

Możliwości wykorzystania *Aureobasidium pullulans* i pullulanu w biotechnologii żywności

Małgorzata Gniewosz

Eugeniusz Sobczak

Katedra Biotechnologii Żywności

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Warszawa

1. Wstęp

Procesy biotechnologiczne prowadzone z udziałem żywych organizmów zajmują ważne i odpowiedzialne miejsce w medycynie, produkcji żywności, ochronie środowiska i wielu innych dziedzinach. Na szczególną uwagę zasługują badania związane z przemysłowym wykorzystaniem drobnoustrojów takich jak pleśnie. Dzięki nim możliwe jest otrzymywanie wielu cennych produktów, jak np. enzymy, kwasy organiczne, antybiotyki i złożone polisacharydy.

Pullulan, syntetyzowany przez grzyby należące do gatunku *Aureobasidium pullulans*, jest złożonym wielocukrem, będącym potencjalnie ważnym składnikiem żywności oraz jej opakowań. Dzięki całkowitej nieszkodliwości dla środowiska i wielu korzystnym cechom może w przyszłości stanowić alternatywę dla wielu produktów przemysłu chemicznego.

Pullulan uzyskiwany jest wyłącznie na drodze mikrobiologicznej, zaś jego cena rynkowa jest bardzo wysoka. Zastosowanie technik inżynierii genetycznej umożliwiających zmiany w genomie drobnoustrojów pozwala na wprowadzenie lub ulepszenie korzystnej dla biotechnologii cechy. Wiele prac naukowych powstaje również z myślą o usprawnieniu możliwości produkcji pullulanu przez szczepy z gatunku *A. pullulans*. Nie poznano dotąd genotypu tego organizmu, dlatego wprowadzanie zmian na drodze jego mutagenizacji jest w tym przypadku podstawową techniką pracy.

2. Charakterystyka *Aureobasidium pullulans*

Grzyb *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud (zwany także „czarnymi drożdżami”) bywa spotykany w literaturze pod różnymi synonimami: *Pullu-*

laria pullulans, *Dematium pullulans*, *Oospora pullulans*, *Oidium pullulans* (1). Nazwa rodzajowa jest myląca, gdyż nie należy on do *Basidiomycetes* (2). Według poprzedniej systematyki zaliczano go do klasy *Fungi imperfecti*, rzędu *Moniliales*, rodziny *Dematiaceae* (1). Obecnie gatunek ten zakwalifikowano do klasy *Euascomycetes*, rzędu *Dothideales* i rodziny *Dothideaceae* (3).

2.1. Występowanie *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans jest szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie saprofitem. Najczęściej występuje na powierzchni owoców (powodując ich uszkodzenia), np. wiśni (4), jabłek (5,6) i gruszek (7). Izolowano go również z liści jabłoni (8) i oliwek (9), a także z próbek gleby (10) i igieł sosnowych. Na powierzchni gałęzi często tworzy tzw. czerni (11). Wchodzi także w skład mikroflory kurzu domowego (12,13), a Slavikova i wsp. (14) podają, że jest on spotykany w wodzie słodkiej i morskiej, osadach przybrzeżnych, torfowiskach i ściekach.

Grzyb ten charakteryzuje się niskimi właściwościami patogennymi, choć może powodować zakażenia przy dializach otrzewnowych (15) i przyczyniać się do wywoływania astmy oskrzelowej (16). Izolowano go także, np. z żuchwy po usunięciu zęba trzonowego i posocznicy (17). Ogólnie szkodliwość kliniczna tego gatunku jest niska i zależy głównie od warunków jego wniknięcia do organizmu.

2.2. Morfologia *A. pullulans*

Kolonie *A. pullulans* są gładkie, początkowo żółte, kremowe, oliwkowozielone lub lekko różowawe, albo jasnobrazowe. W miarę hodowli pokrywają się warstewką śluzu i ciemnieją (18). Przybieranie ciemniejszej barwy może postępować od środka wzdłuż nieregularnych współśrodkowych kręgów lub ich kołowych wycinków (2). W późniejszej fazie stają się czarne, zaś powierzchnia sucha i „skórzasta” (19).

A. pullulans charakteryzuje się polimorfizmem, tj. w jego cyklu rozwojowym można wyodrębnić wiele różniących się od siebie form morfologicznych, takich jak:

- blastospory (zwane często formami drożdżopodobnymi) — to hialinowe komórki o kształcie elipsoidalnym, długości 6 – 12 μm , szerokości 1,5 – 7 μm , posiadające jednowarstwową ścianę komórkową (20),
- strzępki grzybni tworzące zwartą grzybnię — szkliste, gładkie i cienkościenne. Komórki starsze stają się szersze, grubościenne, zmieniają kolor na czarnoszary. Wielkość jednej komórki wynosi około $2 \times 20 \mu\text{m}$ (21),
- formy spoczynkowe:
 - a) komórki wzdęte, często dwukomorowe, wielkości $9,0 - 15 \times 10 \mu\text{m}$, o ścianach grubych, z nieregularnymi, włóknistymi zgrubieniami na powierzchni (22),
 - b) chlamydospory, powstające z komórek wzdętych (20,23) lub z mycelium

(18,24), posiadające wokół grubej ściany komórkowej zewnętrzną, śluzowatą otoczkę o strukturze włóknistej. Struktura ta jest często 2-5 razy większa od samej komórki (20). Włókna te mają około 20 μm długości, zaś cała zewnętrzna warstwa może być łatwo oddzielona od powierzchni właściwej ściany komórkowej. Granulki melanin (do 100 nm średnicy) rozlokowane w tych strukturach nie są uporządkowane. Zasadniczo nie stwierdza się obecności melanin w cytoplazmie komórek grzybowych (22,25).

