

PRODUKSI PULLULAN DARI SUBSTRAT PATI SAGU OLEH *Pullularia pullulans*

[The Pullulan Production From Substrate of Sagoo Starch By *Pullularia pullulans*]

Dosis Undjung

Staf Pengajar Program Studi Pengolahan Hasil Pertanian, FAPERTA-UNPAR,
Jl. Yos Sudarso Kampus UNPAR Tunjung Nyaho, Palangka Raya

Diterima 18 Januari 2005 /Disetujui 9 Juni 2005

ABSTRACT

The aim of this research was to recognize the potency of pullulan by *Pullularia pullulans* from hydrolyzed Sagoo starch as opposed to sucrose. Another objective was to find out a better condition for agitation of pullulan production in a batch fermentation.

Sagoo can be found in Kuala Kapuas, Central Kalimantan. Initially sago was made into sago starch. The Sago starch was then hydrolyzed to be used as substrate for pullulan production. As a comparison, sucrose was also used. Pullulan production was carried out by *pullularia pullulans*, T37A or CBS CYPP using various agitation rate & incubation period. The research showed that increase in agitation resulted in increase in pullulan production. At 100 rpm, the yield was 1.299 g/l while at 150 rpm yield was 1.546 g/l. Strain CBSCYPP also produced more pullulan than T 374.

Key words : Pullulan production, Sagoo starch and *Pullularia pullulans*

PENDAHULUAN

Penelitian, kajian dan produksi pullulan masih jarang diupayakan di Indonesia. Walaupun kegunaan pullulan untuk berbagai industri sudah diketahui. Pati sago merupakan salah satu bahan baku alternatif untuk produksi pullulan. Namun penelitian mengenai pemanfaatan pati sago untuk produksi pullulan belum dilakukan.

Pullulan merupakan salah satu polisakarida ekstraseluler yang banyak menarik perhatian ilmuwan dan kalangan industri, karena kegunaannya maupun tingkat konversinya yang tinggi. Pullulan banyak digunakan sebagai pengganti plasma darah untuk pengobatan shock, stabiliser tanah, perekat, flokulan, anti koagulan, pencampur obat gigi, dasar lipstik, dan pelapis resin (Shipman dan Fan, 1988). Dalam industri pangan pullulan digunakan sebagai pengental, bahan pengikat dan bahan pengemas. Kegunaan untuk pengemas bahan pangan dimungkinkan karena kemampuan pullulan untuk membentuk film yang tidak berwarna, tidak berbau dan tidak berasa (Sutherland, 1989). Plastik dari pullulan memiliki kelebihan dari jenis plastik lainnya, terutama bersifat non toksik, permeabilitas rendah terhadap oksigen, dan dapat didegradasi oleh mikroorganisme (Shipman dan Fan, 1988). Diungkapkan pula pullulan tidak berkalori, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti pati dalam pangan rendah kalori. Produksi pullulan secara industrial

telah dilakukan oleh Hayashibara Biochemical Laboratories Inc, Okayama, Japan, dengan substrat hidrolisat pati (Bao & LeDuy, 1989 & 1990).

Menurut Sanford (1985) seleksi strain, penentuan pH, dan penentuan kandungan fosfat dari media secara tepat dapat menghasilkan pullulan dengan bobot molekul 5×10^4 sampai 250×10^4 dengan derajat polimerasi 100 sampai 5.000 bahkan dapat mencapai bobot molekul 4×10^6 . Pullulan dengan bobot molekul tinggi dan rendemen 25 sampai 60 persen dihasilkan oleh *Pullularia pullulans* pada berbagai sumber karbon (sirup pati, glukosa, sukrosa) dengan pH awal 5 sampai 6 dan waktu fermentasi 7 hari. Pullulan hanya diproduksi oleh *Pullularia pullulans* bila terdapat sumber karbon yang sesuai pada keadaan berlebih, sedangkan laju pertumbuhan sel terhambat karena keberadaan nutrien-nutrien tertentu (Catley, 1989). Kristiansen et al., (1982) menyatakan kekurangan sumber nitrogen untuk tumbuh merupakan faktor penting dalam produksi pullulan. Fenomena tersebut menginformasikan bahwa pullulan adalah metabolit sekunder yang berhubungan dengan fase penyimpanan dan pemeliharaan dari siklus hidup kapang *Pullularia pullulans*.

Ueda et al., (1982) menyatakan produksi pullulan pada suhu 25°C lebih baik dari pada 30°C. Bao dan LeDuy (1990) menegaskan bahwa suhu optimal untuk produksi pullulan adalah 25°C dan disarankan menggunakan kecepatan agitasi 100 rpm dan aerasi 0,7 vvm untuk

produksi pullulan dengan media hidrolisat (sumber karbon hidrolisat gambut).

Produksi pullulan sangat dipengaruhi oleh strain mikroorganisme yang digunakan. Hal ini dibuktikan oleh Taguchi et al., (1983) yang menggunakan 3 (tiga) strain *Pullularia pullulans* dengan media 5 persen sukrosa, suhu 30°C dan umur kultur 96 jam. Setiap strain memproduksi pullulan dengan rendemen masing-masing 43.0, 5.0 dan 0.8 %.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi produksi pullulan oleh *Pullularia pullulans* dari hidrolisat pati sagu, dibandingkan dengan sukrosa (media konvensional) serta untuk mengetahui kondisi agitasi yang lebih baik untuk produksi pullulan secara curah (batch).

