las fuentes de carbono y las condiciones experimentales son distintas y la geometría de los reactores es diferente. No obstante, los valores de productividad horaria de 0,026 g/g h, que hemos obtenido, son del mismo orden de magnitud que los reportados para surfactantes producidos por *Torulopsis apicola* y *Torulopsis bombicola* (18, 19). La ventaja de nuestro sistema sobre el de otros autores es que utilizamos un medio de cultivo fácilmente disponible y relativamente barato (melaza-aceite) y las condiciones en las que trabajamos no requieren de una esterilización previa de los reactores.

El principio activo existente en la preparación de BPP no es soluble en éter a pH =

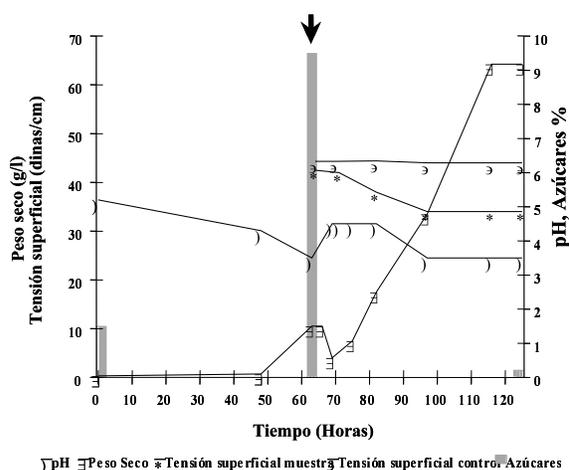


Figura 2. Producción de Biosurfactante y Biomasa por *Torulopsis magnoliae* en medio melaza-aceite. Entre 0 y 65 horas se utilizó un fermentador TORMASAN de 2,5 litros. Volumen de medio melaza 2 litros (1,5% de azúcar, 6 g/L de urea, y 10 g/L de fosfato), agitación 500 rpm, aireación 2,5 vvm y temperatura 30°C. A partir de las 65 horas este cultivo sirvió de inóculo a 12 litros de medio melaza contenido en un fermentador LKB Bromma de 15 litros. Este medio adecuado para la producción de biosurfactante, contiene 9,5% de azúcar, 10% de aceite de maíz y 6 g/L de urea. Agitación 500 rpm, aireación 1,5 vvm y temperatura 30°C. Las determinaciones se hicieron como se indica en materiales y métodos.

9 pero sí a pH= 2. La capacidad del BPP para lisar globulos rojos de conejo lo incluye dentro de los agentes tensoactivos, lo que se ratifica porque disminuye a 40 dinas/cm la tensión superficial del agua (69 dinas/cm) y emulsiona crudos pesados tipo Cerro Negro (10° API).

La preparación del BPP contiene azúcares. Es probable, que el tensoactivo sea un glucolípido como los reportados para *Pseudomonas aeruginosa*, *Torulopsis mag-*

Tabla 2

Comparación de las características de producción de biosurfactante por diferentes especies de levaduras del género *Torulopsis*.

Características de las fermentaciones y del fermentador.	Fermentación por carga 5 L, fermentador New Brunswich de 7L.	Fermentación por carga 8 L, fermentador Bio E Braum de 14 L.	Fermentación por carga 2 L, fermentador TORMASAN de 2,5 L.	Fermentación por carga 12 L, fermentador LKB BROMMA de 15 L.
Bibliografías.	Cooper y Paddock, 1984.	Homel <i>et. al.</i> , 1994.	Presente trabajo.	Presente trabajo.
Microorganismos (cepas).	<i>Torulopsis bombicola</i> ATCC 22214.	<i>Torulopsis apicola</i> IMET 43747.	<i>Torulopsis magnoliae</i> ATCC 12573.	<i>Torulopsis magnoliae</i> ATCC 12573.
Condiciones.	Estériles, 30°C, 500 rpm, 0,7 vvm.	Estériles, 25°C, 300 rpm, 0,6 vvm.	No estériles 30°C, 500 rpm, 2,5 vvm.	No estériles 30°C, 500 rpm, 1,5 vvm.
Medio de cultivo.	9,5% de glucosa, 10% aceite vegetal.	10% glucosa, sulfato de sodio, 3% hexadecano.	MP. 0,5% de peptona, 0,5% ext. lev., 9,5% sacarosa, 10% glicerol.	Medio melaza. 10% azúcar, 10% de aceite de maíz, 0,6% urea
Tiempo.	150 h.	90 h.	28 h.	60 h.
Consumo de azúcares.	93 g.		93 g.	49 g.
Rv (Biosurfactante)	70 g/L.	30,6 g/L.	20 g/L.	11,4 g/L.
Pv (Biosurfactante)	0,5 g/L h.	0,34 g/L h.	0,7 g/L h.	0,2 g/L h.
R (Biosurfactante)	0,75 g/g.	0,35 g/g.	0,2 g/g.	0,1 g/g.
P (Biosurfactante)	0,005 g/g h.	0,044g/g h.	0,008 g/g h.	0,026 g/g h.
Rv (Biomasa)	20 g/L.		5,5 g/L.	64,25 g/L.
Pv (Biomasa)	0,13 g/L h.		0,26 g/L h.	1,37 g/L h.
R (Biomasa)	1,07 g/g.		0,06 g/g.	0,68 g/g.
P (Biomasa)	0,007 g/g h.		0,03 g/g h.	0,001 g/g h.