Niezależnie od przeprowadzonych badań ekologiczna rola różnych wariantów morfologii *A. pullulans* w naturze pozostaje niejasna. Ustalenie warunków hodowli, które faworyzują np. wzrost mycelium jest trudne ze względu na metodologiczne problemy z rozdziałem poszczególnych form, zwłaszcza kiedy grzybnia jest zwarta (26).

W 1975 r. Ramos i Garcha-Acha (18) opublikowali kompleksowy cykl rozwojowy *A. pullulans*. Stwierdzili, że szczególnie istotny wpływ na powstawanie poszczególnych form ma skład podłoża i warunki hodowli. Cały cykl podzielono na sześć podcykli i uzależniono tworzenie poszczególnych faz m.in. od formy występowania azotu w podłożu, wielkości początkowego inokulum i wieku kultury.

2.3. Fizjologia *A. pullulans*

Grzyb ten może rosnać w szerokim zakresie temperatur: 10 – 45°C (21), jednak optimum wzrostu występuje w 28°C, choć niektóre szczepy tracą zdolność do rozwoju już w 30°C. Szczepy patogenne najlepiej rozwijają się w temperaturach bliskich temperaturom tkanek zwierzęcych (27).

Optymalne pH dla wzrostu grzyba wynosi 5,4 – 6,3, ale możliwy jest rozwój gdy pH środowiska mieści się w przedziale od 2,0 – 2,5 (28) do 8,9 (21).

Szczepy grzyba wymagają do wzrostu i wytwarzania pullulanu warunków tlenowych (18,29-31), w hodowlach pozbawionych napowietrzania grzyb ten zdolny jest do wytwarzania etanolu (33). *A. pullulans* posiada niewygórowane wymagania pokarmowe. Do swojego wzrostu potrafi wykorzystywać wiele różnych substratów węglowych (sacharozę, glukozę, laktozę, maltozę, rafinozę, ksylozę, skrobię i inne). Niektóre szczepy mogą również czerpać energię z etanolu, aldehydu propionowego i glicerolu (21,27).

Jako źródło azotu mogą służyć azotany, azotyny, związki amonowe, mocznik, a nawet w niektórych przypadkach azot atmosferyczny (1,27).

Dzięki możliwości wykorzystania o-krezolu, fenolu, formaldehydu mogą brać udział w oczyszczaniu ścieków przemysłowych z tych substancji. Niektóre szczepy *A. pullulans* tolerują środowiska zawierające do 10% MgCl_2 i 10% NaCl , co daje możliwość występowania w wodzie morskiej (27).

Szczepy *A. pullulans* badano w wielu kierunkach ze względu na zdolności tego grzyba do syntezy cennych gospodarczo substancji. Niektóre szczepy *Aureobasidium* sp. są zdolne do syntezy erytritoli — substancji wykazującej 60 – 70% wartości słodczy sacharozy (34).

Grzyb *A. pullulans* jest powszechnie znany jako producent różnego rodzaju enzymów, np. ksylolytycznych (35,36), proteolitycznych (37), amyloli-

tycznych (38), pektynolitycznych (39) i innych, mających potencjalne znaczenie w biotechnologii żywności. Badania nad enzymami izolowanymi ze szczepów *A. pullulans*, ich właściwościami i możliwościami zastosowania w różnych gałęziach przemysłu spożywczego zostały dokładnie omówione przez Deshpande i wsp. (40).

A. pullulans ma także zdolność wytwarzania innych cennych metabolitów, tj. aureobasidany, polisacharydy (aureobasidan i pullulan) oraz melaniny.

Aureobasidiny to grupa cyklicznych peptydów, które charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwgrzybiczną, w szczególności w stosunku do *Candida albicans*. Aureobasidany zbudowane są z ośmiu L-aminokwasów, z których trzy bądź cztery są N-metylowane oraz jednego hydroksykwasu, tj. 2-hydroksy-3-metylopentanowego lub 2-hydroksy-3-metylobutanowego (41,42). Wykazano także, że antybiotyki te wykazują niską toksyczność w doświadczeniach z myszami (43).

Większość szczepów *A. pullulans* charakteryzuje się zdolnością do syntezy ciemnych barwników melaninowych. Czarny kolor melanin pochodzi od absorpcji wszystkich widzialnych fal. Nie są konieczne do wzrostu i rozwoju — raczej zwiększają zdolność organizmów do przetrwania i konkutowania w różnych środowiskach (25). Stwierdzono, że intensywny proces melanizacji komórek *A. pullulans* połączony jest z powstawaniem chlamydozpor (18,23,24,29). De Hoog i Yurlova (27) zaobserwowali stymulację melanizacji przy zastosowaniu D-galaktozy lub D-sorbozy jako źródeł węgla. Melaniny mają wiele użytecznych dla człowieka właściwości m.in. wykazują zdolność hamowania rozwoju komórek rakowych i wychwytywania wolnych rodników (44,45). Do ich właściwości należy paramagnetyczność i zdolność wymiany elektronów, a także duże możliwości sorpcyjne oraz selektywne powinowactwo do szeregu związków cyklicznych. W latach siedemdziesiątych w Polsce opracowano sposób wydzielenia melanin z biomasy *A. pullulans* (46).