METODOLOGI

Bahan dan alat

Pati sagu diperoleh dari Kuala Kapuas (Kalimantan Tengah). Sukrosa, media penyimpanan dan pertumbuhan *Pullularia pullulans*, dan bahan kimia untuk analisis didapatkan dari toko bahan kimia di Palangka Raya.

Biakan *Pullularia pullulans* strain T 37 A diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan Mikrobiologi, Bogor dan strain CBS CY PP 14 dari laboratorium Mikrobiologi, FMIFA, IPB Bogor. Selain itu dipakai pula enzim α - amilase (aktivitas optimum pada t 90 - 95°C, pH 6.0 - 6.5, 60 - 120 menit IU) dan amiloglukosidase (AMG) dari NOVO (aktivitas optimum pada t 60°C, pH 4.5, 48 jam IU).

Selain peralatan gelas untuk pembuatan sirup glukosa, penyiapan media, proses fermentasi, dan analisis produk, juga diperlukan autoklaf, sentrifusi, neraca Sartorius, inkubator goyang (shaker), pH meter, oven, water-bath, ice-bath.

Metode

Dalam penelitian ini dipelajari dua aspek yang mempengaruhi proses produksi untuk menghasilkan rendemen pullulan yang tinggi, yaitu kecepatan agitasi dan waktu fermentasi. Hidrolisat pati sagu dan sukrosa dipilih sebagai sumber karbon untuk media produksi pullulan. Sebagai tahap awal dilakukan hidrolisis pati sagu secara enzimatik, dan dianalisis kandungan glukosanya.

Hidrolisis pati sagu

Pati sagu dibuat menjadi suspensi sagu 15% (W/V, dasar kering), digelatinisasi pHnya diatur (6,0-6,5) kemudian ditambahkan α - amilase (diaktivitasi optimal pada t 90 - 95°C, pH 6.0 - 6.5, 60 - 120 menit IU)

sebanyak 0,15% (W/V) dari kandungan pati sagu dan di inkubasi selama 1-2 jam. Setelah tahap likuifikasi tersebut selesai, dilakukan uji pati dengan larutan lugol. Proses dilanjutkan bila uji memberi respon warna coklat kemerah-merahan. Proses berikutnya adalah sakarifikasi menggunakan enzim AMG (diaktivitasi optimal pada t 60°C, pH 4.5, 48 jam IU) sebanyak 2% (W/V) dari total pati sagu yang digunakan dengan waktu inkubasi 48 jam. Pada tahap ini ditambah arang aktif 1% (W/V) pada hasilnya. Glukosa yang dihasilkan digunakan sebagai sumber karbon alternatif untuk produksi pullulan.

Persiapan inokulum

Komposisi media penyimpanan (Saboroud Agar slant) adalah neopepton 10 g/l, sukrosa 40 g/l, agar 15 g/l. Media I terdiri dari sukrosa 25 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, NaCl 1,0 g/l, MgSO₄.7 H₂O 0,5 g/l, (NH₄)₂ SO₄ 2,0 g/l, ekstrak yeast 0,5 g/l.

Media II memiliki komposisi sama dengan media I, kecuali sukrosa digantikan dengan glukosa hasil hidrolisis pati sagu, dengan tambahan larutan FeCl₃ (mengandung 1.920 mg per liter larutan), serta larutan unsur kelumit terdiri dari H₃BO₃ 114 mg/l, (NH₄)₆ Mo₇O₂₄. 4H₂O 484 mg/l, CuSO₄.5H₂O 780 mg/l, ZnSO₄.7H₂O 16.720 mg/l, MnCl₂.4H₂O 144 mg/l. Media II diatur pHnya menjadi 6.5 sebelum disterilisasi. Semua unit percobaan dilakukan dalam erlenmeyer 100 ml.

Produksi pullulan

Proses produksi pullulan dijelaskan dalam Gambar 1.

Model yang digunakan untuk menggambarkan proses fermentasi meliputi persamaan laju biomasa (X), produk (P), dan substrat (S), adalah :

$$\text{Laju biomasa : } dX/dt = f(X) = \mu(X) (1.0 - X/X_{max}),$$

dimana μ adalah konstanta pertumbuhan dan X_{max} adalah konsentrasi biomasa maksimum.

Laju produk : $dP/dt = nX + m dX/dt$, dimana m adalah konstanta pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan dan n adalah konstanta yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan.

$$\begin{aligned} \text{Laju substrat : } dS/dt = & -1/Y_{x/s} (dX/dt) - 1/Y_{p/s} (dP/dt) - k_e(X) \\ & dS/dt = -(1/Y_{x/s} + m/Y_{p/s}) dX/dt - (n/Y_{p/s} + k_e) X \\ & = -\alpha dX/dt - \beta(X) \end{aligned}$$

dimana : α adalah konstanta konsumsi substrat yang berhubungan dengan pertumbuhan biomasa dan pembentukan polisakarida yang berasosiasi dengan pertumbuhan; sedangkan β adalah konstanta konsumsi substrat yang berhubungan dengan pertumbuhan biomasa dan pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan. Rendemen nyata biomasa ($Y_{x/s}$) terhadap substrat dinyatakan sebagai $1/\alpha$, sedangkan rendemen

nyata produk terhadap biomasa ($Y_{p/x}$) dinyatakan sebagai m.