Nota. Rendimiento volumétrico (Rv) = g de biosurfactante o biomasa/ litros de medio, Rendimiento (R) = g de biosurfactante o biomasa/ g de azúcar consumida, Productividad volumétrica (Pv) = g de biosurfactante o biomasa/ litros de medio por tiempo de fermentación, Productividad (P) = g de biosurfactante o de biomasa/ g de azúcar consumida por tiempo de fermentación. M.P = Medio de producción.

noliae y *Torulopsis apicola* (2, 12, 15, 16, 18, 19). No obstante, es necesario obtener puro el surfactante para precisar esta característica. Una propiedad adicional observada es la actividad antibacteriana y antifúngica de la preparación del BPP en las zonas de las placas de agar-sangre, se adelantan experimentos de purificación del agente tensoactivo para descartar la presencia de antibióticos, diferentes al biosurfactante, existentes en la preparación del BPP que hemos logrado producir y cuyas características preliminares se reportan en este trabajo. Este resultado explicaría porque a pesar de que los fermentadores no fueron esterilizados no se observó contaminación en los cultivos.

Las barras grises indican el contenido de azúcares (%) a los tiempos indicados. A las 120 horas se obtuvo 11,4 g/L de biosurfactante. La flecha indica el momento en que se inoculó el fermentador LKB Bromma. Las determinaciones se hicieron como se indica en materiales y métodos.

Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al CDCH-ULA, por la ayuda económica prestada para la realización de este trabajo a través del proyecto C-487-97. Igualmente a J. Louis Salager del Laboratorio FIRP de la Facultad de Ingeniería de la U.L.A. por sus enseñanzas acerca de los surfactantes.

Referencias

1. APOSTOL J. Producción de Biosurfactantes para Recuperación de Crudos Pesados (Tesis de Licenciatura en Biología), Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), pp. 5-10, 1991.
2. COOPER D.G., ZAJIC J.E. *Adv Appl Microbiol* 26: 229-253, 1980.
3. AFIECHT E. *Trends Biotechnol* 10 (6): 208-217, 1992.
4. ANTON R., SALAGER J.L. SURFACTANTES. Cuadernos FIRP. Fenómenos Universidad de los Andes, Mérida (Venezuela), 300: 1-46, 1990.
5. RIVAS H., NUÑEZ G., DALAS C. *Visión Tecnológica* 1 (1): 18-25, 1993.
6. TORRES J.M. Producción de un Biosurfactante Microbiano Mediante Fermentación Sumergida por Carga (Tesis de Licenciatura en Biología), Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), pp. 49-141, 1997.
7. ROJAS J., SÁNCHEZ J.A. *Act Cient Venez* 47: 1-6, 1997.
8. RIVAS C. Biodegradación de Asfáltenos (Tesis de Licenciatura en Biología), Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), pp. 28-53, 1996.
9. ZAMORA E., SÁNCHEZ J.A. *Act Cient Venez* 46: 135-139, 1995.
10. SCOTT T.A.J.R., MELVIN E.H. *Anal Chem* 25: 1656-1661, 1953.
11. ARINO S., MARCHAL R., VANDECAS-TEELE J.P. *Microbiol Biotechnol* 45: 162-168, 1996.
12. BARNETT J., PAYNE R., YARROW D. YEAST: *Characteristics and Identification*, Second Edition. Cambridge University Press, pp. 191-683, 1990.
13. AZUAJE R.A. Producción de Xantano por *Xanthomonas campestris* en un Medio de Cultivo No Convencional (Tesis de Licenciatura en Biología), Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), pp. 2-3, 1994.
14. FARMA S.A. Servicio Científico. ANTIBIOTICO, 1977.
15. HOMEL R.K., STGNER S., WEBER L., KLEBER H.P. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: 192-197, 1994.
16. ROCHA C., SAN - BLAS F., VIERMA L. *Microbiol Biotechnol* 8: 125-128, 1992.
17. COOPER D.G., PADDOCK D.A. *Appl Environ Microbiol* 47 (1): 173-176, 1984.
18. GORIN P.A., SPENCER J.F., TULLOCH A.P. *Can J Chem* 39: 816-855, 1961.
19. SUSUMU I., SHIGEO I. *Appl Environ Microbiol* 43 (6): 1278-1283, 1982.
20. URS A., FIECHTER A., REISER J. *J Biol Chem* 43 (6): 19786-19785, 1994.