Biomasa grzyba wykazuje wysoką zawartość surowego białka w granicach do 30% s.m. o wysokiej wartości odżywczej (47). Szczepy wykazujące wysoką zdolność przekształcania rozpuszczalnej skrobi w biomasę mogą stać się alternatywnym źródłem białka SCP (48).

Jednak najbardziej interesującą cechą grzyba *A. pullulans* jest jego zdolność do wytwarzania specyficznej substancji polisacharydowej, jaką jest pullulan.

3. Charakterystyka pullulanu

Pierwsze doniesienia o tym biopolimerze i organizmie go wydzielającym pochodzą z 1938 r. z pracy Bauera (49). W publikacji tej Bauer podał, że pewne „drożdże” należące do rodzaju *Pullularia* wytwarzają w określonych warunkach wiskozowy materiał o nieznanym składzie chemicznym. Bender, Lehman i Wallenfelds (50,51) nazwali ten polisacharyd „pullulanem”. Oni także w serii komunikatów określili strukturę tego związku, jak również podstawowe jego właściwości. Zagadnieniami tymi zajęli się później Bouveng i wsp. (52), a także Ueda i wsp. (53,54), którzy m.in. wykazali, że szczepy *A. pullu-*

lans charakteryzują się różną zdolnością do wytwarzania tego polisacharydu, który dodatkowo może różnić się strukturą. Z tych powodów Catley i wsp. (55) zasugerowali, że być może nie ma jednolitej struktury pullulanu, a terminem tym określa się każdy, pozakomórkowy α -glukan, wytwarzany przez *A. pullulans*. Mechanizm polimeryzacji pullulanu nie jest do końca wyjaśniony (56), choć niektórzy autorzy sugerują biochemiczną drogę biosyntezy pullulanu i jego transportu przez membranę komórkową (57).

3.1. Właściwości fizyczne i chemiczne pullulanu

W środowisku naturalnym pullulan występuje w postaci zanieczyszczonych roztworów wodnych bądź śluzów. Oczyszczony, ma postać białego proszku bez smaku i zapachu. Bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie tworząc lepki, bezbarwny roztwór (58), nie rozpuszcza się w metanolu i acetonie, ani w etanolu (59-61), co wykorzystano do wytrącania i izolacji pullulanu z podłoża pochodowlanego.

Pullulan jest pozakomórkowym α -glukanem, którego cząsteczka ma charakter neutralny (52). Polisacharyd ten zbudowany jest z prostych łańcuchów, których podstawową jednostką są pierścienie glukopiranozydowe połączone w α -trisacharydy lub α -tetrasacharydy wiązaniami (1→4)- α -D glikozydowymi (62). Wykazano również zdolność niektórych szczepów *A. pullulans* do syntezy pullulanu zawierającego układy składające się z dziesięciu i więcej jednostek α -D-glukopiranozy (63). Natomiast α -trisacharydy są spolimeryzowane liniowo poprzez wiązania (1→6)- α -D-glikozydowe. Stopień polimeryzacji wynosi od 100 do 5000 jednostek glukopiranozydowych, a masa molekularna pullulanu wahać się może w granicach od 10 000 i przekraczać 1 mln (64). Całkowita hydroliza kwasowa, np. 1 M HCl w 100°C przez 2 h prowadzi do rozpadu pullulanu do glukozy (51). Pullulan nie daje barwnej reakcji z płynem Lugola (50,60,65), spalanie tego polisacharydu uwalnia tylko CO_2 i H_2O . Ciepło jego spalania wynosi około 16,7 kJ/g (64).

Pullulan ulega hydrolizie enzymatycznej pod działaniem (1→6)- α -pullulanazy, która rozkłada wiązania (1→6)- α -D-glikozydowe oraz (1→4)- α -pullulanazy, atakującej wiązania (1→4)- α -D-glikozydowe. Enzymy te otrzymuje się na drodze mikrobiologicznej, tj. (1→6)- α -pullulanazę ze szczepu *Klebsiella pneumoniae*, a (1→4)- α -pullulanazę z *Aspergillus niger* (62).

3.2. Zastosowanie pullulanu

Obecnie oczyszczony pullulan produkowany jest w skali technicznej przez trzy firmy: Sigma, Hayashibara Biochemical Laboratories i Sumitomo Company (22). Mimo stosunkowo wysokich kosztów wytwarzania pullulanu, w porównaniu z uzyskiwaniem np. tworzyw sztucznych, polisacharyd ten posiada ogromne zalety, których nie można nie doceniać.

Duże możliwości zastosowania pullulanu (który jest bezbarwną, bezwoną i jadalną substancją) istnieją przy produkcji artykułów żywnościowych. Żywność można powlekać bezpośrednio osłonkami z pullulanu poprzez ich

zanurzenie w 5-10% wodnych roztworach lub natryskiwanie nimi produktów. Tak wytworzone warstewki stanowią dobrą barierę dla tlenu (64). Pullulan można dodawać bezpośrednio do żywności w celu obniżenia wartości kalorycznej produktów, jako zamiennik np. skrobi. Dzięki dobrej rozpuszczalności i dużej lepkości pullulan może być wykorzystywany do produkcji napojów dietetycznych (64). Po odpowiedniej modyfikacji chemicznej pullulan można użyć do produkcji wszelkiego rodzaju torebek, pudełek i kontenerów. Jego właściwości można modyfikować poprzez estryfikację, karboksylację lub utlenianie. Folie nierozpuszczalne w wodzie uzyskujemy poprzez częściową lub całkowitą estryfikację pullulanu. Poprawę elastyczności folii pullulanowych można uzyskać przez dodatek plastycyzerów takich jak sorbitol lub glicerol.