Analisis produk dilakukan terhadap biomasa dan cairan kultur, yaitu kandungan gula dalam substrat, dan polisakarida kasar yang dihasilkan. Pengukuran gula residu menggunakan metode Luff Schoorl, baik untuk glukosa ataupun sukrosa.

Model rancangan adalah acak blok dengan percobaan faktorial :

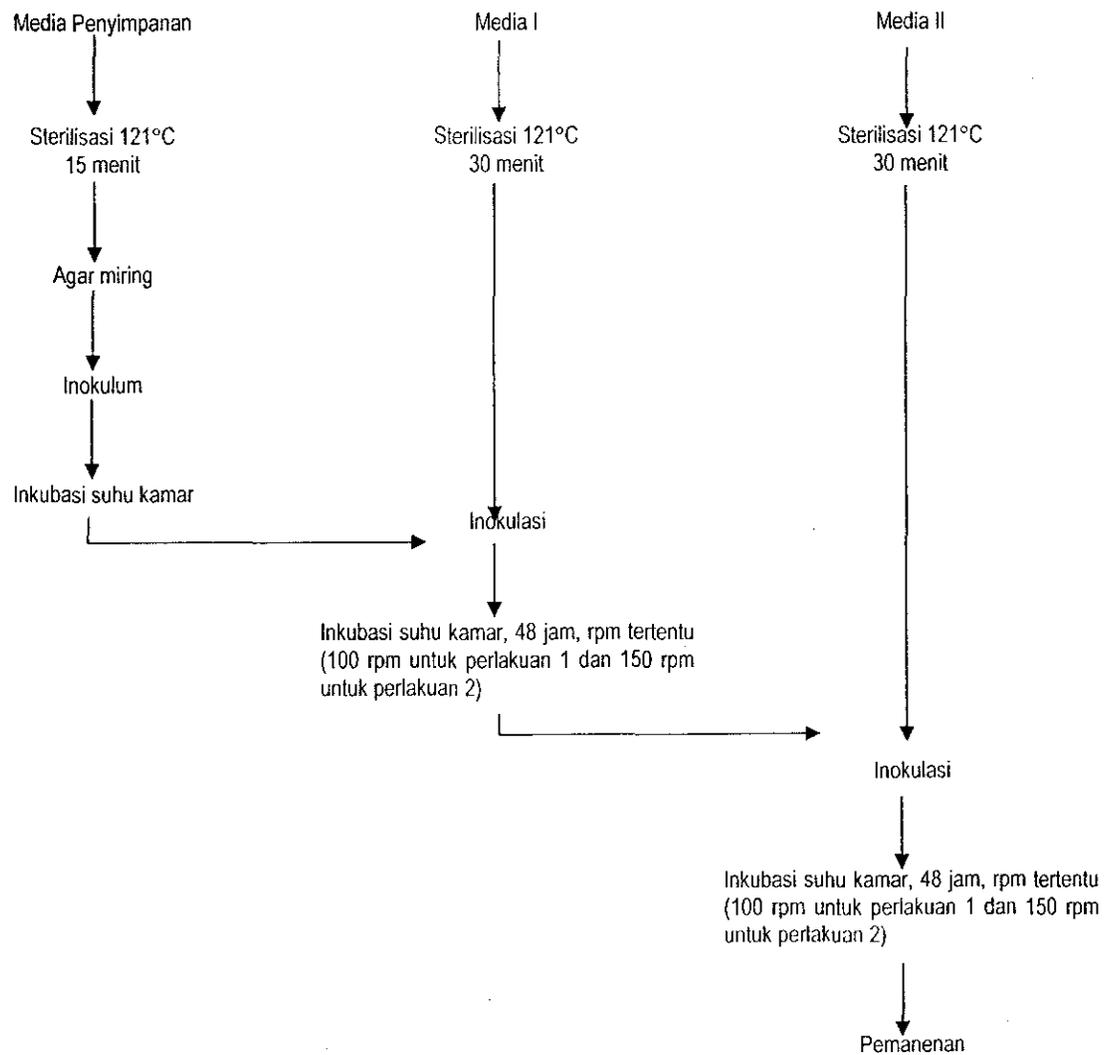
$$Y_{ijk} = \mu + CK + H_i + M_j + H_{mij} + \varepsilon_m (ijk).$$

Identifikasi Faktor

Faktor M adalah kecepatan agitasi (dua taraf), 100 dan 150 rpm. Faktor H adalah waktu fermentasi (tujuh taraf), 1 hingga 7 hari. Sebagai blok adalah substrat utama (hidrolisat pati sagu dan sukrosa). Variabel respon yang diamati adalah polisakarida kasar (g/l) hasil proses fermentasi.

Analisis Data

Menggunakan ANOVA. Jika nilai F hitung < F tabel dengan taraf signifikansi tertentu, hipotesis diterima pada tingkat kepercayaan $1 - \alpha$ (dilihat pada 95, 90 dan 75%).