Poprzez sprężenie stężonych roztworów wodnych pullulanu można otrzymać różnego rodzaju włókna podobne właściwościami do styrenu (64). Tworzywo to jest trwałe, ma dużą wytrzymałość, a ponadto wykazuje cztery razy lepszą rozpuszczalność w wodzie niż PVA (poliwinylalkohol) i łatwo ulega biodegradacji. Bardzo ważne z punktu widzenia ochrony środowiska jest to, że spalanie pullulanu i opakowań pullulanowych nie prowadzi do wytworzenia toksycznych produktów (64), a to oznacza, że materiał ten można nazwać w pełni ekologicznym, co w końcu XX w. jest bardzo istotne. Opakowania pullulanowe nie przepuszczają tlenu, a zatem bardzo dobrze chronią produkty żywnościowe, szczególnie przed procesami oksydacyjnymi (66).

Wielu autorów (m.in. 56) szeroko opisało możliwości jego zastosowania, trudno byłoby wymienić wszystkie, należy jednak pamiętać, że w większości przypadków podane są tylko jako patenty. Między innymi opisano możliwość zastosowania roztworów pullulanu w procesie aglomeracji produktów sypkich, np. ekstraktów kawy jako substancji ułatwiającej zlepianie cząsteczek i chroniącej produkt przed utlenianiem (67). Podejmowano również próby stosowania go jako dodatku uszlachetniającego marynaty ogórkowe (69). W rolnictwie pullulan może znaleźć zastosowanie jako lepiszcze do stałych nawozów. Polisacharyd ten i jego pochodne mają odpowiednią rozpuszczalność wodną, dzięki której bezpośrednio sterowane jest uwalnianie składników nawozów do gleby, a to wzmacnia wpływ nawożenia (69).

Poza przemysłem spożywczym pullulan może być wykorzystywany w przemyśle chemicznym do wyrobu kosmetyków, laminatów i włókien podobnych do sztucznego jedwabiu (po estryfikacji) (64) lub produkcji rozpuszczalnych soczewek kontaktowych (40).

4. Wpływ czynników hodowlanych na syntezę pullulanu

4.1. Źródło węgla i azotu

Do produkcji pullulanu *A. pullulans* może wykorzystywać szeroką gamę źródeł węgla. Wydzielanie tego polisacharydu zaobserwowano na podłożach zawierających cukry proste i złożone, takie jak: glukoza, fruktoza, mannoza,

maltoza, jak również ksyloza, ryboza, arabinoza, sacharoza i laktoza (59,70,71). W wielu przypadkach najlepsze rezultaty otrzymywano przy zastosowaniu sacharozy (61,70,71). Spragg i wsp. (72) stwierdzili, że dwucukier ten nie może być wykorzystany bezpośrednio przez komórki bez uprzedniego przekształcenia go do glukozy i fruktozy, co sugeruje, że to właśnie one powinny być lepszymi substratami węglowymi. Jednakże zdolności do wykorzystania różnych źródeł węgla są prawdopodobnie cechą indywidualną, charakterystyczną dla poszczególnych szczepów (73). Dla niektórych kultur *A. pullulans* właśnie glukoza okazała się najlepszym substratem (74).

Szybki rozwój przemysłu biotechnologicznego wiąże się z potrzebą powiększenia bazy surowcowej o nowe, tańsze źródła węgla, co znalazło również odzwierciedlenie w badaniach nad substratami węglowymi dla *A. pullulans*. Badacze zwrócili uwagę na odpady przemysłowe. LeDuy i Boa (56), przy użyciu hydrolizatu torfowego, uzyskali wyniki porównywalne do otrzymanych na syntetycznym podłożu z glukozą. Inny szczep *Aureobasidium* sp. (75) produkował pullulan na skondensowanych, rozpuszczalnych destylatach, uzyskanych przy destylacji paliwa etanolowego ze zmielonej na mokro kukurydzy. Wydajność tego procesu była porównywalna do tej, którą otrzymano ze skrobi, użytej jako substratu do produkcji pullulanu. Po odpowiedniej modyfikacji istnieje także możliwość wykorzystania wywaru melasowego do produkcji pullulanu. Modyfikacja ta polegała głównie na rozcieńczeniu wywaru do 2% (w celu zmniejszenia wysokiego stężenia aminokwasów i niektórych pierwiastków) oraz wzbogaceniu go w sacharozę i siarczan amonu (76). Prawdopodobnie nowe, tańsze substraty do produkcji pullulanu mogą przyczynić się do tego by stał się on bardziej konkurencyjnym polisacharydem w stosunku do innych biopolimerów.

Podobnie, każdy szczep posiada swe własne preferencje co do źródła azotu, które powinno być zawarte w podłożu hodowlanym do produkcji pullulanu. Większość szczepów najlepiej wykorzystywało siarczan amonu (60,61,71,77). Reed-Hamer i West (78) wskazują, że niektóre szczepy bardziej preferują hydrolizat sojowy oraz inne, złożone źródło azotu (pepton, trypton). Bahr-El-din i wsp. (79) podają, że niektóre szczepy najlepiej wykorzystują octan amonu. Inni autorzy stosowali z dobrym skutkiem azotan sodu (32,73).