Gambar 1. Proses produksi pullulan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hidrolisat pati sagu

Suspensi pati sagu dengan konsentrasi 15 persen (berdasar berat kering) yang dihidrolisis secara enzimatis menghasilkan produk dengan karakteristik : kadar gula pereduksi sebesar 12,3 persen (w/v), 12.5° Brix, DE = 98.4 persen. Dengan memperhitungkan kandungan pati sagu, yaitu 84.2 persen, didapatkan nilai konversi pati menjadi glukosa sebesar 97.39 persen.

Produksi pullulan

Analisis sidik ragam terhadap polisakarida kasar yang dihasilkan oleh *Pullularia pullulans* T 37 A selama proses fermentasi menunjukkan produksi polisakarida tidak berbeda nyata terhadap perubahan agitasi pada kisaran 100 – 150 rpm, tidak berbeda pula terhadap waktu fermentasi (1 – 7 hari). Produksi berbeda nyata untuk sumber karbon sukrosa dan hidrolisat pati sagu.

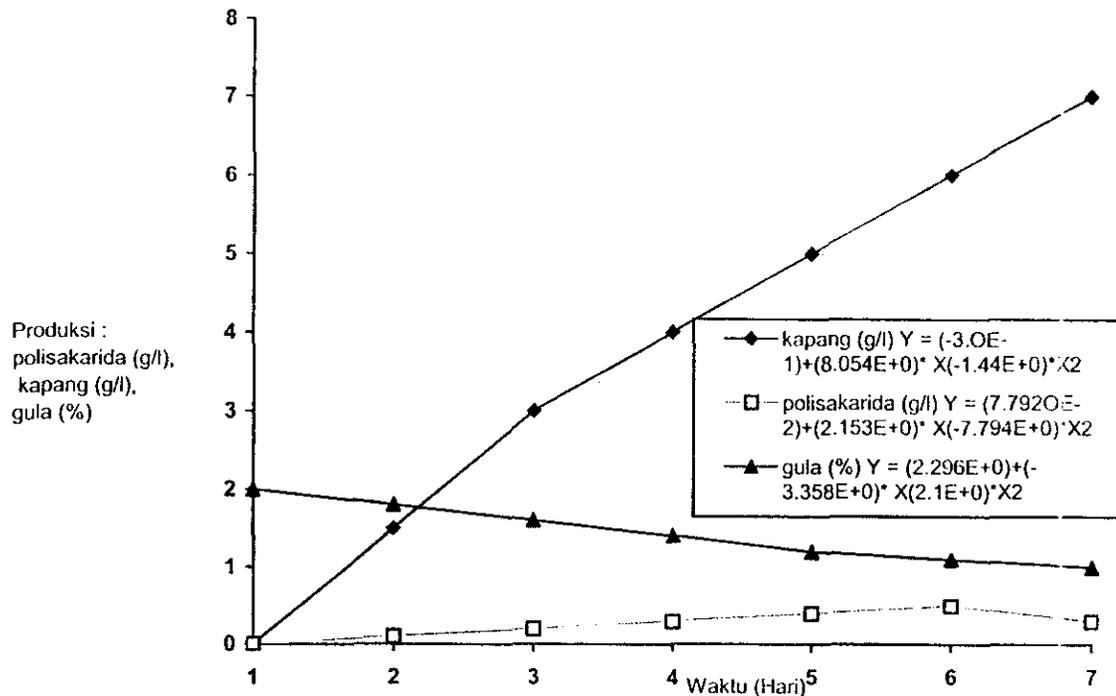
Sumber karbon hidrolisat pati sagu memberikan hasil polisakarida lebih tinggi dari pada sukrosa (sebagai sumber karbon) pada semua perlakuan. Namun rendemen polisakarida berdasarkan jumlah gula yang dikonsumsi menunjukkan angka lebih tinggi untuk polisakarida yang dihasilkan dalam media sukrosa (1-2%). Ini sejalan dengan

hasil penelitian Shipman dan Fan (1988) yang mendapatkan polisakarida kasar 15.66 g/l (71.5%) dari hidrolisat pati jagung dan 14.27 g/l (73.7%) dari media sukrosa.

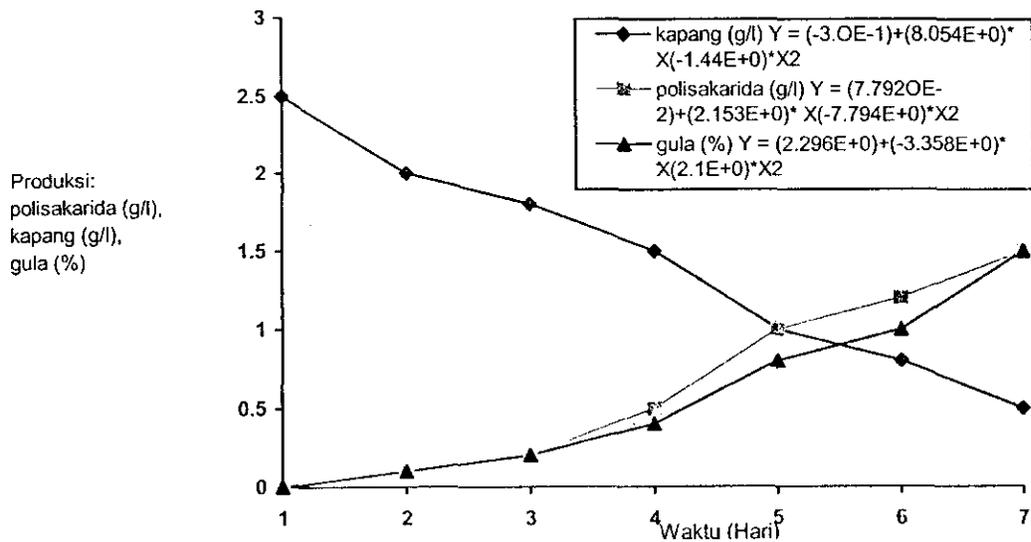
Kecepatan agitasi pada kisaran 100 – 150 rpm tidak memberikan perbedaan nyata pada produksi polisakarida, baik pada tingkat kepercayaan 95 persen ataupun 90 persen. Perbedaan nyata dapat dideteksi pada tingkat kepercayaan 75 persen. Namun perbedaan yang sangat tipis tersebut didukung oleh adanya kecenderungan pembentukan polisakarida maksimum dan lebih besar pada kecepatan agitasi 150 rpm.

Pembentukan polisakarida oleh *Pullularia pullulans* strain T 37 A optimum pada media sukrosa 2.5 persen sebagai sumber karbon dan kecepatan agitasi 100 rpm, serta pH awal media 6.5. Setelah inkubasi selama 7 hari pada suhu 25 – 28°C, media fermentasi menjadi kental dan memiliki pH 3.2. Puncak produksi polisakarida terjadi pada hari ke enam (Gambar 2.).

Pada proses fermentasi yang sama, dengan media sukrosa 2,5% pada kecepatan agitasi 150 rpm, pH akhir mencapai 3.8. dan puncak produksi polisakarida terjadi pada hari ke tujuh (Gambar 3.)



Gambar 2. Pertumbuhan dan produksi pullulan oleh *Pullularia pullulans* T 37 dalam media sukrosa 2,5% dan kecepatan agitasi 100 rpm

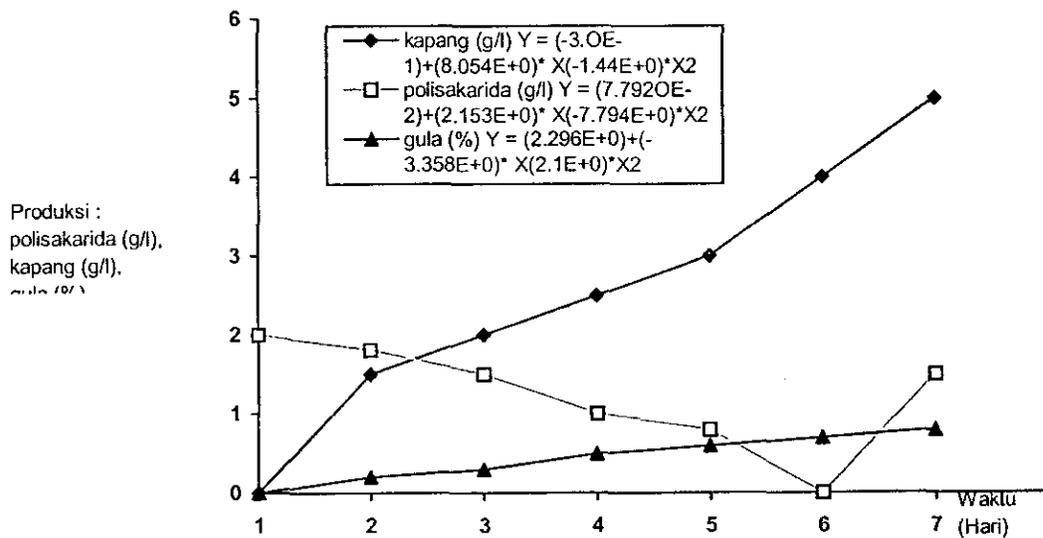


Gambar 3. Pertumbuhan dan produksi pullulan oleh *Pullularia pullulans* T 37 dalam media sukrosa 2.5% dan agitasi 150 rpm.