4.2. Kwasowość i temperatura środowiska

W związku z tym, że kwasowość w decydujący sposób wpływa na postać morfologiczną grzyba, a produkcja pullulanu zależna jest od formy morfologicznej, czynnik ten ma zasadniczy wpływ na wydajność pullulanu.

W środowisku o wysokiej kwasowości (pH 2,0) *A. pullulans* rośnie wyłącznie w postaci mycelium i równocześnie wytwarza bardzo mało pullulanu, albo nie wydziela go w ogóle (80-82). Optymalne wartości początkowego pH do produkcji pullulanu kształtują się na poziomie 5,5 (81), 6,0 (77,82,83) lub 6,5 (78).

Optymalna temperatura do produkcji pullulanu różni się nieznacznie dla różnych szczepów *A. pullulans*. W większości źródeł podaje się, że temperatury

te mieszczą się w zakresie 25 – 28°C (59). West i Reed-Hamer (84) uzyskali najlepsze wydajności pullulanu przy temperaturze 26°C, inni przy 25 – 27°C (73,85). Ueda i wsp. (53) podali, że wydajności pullulanu uzyskane w temperaturze 25°C były wyższe 5,9 razy od tych, które otrzymano w temp. 30°C. W badaniach przeprowadzonych przez McNeil i Kristiansena (85) autorzy sugerują, że wyższą wydajność pullulanu uzyskuje się przy temperaturze niższej od optymalnej temperatury wzrostu.

5. Doskonalenie szczepów *Aureobasidium pullulans* w produkcji pullulanu

W dotychczasowych badaniach nad doskonaleniem szczepów *A. pullulans* w produkcji pullulanu najczęściej stosowaną metodą była mutagenizacja. Wzrost zdolności do wytwarzania pullulanu u szczepów *A. pullulans* wywoływano przez indukowanie korzystnych zmian w genotypie tych drobnoustrojów przy zastosowaniu mutagenów fizycznych i chemicznych.

Drugim istotnym problemem, z punktu widzenia wykorzystania pullulanu w przemyśle, jest uzyskanie szczepów *A. pullulans* o zahamowanej zdolności do syntezy związków melaninowych, ze względu na wysokie koszty jego oczyszczania. Niektórym badaczom udało się wyizolować ze środowiska naturalnego szczepy *A. pullulans* nie syntetyzujące melanin (86,87), ale większość szczepów wydzielających biały pullulan (bez zanieczyszczających go melanin) otrzymano w rezultacie selekcji indukowanej przy użyciu różnego rodzaju mutagenów (87-89).

Jednym z pierwszych czynników mutagennych, stosowanym z dobrym skutkiem, było promieniowanie UV. Komórki grzyba poddawano zarówno jednokrotnemu działaniu tego czynnika (90), jak i mutagenizacji dwustopniowej (88,90). W wyniku takiego działania podniesiono kilkakrotnie wydajność produkcji pullulanu w stosunku do kultury rodzicielskiej. Tarabasz-Szymańska i Galas (88) poddali komórki mutantu *A. pullulans* otrzymanego po naświetlaniu UV powtórnemu działaniu tychże promieni. Końcowym efektem był szczep o znacznie zwiększonej produkcji pullulanu (o 326%) i zahamowanej syntezie barwników melaninowych. Cech tych nie wykazywał w takim stopniu ani szczep wyjściowy, ani mutanty z pierwszego naświetlania. Jednakże należy zwrócić uwagę na to, że szczep rodzicielski charakteryzował się bardzo niewielką zdolnością do biosyntezy pullulanu (3 g/L) (88).

Równie korzystne zmiany w genotypie *A. pullulans* wywoływały mutageny chemiczne. Imshenetskiy i wsp. (91) uzyskali szczepy *A. pullulans* o zwiększonej zdolności do biosyntezy pullulanu poprzez dodatek kolchicyny w stężeniu 0,3%. Uzyskany w tych badaniach diploidalny szczep *A. pullulans* wytwarzał ponad dwukrotnie więcej polisacharydu od szczepu rodzicielskiego. Ci sami autorzy podają, że przy zastosowaniu innego mutagenu, tj. etylenoiminy (73,92) otrzymali mutanty diplo- i poliploidalne, charakteryzujące się zwiększeniem produktywności o 80% w stosunku do szczepu wyjściowe-

go. Kelly i Catley (93) użyli do mutagenizacji szczepu *A. pullulans* bromku etydy, co pozwoliło wyselekcjonować mutanty z dziewięciokrotnie zwiększoną wydajnością produkcji pullulanu. Interesujące wyniki uzyskali także West i Reed-Hamer (89,94) z zastosowaniem MMS (metanosulfonianu metylowego), EMS (metanosulfonianu etylowego) i kwasu azotawego. Mutanty otrzymane w tych badaniach wytwarzały o 20 i 36% więcej pullulanu od szczepu wyjściowego, a także udało się wyselekcjonować mutantą o zredukowanej pigmentacji melaninowej.

Inną techniką jest łączenie działania różnych czynników mutagennych. Imshenetsky i wsp. (90) pod wpływem działania już wymienionej kolchicyny otrzymali mutantą, którego poddano naświetlaniu UV i uzyskano w ten sposób szczep *A. pullulans* o wydajności biosyntezy polisacharydu o 24% wyższej od uzyskanej dla szczepu rodzicielskiego. W innych badaniach nad mutagenizacją szczepów *A. pullulans* zastosowano mutagenne działanie bromku etydy, po czym mutanty naświetlano małymi dawkami promieniowania UV. Tym sposobem otrzymano mutanty o obniżonej pigmentacji, a dodatkowo wytwarzające pullulan o zwiększonej masie cząsteczkowej w stosunku do pullulanu wydzielanego przez szczep rodzicielski.

Elinov (95) podaje, że dobre rezultaty w indukcji zmian genetycznych szczepu *A. pullulans* 8 otrzymał także przy wykorzystaniu: promieniowania UV, 1,4-bis diazoacetylobutanu, bromku etydy, N-nitrozo-N-metylobiuretu (NMB) oraz N-nitrozo-N-metylomocznika. W innych badaniach tego autora zastosowano mutagenizację protoplastów *A. pullulans* przy użyciu NMB. Procedura ta jednak zwiększała częstotliwość występowania kultur niskoprodukcyjnych. Dopiero zastosowanie promieniowania UV zmniejszyła liczbę otrzymywanych mutacji morfologicznych przy znaczącym wzroście częstotliwości występowania mutantów o podwyższonej zdolności do syntezy polisacharydu.

Studia nad genotypem *A. pullulans* mimo wielu prowadzonych badań są ciągle w fazie początkowej. Li i Ljungdahl (96) zsekwencjonowali fragment DNA kodujący syntezę enzymu ksylanazy. Odcinek ten (*xynA*) składał się z 895 par zasad i kodował polipeptyd liczący 221 aminokwasów, który wykazywał duże podobieństwo do ksylanaz znajdujących u innych grzybów i niektórych bakterii. Pierwszą genetyczną transformację *A. pullulans* dokonali Cullen i wsp. (97). Przy użyciu plazmidu pDH33 transformowali do szczepu Y 117 *A. pullulans* bakteryjny gen fosfotransferazy higromycyny B (*hph*). Tak zmieniony genetycznie szczep wykazywał oporność na obecność higromycyny w podłożu.

5. Podsumowanie

Grzyb *Aureobasidium pullulans* jest producentem wielu cennych substancji (np. enzymów, związków melaninowych, antybiotyków), mogących znaleźć zastosowanie m.in. w biotechnologii żywności. Na szczególną uwagę zasługuje inny metabolit tego grzyba — pullulan; polisacharyd, który potencjalnie może być zastosowany w przemyśle spożywczym, jako dodatek do żyw-

ności dietetycznej i surowiec do wyrobu opakowań do produktów żywnościowych. Ze względu na bardzo korzystne cechy pullulanu i opakowań z niego sporządzonych (biodegradowalność), ale równocześnie wysoką cenę rynkową, przeprowadza się wiele badań nad udoskonaleniem szczepów *A. pullulans* w produkcji pullulanu. Zastosowanie mutagenizacji przy użyciu promieniowania UV, różnych mutagenów chemicznych oraz metody skojarzonej (np. fizykochemicznej) pozwoliło otrzymać mutanty o znacznie podwyższonej zdolności do syntezy pullulanu. W niektórych badaniach uzyskano także mutanty wytwarzające pullulan pozbawiony zanieczyszczających go związków melaninowych, co znacznie obniża koszty jego oczyszczania.

Literatura

1. Fassatiava O., (1983), *Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej*, WNT, Warszawa, 195-197.
2. Pollock T. J., Thorne L., Armentrout R. W., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (3), 877-883.
3. de Hoog G. S., (1998), *The key to the anamorph genera of yeastlike Archi- and Euscomycetes*, in: *The Yeast. A Taxonomic study*, Eds. Kurtzman C. P., Fell J. W., Elsevier, 4, 123-125.
4. Dugan F. M., Roberts R. G., (1994), *Phytopatol.*, 84 (10), 1031-1036.
5. Rist D. L., Rosenberger D. A., (1995), *Plant Disease*, 79 (4), 425.
6. Mercier J., Wilson C. L., (1994), *Biological Control*, 4,(2), 138-144.
7. Chand-Goyal T., Spotts R. A., (1997), *Research*, 151, (4), 427-432.
8. Falconi C. J., Mendgen K., (1994), *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 101, (1), 38-47.
9. Nicoletti R., Luong J. H. T., LeDuy A., (1988), *Biotechnology Bioengineering*, 32, 639-646.
10. Hashem A. R., (1995), *J. University of Kuwait, Science*, 22 (2), 231-238, abstrakt.
11. Chojnacki B., (1992), *Arboretum-Kórnickie*, 37, 125-133.
12. Beguin H., (1995), *Aerobiologia*, 11, (1), 3-10.
13. Hoekstra E. S., Samson R. A., Verhoeff A. P., Flannigan M. E., (1994), *Health Implicat. Fungi in Indoor Environment*, 12, 169-177.
14. Slavikova E., Bouchet B., Caye-Vaugien C., Gallant D. J., (1995), *J. General. Microbiol.*, 139, 979-985.
15. Clark E. C., Silver S. M., Hollick G. E., Rinaldi M. G., (1995), *American J. Nephrol.*, 15 (4), 353-355.
16. Sue M. A., Gordon E. H., Freund L. H., (1992), *Ann. Allergy*, 68, (95), 395-397.
17. Girard L. S., Malowitz R., Tortora G. T., Spitzer E. D., (1993), *Clinical Infectious Diseases*, 16 (2), 338-339.
18. Ramos S., Garcia-Acha I., (1975), *Mycolog. Soc.*, 64 (1), 129-135.
19. Takesako K., Ikai K., Haruda F., Endo M., Shimanaka K., Sono E., Nakamura T., Kato I., Yamaguchi H., (1991), *J. Antibiotics*, 44, (9), 919-924.
20. Takeo K., Nishimura K., Miyaji M., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 111, 153-158.
21. Takahashi S., Itoh M., Tsubaki K., Kaneko Y., (1981), *Agric. Biol. Chem.*, 45 (8), 1908-1815.
22. Simon L., Bouchet B., Caye-Vaugien C., Gallant D. J., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 40, 35-45.
23. Dominguez J. B., Goni F. M., Uruburu F., (1978), *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 662-666.
24. Seviour R. J., Kristiansen B., Harvey L., (1984), *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 82 (2), 350-356.
25. Bell A. A., Wheeler M. H., (1986), *Ann. Rev. Phytopatol.*, 24, 411-451.