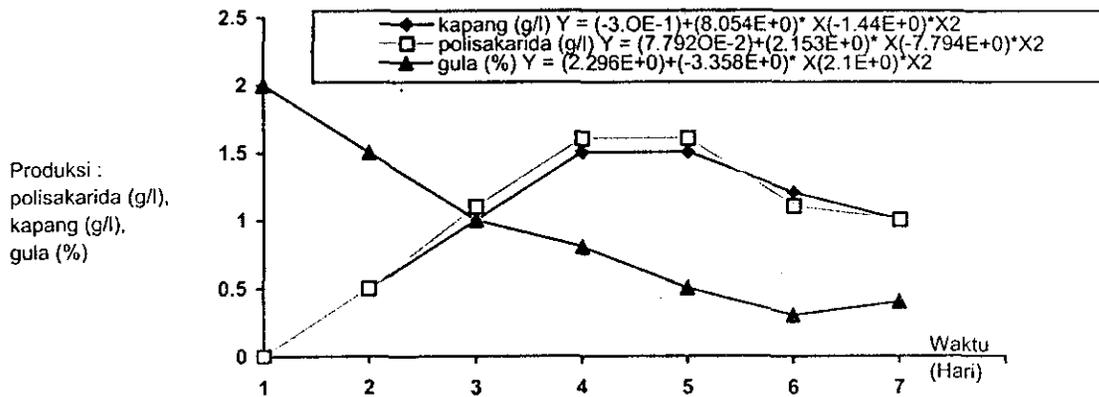
Selanjutnya pertumbuhan dan pembentukan polisakarida oleh *Pullularia pullulans* strain T 37 A dengan media 2.5 persen hidrolisat pati sagu sebagai sumber karbon, pH awal media 6.5, kecepatan agitasi 100 rpm. Setelah inkubasi selama 7 hari (suhu 25-28°C) didapatkan media fermentasi menjadi kental, pH akhir 2.77 dan puncak produksi terjadi pada hari ke tujuh (Gambar 4.). Selama proses fermentasi berlangsung terjadi

kecenderungan lingkungan menjadi asam, dikarenakan adanya penggunaan ion amonium.

Pada proses fermentasi yang sama, dengan media yang sama (sebagai sumber karbon) adalah hidrolisat pati sagu; hanya saja kecepatan agitasinya 150 rpm. Pada hari ke empat diketahui adalah puncak produksi polisakarida dimana pH akhirnya hanya 3,32 (Gambar 5.).



Gambar 4. Pertumbuhan dan produksi pullulan oleh *Pullularia pullulans* T 37 A pada media hidrolisat pati sagu 2.5%, agitasi 100 rpm.



Gambar 5. Pertumbuhan dan produksi pullulan oleh *Pullularia pullulans* T 37 A pada media hidrolisat pati sagu 2.5%, agitasi 150 rpm.

pH akhir pada media sukrosa lebih tinggi dari pada media hidrolisat pati sagu, dimamana adanya nerapan kecepatan agitasi 100 dan 150 rpm, maka pH akhir lebih tinggi pada kecepatan agitasi 100 rpm. Tingginya pH akhir pada agitasi 100 rpm dimungkinkan karena terjadinya metabolisme glukosa yang lebih baik pada tingkat agitasi tersebut, ini dibuktikan dengan adanya pertumbuhan kapang yang lebih besar dibandingkan dengan kecepatan agitasi 150 rpm.

Keempat kurva di atas memperlihatkan kecenderungan lingkungan menjadi asam selama proses fermentasi berlangsung, disebabkan adanya penggunaan ion amonium. Dikuatkan oleh pendapat Calley (1981) bahwa ion amonium yang dipakai sebagai sumber nitrogen menghasilkan ekspulsi proton dari sel yang mengakibatkan media menjadi asam.

Laju pertumbuhan spesifik dalam media hidrolisat pati sagu dengan kecepatan agitasi 100 rpm lebih tinggi ($\pi = 0,360$) dari pada agitasi 150 rpm ($\pi = 1,018$). Sebaliknya untuk media sukrosa lebih rendah, pada agitasi 100 rpm ($\pi = 0,553$) dan agitasi 150 rpm ($\pi = 0,550$). Namun rendemen biomasa terhadap substrat cenderung lebih tinggi pada kecepatan agitasi 100 rpm, ini menunjukkan adanya hubungan dengan pertumbuhan sel. Kejadian tersebut didukung oleh pendapat Klimek dan Ollis (1980) bahwa nilai n tidak lain adalah hasil kali meringan kurva pembentukan produk pada saat X maksimum dan $1/X_m$. Karena pada saat X mencapai maksimum, produksi polisakarida telah mengalami penurunan, maka diperoleh nilai negatif. Peningkatan lama fermentasi setelah tercapai produksi maksimum akan menurunkan rendemen polisakarida yang diperoleh. Sejalan dengan itu Bao dan

LeDuy (1990) juga berpendapat bahwa sintesis pullulan berasosiasi tinggi dengan pertumbuhan, baik dalam fermentasi kontinyu maupun curah.

Nilai m untuk media sukrosa dan hidrolisat pati sagu dengan kecepatan agitasi 150 rpm lebih tinggi (masing-masing 2,0762 dan 0,987) dari pada bila menggunakan kecepatan agitasi 100 rpm (masing-masing 0,167 dan 0,099), ini juga menunjukkan adanya kaitan dengan pertumbuhan sel. Demikian juga hal yang sama terjadi pada laju spesifik pembentukan produk, cenderung lebih tinggi bila menerapkan kecepatan agitasi 150 rpm pada kedua media.

Rendemen nyata produk terhadap biomasa cenderung lebih tinggi bila menggunakan kecepatan agitasi 150 rpm (sukrosa $n = 0,039$ dan hidrolisat pati sagu $n = 0,032$). Nilai n pada agitasi 100 rpm masing-masing = 0,017 dan 0,001.

Nilai-nilai di atas itulah yang tidak berbedanya nyata (pada tingkat kepercayaan 95% dan 90%) dan nyata pada tingkat kepercayaan 75% dalam analisis sidik ragam yang dilakukan terhadap produksi polisakarida kasar yang dihasilkan oleh *Pullularia pullulans* T 37 A.

Laju spesifik penggunaan substrat lebih tinggi pada agitasi 150 rpm untuk sukrosa (nilai $\sigma = 0,2663$; $\alpha = 20,815$; $\beta = 0,798$) dan pada agitasi 100 rpm untuk hidrolisat pati sagu (nilai $\sigma = 0,2236$; $\alpha = 1,067$; $\beta = 0,048$). Namun gula residu pada akhir fermentasi dengan kecepatan agitasi 150 rpm lebih rendah untuk kedua media tersebut.

Rendahnya laju spesifik penggunaan substrat hidrolisat pati sagu pada kecepatan agitasi 150 rpm dimungkinkan karena terjadinya perubahan laju konsumsi

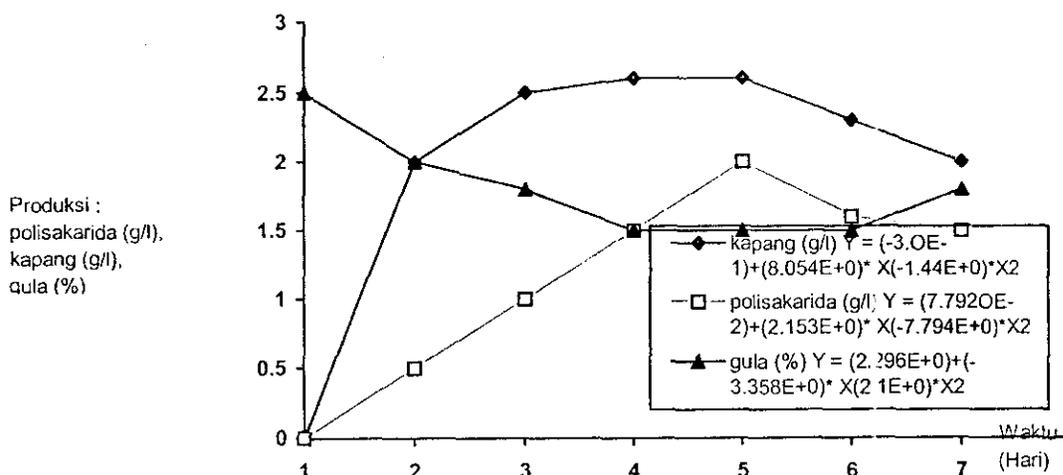
gula yang begitu besar selama proses fermentasi berlangsung. Pada awalnya laju penggunaan substrat sangat tinggi, kemudian melandai, bersamaan dengan penurunan pembentukan biomasa dan produksi polisakarida (Gambar 5).

Nilai α dan β (seperti di atas) pada proses fermentasi, menunjukkan sebagian besar substrat digunakan untuk pembentukan kapang dan produksi polisakarida yang berasosiasi dengan pertumbuhan, dan hanya sebagian kecil digunakan untuk pemeliharaan sel dan pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan.

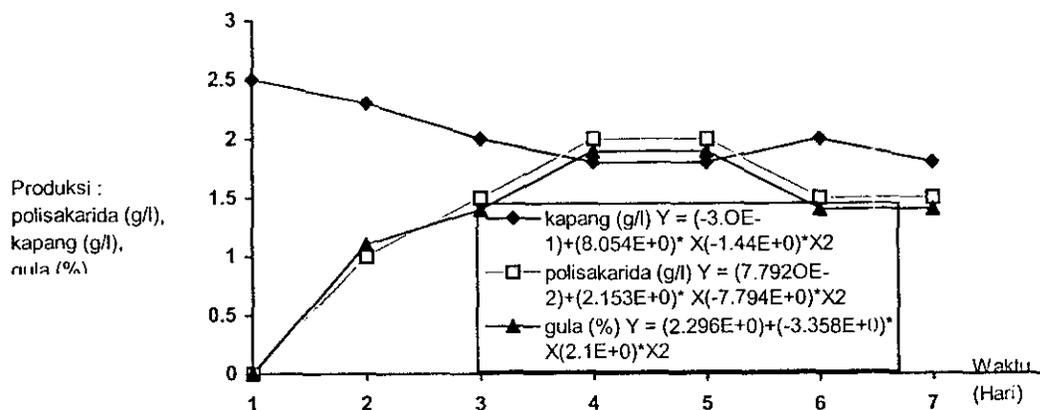
Secara umum pada kecepatan agitasi 150 rpm diperoleh nilai α yang lebih tinggi dari pada kecepatan agitasi 100 rpm. Tingginya nilai tersebut berarti rendahnya

nilai $Y_{x/s}$. Hal ini tercermin dari rendahnya nilai biomasa (dalam g/l) yang dihasilkan pada kecepatan agitasi 150 rpm.

Pada kecepatan agitasi yang lebih baik untuk pembentukan polisakarida (150 rpm) dilakukan pula kajian produksi polisakarida (pullulan) oleh *Pullularia pullulans* CBS CY PP 14 (Gambar 7.). Seperti dijumpai pada fermentasi dengan *Pullularia pullulans* T 37 A, selama proses fermentasi terjadi penurunan pH pada kultur. Fermentasi dengan media hidrolisat pati sagu menghasilkan pH akhir lebih rendah dari pada menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon.