26. Andrews J. H., Harris R. F., Spear R. F., Lau G. W., Nordheim E. V., (1993), *Can. J. Microbiol.*, 40, 6-17.
27. de Hoog G. S., Yurlova N. A., (1994), *Antonie van Leeuwenhoek*, 65, 41-54.
28. Auer D. P. F., Seviour R. J., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 637-644.
29. Rho D., Mulchandani A., Loung J. H. T., LeDuy A., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 361-366.
30. Mulchandani A., Luong J. H. T., LeDuy A., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 639-646.
31. Moscovici M., Ionescu C., Oniscu C., Fotea O., Hanganu L. D., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15 (11), 1167-1172.
32. Moscovici M., Ionescu C., Oniscu C., Fotea O., Protopopescu P., Hanganu L. D., (1996), *Biotechnol. Lett.*, 18 (7), 787-790.
33. Madi N. S., McNeil B., Harvey L. M., (1996), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 65, (4), 343-350.
34. Ishizuka H., Wako K., Kasumi T., Sasaki T., (1989), *J. Ferment. Bioengineering*, 68, (5), 310-314.
35. Christov L. P., Prior B. A., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17 (8), 821-826.
36. Xin-Liang Li, Ljungdahl L. G., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 9, 3160-3166.
37. Donaghy J. A., McKay A. M., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 662-666.
38. Saha B. C., Freer S. N., Bothast R. J., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (10), 3774-3780.
39. Biely P. O., Cheinrichova K., Kruzikova M., (1996), *Curr. Microbiol.*, 33 (1), 6-10.
40. Deshpande M. S., Rale V. B., Lynch J. M., (1992), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 14 (7), 514-526.
41. Takesako K., Ikai K., Haruna F., Endo M., Shimanaka K., Sono E., Nakamura T., Kato I., Yamaguchi H., (1991), *J. Antibiotics*, 44 (9), 919-924.
42. Ikai K., Shiomi K., Takesako K., Mizutani S., Yamamoto J., Ogawa Y., Ueno M., Kato I., (1991), *J. Antibiotics*, 44 (9), 1187-1198.
43. Morishita Y., Takahashi M., Sano T., Kawamoto I., Ando K., Sano H., Saitoh Y., Kase H., Matsuda Y., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, (12), 3017-3025.
44. Liach S. P., Ruban E. L., (1968), *Uspiechi Microbiol.*, 5, 90-95.
45. Małama A. A., Bułanow P. A., (1965), *Dokłady Akad. Nauk BSSR IX*, 9, 627-338.
46. Piżło A., (1990), *Otrzymywanie biomasy melanin ze szczepu drożdży (*Aureobasidium pullulans*)*, Zeszyty Naukowe AR, Kraków.
47. Fortina M. G., Parini C., Nsengumulemy J. D., (1993), *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 43, 91-101.
48. Biely P., Kratky Z., Kockova-Kratochvilova A., Bauer S., Czech Patent C. S., 189468, 1979.
49. Bauer R., (1938), *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abst.*, II, 98, 392-398.
50. Bender H., Lehman J., Wallenfels K., (1959), *Biophys. Acta*, 36, 309.
51. Bender H., Wallenfels K., (1962), *Enzym. Biochem.*, 2, 334-339.
52. Bouveng H. O., Kisseling H., Lindberg B., McKay L., (1962), *Acta Chem. Scand.*, 16, (3), 615-622.
53. Ueda S., Fujita K., Komatsu K., Nakashima Z., (1963), *Appl. Microbiol.*, 11, 211-215.
54. Ueda S., Kono H., (1965), *Appl. Microbiol.*, 13, (6), 882-885.
55. Catley B. J., Whelan W. J., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 138-142.
56. LeDuy A., Choplin L., Zajic J. E., Luong J. H. T., (1988), in: *Encyklopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd ed., New York, 13, 650-660.
57. Galas E., Tarabasz-Szymańska Ł., Pankiewicz T., (1998), *Biotechnologia*, 2 (41), 57-66.
58. Milind S. D., Rale V. B., Lynch J. M., (1992), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 14, (7), 514-527.
59. Dufresne R., Thibault J., LeDuy A., Lencki R., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 526-532.
60. Schuster R., Wenzig E., Mersmann A., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 155-158.
61. Shabtai Y., Mukmenev I., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 595-603.
62. Taguchi R., Kikuchi Y., Sakano Y., Kobayashi, (1973), *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1583-1588.
63. McIntyre D. D., Vogel H. J., (1993), *Die Starke*, 45 (11), 406-410.