Gambar 6. Pertumbuhan dan produksi polisakarida pada kultur curah *Pullularia pullulans* CBS CY FP 14 dengan agitasi 150 rpm dan 2.5% sukrosa sebagai sumber karbohidrat



Gambar 7. Pertumbuhan dan produksi polisakarida pada kultur curah *Pullularia pullulans* CBS CY P 14 dengan agitasi 150 rpm dan 2.5% hidrolisat pati sagu sebagai sumber karbohidrat

Pada kondisi fermentasi yang sama, dengan menggunakan hidrolisat pati sagu 2.5 persen ternyata *Pullularia pullulans* CBS CY PP 14 memiliki laju pembentukan produk dan laju spesifik konsumsi substrat yang lebih tinggi dari pada strain T 37 A. Nilai $Y_{P/X}$ tidak lain adalah nilai parameter m (pembentukan produk yang berasosiasi dengan pembentukan biomasa) ternyata juga lebih tinggi pada *Pullularia pullulans* CBS CY PP 14. Nilai parameter tersebut didukung oleh kadar gula residu pada akhir fermentasi yang lebih tinggi menggunakan strain ini. Dengan demikian strain CBS CY PP 14 lebih unggul dalam produksi polisakarida ekstraseluler (pullulan) dibandingkan strain T 37 A. Keunggulan tersebut diiringi kelemahan, yakni kapang *Pullularia pullulans* CBS CY PP 14 ini mengeluarkan pigmen melanin, sehingga untuk produksi nantinya perlu suatu metode penghilangan pigmen tersebut dari produk (pullulan) yang dihasilkan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil percobaan terbukti bahwa hidrolisat pati sagu berpotensi besar digunakan sebagai media produksi pullulan. Produksi pullulan dengan media hidrolisat pati sagu meningkat seiring peningkatan kecepatan agitasi (pada kisaran 100-150 rpm).

Produksi pullulan dengan media hidrolisat pati sagu meningkat seiring peningkatan kecepatan agitasi. Pada kecepatan agitasi 100 rpm diperoleh hasil polisakarida maksimum 1,30 g/l, dan dengan kecepatan agitasi 150 rpm diperoleh 1,55 g/l.

Pullularia pullulans CBS CY PP 14 menghasilkan rendemen polisakarida yang lebih tinggi dari pada strain T 37 A. Akan tetapi strain CBS CY PP 14 membentuk pigmen melanin selama proses fermentasi. Fermentasi dengan strain tersebut dimana hidrolisat pati sagu sebagai media, dengan kecepatan agitasi 150 rpm menghasilkan polisakarida maksimum 2.93 g/l.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada : Ditjen DIKTI melalui Proyek Penelitian Dosen Muda (P2IPT) yang membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Boa, J. M. and ANH LeDuy. 1989. Peat hydrolyzate medium optimization for pullulan production. *Appl. Env. Microbiol.* 48 : 26.
- Boa, J. M. and ANH LeDuy. 1990. Pullulan from peat hydrolyzate fermentation kinetics. *Biotech. Bioeng.* 30 (9) : 463
- Catley, B. J. 1981. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of the fungal extracellular polysaccharides. *Appl. Microbiol.* 22 (4) : 641.
- Catley, B. J. 1989. Pullulan synthesis by *Aureobasidium pullulans*. In Berkeley, R.C.W., Gooday, G.W., and D.C. Ellwood (eds.). *Microbiol Polysaccharides and Polysaccharases.* Academic press, London.
- Klimek, J. and D. F. Ollis. 1980. Extracellular microbial polysaccharides : kinetics of *Pseudomonas Sp., Azotobacter vinelandii,* and *Aureobasidium pullulans* batch fermentation. *Biotech. Bioeng.* 22 : 2321.
- Kristiansen, B., R.C Charley, B. Seviour, L. Harvey, S. Habbeb, and J.E. Smith. 1982. Over Production of Metabolites by Filamentous Fungi. In Krumphanz, V., Sykita, B., and Z. Vanek (eds.). *Over production of Microbial Products.* Academic Press, London.
- Sandford, P.A. 1985. Exocellular, Microbial polysaccharides. In Tipson, R.S. and Derek (eds.). *Adv. in carbo. chem. Biochem.* 36. Academic Press, London.
- Shipman, R.H., and L.T. Fan. 1988. Bio-plastics and SCP from starch and agricultural wastes. *Process Biochem.* 13 (3) : 19.
- Sutherland, I.W. 1989. Microbial Exopolysaccharides : Control of Synthesis and Acylation. In Berkeley, R.C.W., G.W. Gooday, and D.C. Ellwood (eds.). *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases.* Academic Press, London.
- Taguchi, R., Y. Kikuchi., Y. Sakano, and T. Kobayashi. 1983. Structural Uniformity of Pullulan Produced by several strains of *Pullularia pullulans*, *Agr. Biol. Chem.* 37 (7) : 1583.
- Ueda, S., K. Fujita, K. Komatsu, and Z. Nakashima. 1982. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia.* *Appl. Microbiol.* 11 (3) : 211.