64. Yuen S., (1974), *Process Biochem.*, Nov., 7-9, 22.
65. Berniez B., (1958), *Can. J. Microbiol.*, 4, 195.
66. Gontard N., Thibault R., Cuq B., Guilbert. S., (1996), *J. Agricult. Food Chem.*, 44, (4), 1064-1069.
67. Nakashio S., Tsuji K., Toyota N., Fujita F., Nomura T. (to Sumimoto Chemical Co., Ltd. And Hayashibara Laboratories, Inc.) *Can. Pat.* 1,061,068 (Aug. 28,1979).
68. Kuwachara Y., Otsuka N., Manabe M., (1990), *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, 35, (11), 776-780.
69. Matsunaga H., Fujimura S., Namioka H., Tsuji K., Watanabe M., (to Sumimoto Chemical Co., Ltd. And Hayashibara Laboratories, Inc.) *Can. Pat.* 1,039,527 (Oct.3, 1978).
70. Gniewosz M., Sobczak E., (1992), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1/42, (4), 37-43.
71. Yurlova N. A., (1994), *Mikologija Fitopat.*, 28, (3), 51-57.
72. Spragg A. J. P., McNeil B., Harvey L. M., (1995), *Bioprocess Engineering*, 12, 29-34.
73. Imshenetskiy A. A., Kondratyeva T. F., Smutko A. N., (1981), *Mikrobiologija*, 50, (1), 102-105.
74. Kondratyeva T. F., Lobacheva N. A., (1990), *Mikrobiologija*, 59 (6) 1004-1009.
75. Leathers T. D., Gupta S. C., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, (11), 1163-1166.
76. Gniewosz M., Sobczak E., (1996), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 5/46 (1), 17-25.
77. Gniewosz M., Sobczak E., Zieliński W., (1997), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 6/47 (1), 61-68.
78. Reed-Hamer B., West T., (1994), *Microbios*, 80, 83-90.
79. Bard-Eldin S. M., El-Tayeb O. M., El-Masry H. G., Mohamad F. H. A., Abd El-Rahman O. A., (1994), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 423-426.
80. West T. P., Reed-Hamer B., (1993), *Microbios*, 75, 75-82.
81. Lacroix C., LeDuy A., Noel G., Choplin L., (1985), *Biotech. Bioeng.*, 27, 202-207.
82. Ono K., Yasuda N., Ueda S., (1977), *Agric. Biol. Chem.*, 41, (11), 2113-2118.
83. Heald P. J., Kristiansen B., (1985), *Biotech. Bioen.*, 27, 1516-1519.
84. West T. P., Reed-Hamer B., (1993), *Microbios*, 75, 261-268.
85. McNeil B., Kristiansen B., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 521-526.
86. Silman R. W., Bryan W. L., Leathers T. D., (1990), *FEMS Microbiology Letters*, 71, 65-70.
87. Pollock T. J., Thorne L., Armentrout R. W., (1992), *Appl. Environ Microbiol.*, 58, (3), 877-883.
88. Tarabasz-Szymańska L., Galas E., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 317-320.
89. West T. P., Reed-Hamer B., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 113, 345-350.
90. Imshenetskiy A. A., Kondratyeva T. F., Smutko A. N., (1982), *Mikrobiologija*, 51, (6), 964-967.
91. Imshenetskiy A. A., Kondratyeva T. F., (1979), *Mikrobiologija*, 48, (2), 319-323.
92. Imshenetskiy A. A., Kondratyeva T. F., (1980), *Mikrobiologija*, 49, (2), 308-312.
93. Kelly P. J., Catley B. J., (1977), *J. Gen. Microbiol.*, 102, (2), 249-254.
94. West T. P., Reed-Hamer B., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 124,167-172.
95. Elinov N. P., Kossior L. A., Pronina M. I., Tiunowva N. A., Kobzieva H. J., (1988), *Mikologija*, 22 (1), 3-9.
96. Li X. L., Ljungdahl L. G., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, (9), 3160-3166.
97. Cullen D., Yang G.M., Jeffries T., Bolduc J., Andrews J. H., (1991), *J. Biotechnology*, 21, 283-288.

Utility of *Aureobasidium pullulans* and pullulan in food biotechnology

Summary

Fungus *Aureobasidium pullulans* is the producer of numerous valuable substances (enzymes, melanins, antibiotics). Pullulan — the product of metabolism of *A. pullulans* strains has a great potential utility in food industry. Since chemical synthesis of pullulan is expensive, a great effort

has been made to improve the productivity of *A. pullulans* strains. The application of mutagenesis (UV light, several chemical mutagens) allowed to receive mutants with high productivity of that compound. The most promising mutants are those which produce pullulan without melanin.

Key words:

Aureobasidium pullulans, pullulan, mutagenesis.

Adres do korespondencji:

Małgorzata Gniewosz, Katedra Biotechnologii Żywności, SGGW, ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa.