

CO-CULTURE YÖNTEMİ İLE PULLULAN ELDESİ

Dilara İTİK^{1*}, Uğur SIDAL¹

¹ Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, 45140 Manisa, TÜRKİYE,

Özet: Pullulan, kimyasal yapı olarak başlıca α -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinden oluşan bir glukandır. Endüstriyel açıdan öneme sahip olan bu homopolisakkarit, polimorfik bir küf olan *Aureobasidium pullulans* tarafından hücre dışı olarak üretilmektedir. Pullulan biyopolimeri, biyolojik olarak parçalanabilen, yağa dirençli, sıcaklıktan etkilenmeyen, oksijen geçirmeyen, toksik olmayan yapı özellikleri göstermektedir ve suda çözünebilmektedir. Pullulan, bu özelliklerinin sonucunda yenilebilen filmlerin üretiminde kullanılmak için oldukça uygun bir polisakkarittir. Pullulan yenilebilen filmlerin üretiminin yanı sıra gıda, ilaç ve kozmetik gibi birçok alanda da kullanılabilir. Bu çalışmada *Aureobasidium pullulans* ve *Kluyveromyces marxianus* suşlarından pullulan üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla suşların besiyerinde üremeleri ve pullulan üretme yetenekleri ve aktivite gösterdiği optimum sıcaklık, pH, inokulum zamanları saptanmıştır. Pullulan üretimi için fermentasyon şartları optimize edilmiştir. Optimum fermentasyon şartları üretim süresi 3 gün, substrat konsantrasyonu 5 %, pH 7.5 ve üretim sıcaklığı 28°C olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal polisakkarit, pullulan, *Aureobasidium pullulans*, *Kluyveromyces marxianus*, yenilebilir film.

PULLULAN PRODUCTION BY CO-CULTURE METHOD

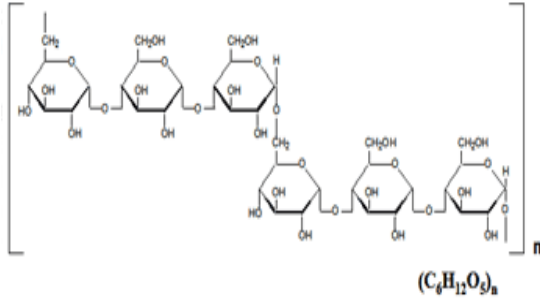
Abstract: Pullulan is a -glucan consisting mainly of maltotriose units interconnected via – 1,6 linkages. Pullulan is an extracellular polysaccharide produced by the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. It can be extruded easily as films that are biodegradable, is resistant to oils and grease, unaffected by temperature, impermeable to oxygen, nontoxic and therefore edible. Pullulan is a suitable polysaccharide due to its good-film-forming properties for production of edible protective films. Besides its applications in the edible film industry, pullulan has numerous applications in food, cosmetics and pharmacological industries. In this study, pullulan from *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces marxianus* strains was produced and characterized. The effect of initial pH, fermentation time, incubation temperature and initial substrate concentration was investigated. The highest pullulan concentration of 17.32 g/L was obtained for a fermentation of period of 72 h with the initial substrate concentration equivalent to 50 g/L and incubation temperature at 28°C, pH 7.5

Keywords: Microbial polysaccharides, pullulan, *Aureobasidium pullulans*, *Kluyveromyces marxianus*, edible films.

*Dilara İTİK
dilara2907@hotmail.com

1. GİRİŞ

Pullulan, kimyasal yapı olarak başlıca α -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinin yanı sıra az sayıda da maltotetroz ünitelerinin bulunduğu bir glukandır (Şekil 1) [1,2].



Şekil 1. Pullulanın kimyasal yapısı [17]

Pullulan, dimorfik bir küf olan *Aureobasidium pullulans* tarafından hücre dışı olarak üretilmektedir [3,4]. Pullulanın üretimine etki eden parametreler üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Pullulan sentezinde başlıca parametrelerden biri olan karbon kaynağı olarak, birçok şeker *A.pullulans* tarafından hücre gelişimi ve polisakkarit üretimi için kullanılabilir. Bunlardan D-ksilaz, D,L-arabinoz, L-ramnoz, L-sorboz, D-galaktoz, sakkaroz, maltoz, sellobioz, trehaloz, laktöz, inülin ve çözünebilir nişasta hücre gelişimi için kullanılabilir [5,4,6]. *Kluyveromyces marxianus* tarafından salınan inülinaz enzimi ile parçalanmış inülin soğan, sarımsak, pırasa, hindiba ve enginar gibi birçok sebze bulunan bir fruktoz oligomeridir. Lifler sınıfına aittir ve fruktan olarak bilinir. İnülin, fruktoz birimlerini kapsayan polimerlerdir ve tipik olarak bir terminal glukoza sahiptir. İnülindeki fruktoz birimleri beta - (2-1)-glikozidik bağlarıyla bağlanırlar. Oligo ve polisakkaritlerin karışımından oluşan inülin pek çok gıda da lifle zenginleştirme, prebiyotik özellik kazandırma, su bazlı gıdalarda yağ ikamesi olarak kullanılmaktadır.

Pullulan biyopolimeri endüstriyel ilginin odağında olmuştur. Biyolojik olarak parçalanabilir, yağa dirençli, sıcaklıktan etkilenmeyen, oksijen geçirmeyen, toksik olmayan yapı özellikleri göstermesi nedeniyle de yenilebilir filmlere kolayca dönüştürülebilir özelliği göstermektedir. Pullulanın gıda sanayindeki kullanım alanları arasında; gıda kaplama ve paketleme maddesi olarak kullanılması ve düşük kalorili gıda formülasyonlarında nişasta yerine kullanılabilirliği sayılabilir. Ayrıca, aroma ve baharatlar için mikroenkapsüle ajan olarak da kullanılabilir [4,7,8]. İlaç endüstrisinde tabletler için kıvam artırıcı ajan ve oksidasyonu önleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Pullulanın toksik olmaması, immunojenik özelliğinin olmaması ve biyolojik olarak parçalanabilmesi gibi özellikleri nedeniyle tıbbi görüntüleme ve kontrollü ilaç salınımı gibi biyomedikal alanında da kullanım olanakları vardır. Pullulanın bu kadar çeşitli uygulama alanlarına sahip olmasının önemli bir nedeni, kimyasal olarak kolaylıkla modifiye edilebilmesi ve fonksiyonel grupların ilave edilebilmesidir [4].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Mikroorganizmalar ve Kültürasyon:

Aureobasidium pullulans P56 suşu melanin üretmeyen mutant bir suştur (Şekil 2 a,b). Mikroorganizma PDA (Potato Dextrose Agar) üzerinde $+4^{\circ}C$ 'de saklanmış ve her 3 haftada bir taze ortama ekim yapılarak kültür yenilenmiştir. Taze ortama ekilen mikroorganizma $28^{\circ}C$ de 2 gün boyunca geliştirilmiştir. Öncelikle PDA üzerindeki mikroorganizma öze ile iki öze dolusu alınarak hazırlanan kültür ortamına aşılınmış ve 200 rpm çalkalama hızında $28^{\circ}C$ sıcaklıkta 48 saat boyunca mikroorganizmanın geliştirilmesi sağlanmıştır. Kültür ortamı kompozisyonu

(g/ l): sakkaroz 30, (NH₄)₂.SO₄ 0.6, maya ekstratı 0.4, K₂HPO₄ 5, MgSO₄.7H₂O 0.2, ve NaCl 1 (pH:5.5)'dir[9].



Şekil 2 a) *Aureobasidium pullulans* melanin üreten suş **b)** Mutant (melanin üretmeyen) *Aureobasidium pullulans* P56 suşu

Kluyveromyces marxianus NRRL-Y-1165 suşu YM (Yeast-Malt Agar) üzerinde + 4⁰C'de saklanmış ve her 3 haftada bir taze ortama ekim yapılarak kültür yenilenmiştir. Taze ortama ekilen mikroorganizma 30⁰C de 24 saat boyunca geliştirilmiştir. Öncelikle YM agar üzerindeki mikroorganizma öze ile alınarak hazırlanan kültür ortamına aşılınmış ve 200 rpm çalkalama hızında 30⁰C sıcaklıkta 24 saat boyunca mikroorganizmanın geliştirilmesi sağlanmıştır. Kültür ortamı kompozisyonu (g/ l): sakkaroz 20, NH₄Cl 1.5, maya ekstratı 5, K₂HPO₄ 5, MgSO₄.7H₂O 0.65, ve KCl 1.15 (pH: 6.5) 'dir.

Karışık üretim ortamı kompozisyonu (g/ l): inülin 50, (NH₄)₂.SO₄ 0.6, maya ekstratı 0.4, K₂HPO₄ 5, MgSO₄.7H₂O 0.2, ve NaCl 1 (pH: 5.5) 'dir. Hazırlanan sentetik üretim ortamına, sıvı kültür ortamlarında geliştirilen *Aureobasidium pullulans* P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 mikroorganizmalarından 1'er ml aşılama yapılmış ve 200 rpm çalkalama hızında 28⁰C'de 24 saat boyunca mikroorganizmaların birlikte geliştirilmesi sağlanmıştır [5].

2.2. Analitik Metotlar

2.2.1 Kuru Hücre Ağırlığı ve Mikrobiyal Polisakkarit Üretimi: Fermentasyon sıvısından alınan 1,5 ml örnek 8000g'de 10dk

santrifüj edilmiş ve saf su ile iki defa yıkanmıştır. Yıkanan hücreler (pH: 5.5) 80⁰C'de sabit tartıma gelene kadar kurutularak kuru hücre ağırlığı belirlenmiştir. Polisakkarit miktarını tayin etmek için; biyomasi ayrılan fermentasyon sıvısına öncelikle polisakkarit çökeltmesi için iki hacim etanol ilave edilmiştir. + 4⁰C'de 1 saat bekletilerek polisakkaritlerin çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra örnek 8000 g'de 10dk santrifüj edilmiştir. Ayrılan polisakkarit kısmı 80⁰C'de sabit tartıma gelene kadar kurutularak mikrobiyal polisakkarit miktarı belirlenmiştir [10,11].

2.2.2. Pullulan Üretimi: Üretilen polisakkarit içindeki pullulan miktarının belirlenmesi için ise, elde edilen polisakkarit 0.05M sodyum asetat (pH: 5.0) ile 10 mg/ml oranında çözülmüştür. 1ml örneğe, 10 µl pullulanaz ilave edilerek 25⁰C'de 21 saat inkübe edilmiştir [12]. İndirgen şeker analizi ile glukoz indirgen eşdeğerleri saptanmış ve bu bilgi kullanılarak örnekteki gerçek pullulan içeriği belirlenmiştir [10,11].

2.2.3 İndirgen Şeker: İndirgen şeker miktarının saptanması için, uygun oranda seyreltmeler yapıldıktan sonra dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi [13] kullanılmıştır. Buna göre glukoz içeren standart çözeltiler kullanılmıştır ve okumalar spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda yapılmıştır [10, 11].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının co-culture ile inülin içeren ortam kullanılarak pullulan biyopolimerinin üretimi hakkında araştırma yapılmıştır.

Maksimum polisakkarit üretimi 28°C (Grafik 3) sıcaklıkta pH 7.5’de (Grafik 2) elde edilmiştir. En iyi üretim fermentasyonun üçüncü gününde elde edilmiştir. *K.marxianus* ve *A.pullulans* ‘ın eş zamanlı inokulasyonlarından elde edilen pullulan miktarına göre *K.marxianus*’un gecikmeli inokulasyonunun pullulan miktarını arttırdığı görülmüştür. Maksimum polisakkarit ve pullulan üretimi, *A.pullulans*’ın 10 saatlik öncü kültürasyonundan sonra *K.marxianus*’un inoküle edildiği zaman gerçekleşmiştir. *K.marxianus* ve *A.pullulans* ‘ın eş zamanlı inokulasyonunda *Kluyveromyces marxianus* dominant karakter gösterip *Aureobasidium pullulans*’ın hücre gelişimini engellediği görülmüştür. *Kluyveromyces marxianus*’ın gecikmeli inokulasyonu yapıldığı zaman *Aureobasidium pullulans* popülasyonunda ve polisakkarit üretiminde artış olduğu görülmüştür.

Tablo 1. Gecikmeli inokulasyon saatlerinin pullulan üretimine etkisi

İnokulum saatleri (30°C, 1gün, pH 7.5)	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (mg/ml)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
Eş zamanlı	2.78	0.74	1.31
8	3.40	0.93	0.83
9	4.22	1.07	0.97
10	5.65	1.26	1.36
11	5.33	1.19	1.24
12	5.18	1.10	1.11

3.1. İnkübasyon Sürelerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi

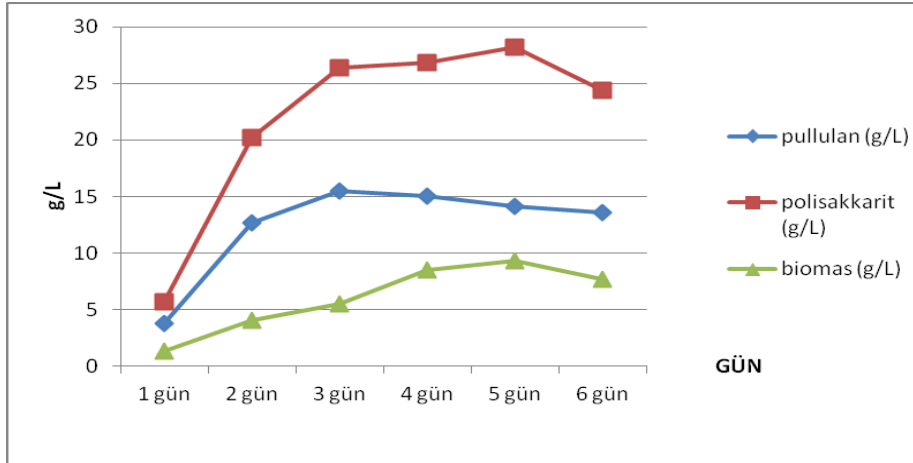
Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karışık kültürleri ile inülin içeren ortamdaki pullulan üretiminde optimum inkübasyon süresinin bulunması için çalkalamalı inkübatörde pH 7.5 ve 30°C sıcaklıkta 6 gün boyunca denemeler yapılmıştır.

Deney sonuçlarımız Grafik 1’de verilmiştir. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (28.23 g/l) değeri ile maksimum biyomas oluşumu (9.29 g/l) 5.günde ve maksimum pullulan (15.51 g/l) üretimi 3.günde elde edilmiştir.

Vijayendra ve arkadaşları (2001) optimal pullulan üretiminin 72. saatte olduğunu belirtmişlerdir. Roukas ve Liakopoulou-Kyriakides (1999) optimum polisakkarit üretiminin 120. saatte olduğunu belirtmişlerdir [14, 15].

Göksungur ve arkadaşları (2003) tarafından *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile çalkalamalı inkübatör kullanarak sentetik ortamda üretilen maksimum polisakkarit üretimi 6.günde 21.6 g/l, maksimum pullulan üretimi 5.günde 16 g/l ve maksimum biyomas oluşumu ise 6.günde 9 g/l olarak elde edilmiştir [14, 15].

Farklı fermentasyon periyod zamanlarının çıkmasının sebebi; farklı tür tipleri, farklı fermentasyon ortam içeriği, farklı kültür koşullarının kullanılmasından dolayıdır. Biyomas deney periyodunun sonlarına doğru artış göstermiştir.



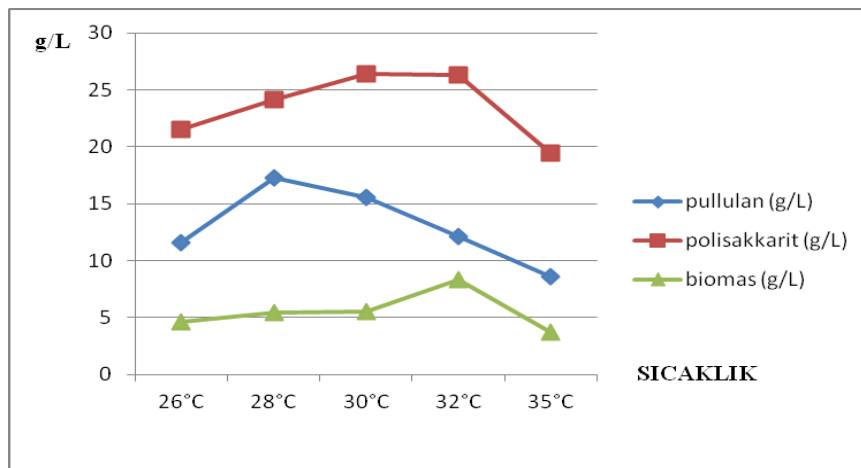
Grafik 1. İnkübasyon sürelerinin polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi

3.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karışık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde optimum sıcaklık değerinin bulunması için çalkalamalı inkübatörde 3gün, % 5 inülin içeren sentetik ortam ile pH 7,5 da sıcaklık 26°C, 28°C, 30°C, 32°C ve 35°C başlangıç değerlerinde denemeler yapılmıştır.

Farklı başlangıç sıcaklık değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değer 28°C olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık değerleri arttıkça biyomas miktarlarında artış görülmüştür. Deneysel verilerimiz Grafik 2’de verilmiştir. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (26.39 g/l) değeri 30°C sıcaklıkta ve maksimum pullulan (17.31 g/l) üretimi 28°C sıcaklıkta elde edilmiştir.

Ueda ve diğerleri (1963) pullulan üretiminin 25°C’de 30°C’dekinden daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir [16].



Grafik 2. Farklı sıcaklık değerlerinin polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi

McNeil ve Kristiansen (1990) kesikli ve sürekli yöntemlerle yaptıkları çalışmada optimum pullulan üretimini 24°C’de

gerçekleştirmişlerdir [14, 15]. West ve Reed-Hammer (1993) karbon kaynağı olarak mısır şurubu ya da sakkarozu kullandıklarında her

iki substratla da pullulan üretimi için optimum sıcaklık değerinin 26°C olduğunu ve pullulan üretiminin en düşük olduğu sıcaklık değerlerinde biyomas miktarlarının en yüksek olduğunu belirtmişlerdir [7]. McNeil ve Kristiansen (1990) *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretimi için en önemli faktörlerden birinin sıcaklık olduğunu bildirmiştir. En yüksek pullulan üretiminin 26°C'de gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir [14, 15]. Pullulanın yüksek sıcaklıklara karşı hassasiyet gösterdiğini bildirmişlerdir [16].

3.3. Farklı pH Değerlerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi

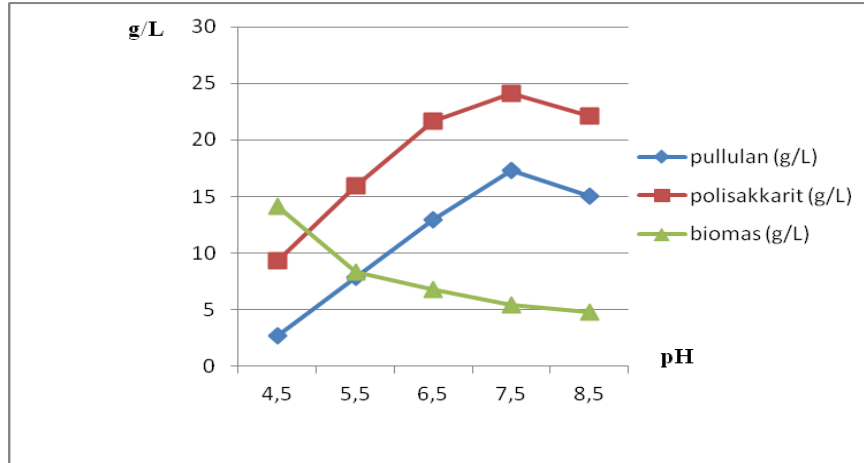
Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karışık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde optimum pH'nın bulunması için çalkalamalı inkübatörde 3 gün, % 5 inülin içeren sentetik ortam ile 28°C sıcaklıkta pH 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 ve 8,5 başlangıç değerlerinde denemeler yapılmıştır. Çünkü pH; fermentasyon ortamını, mikroorganizmaların morfolojisini, hücre gelişimini ve pullulan üretimini etkiler. Farklı başlangıç pH değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değer pH 7.5 olduğu belirlenmiştir. Asidik pH (2.5-5.5) değerlerinde polisakkarit ve pullulan miktarı düşerken, biyomas miktarı artar; artan pH'larda (6.5-8.5) ise polisakkarit ve pullulan üretimi yüksek ve biyomas miktarı ise düşüktür. Deneysel verilerimiz Grafik 3'de verilmiştir. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (24.12 g/l) ve pullulan (17.31 g/l) üretimleri pH 7.5 değerinde elde edilmiştir. pH 4.5, 5.5, 6.5 ve 8.5 değerleri

sırasıyla 9.3, 15.9, 21.7 ve 22.09 g/l polisakkarit ve sırasıyla 2.7, 7.83, 12.98 ve 15.02 g/l pullulan elde edilmiştir.

Cately (1979) pH 1.5'dan 6.5'a kadar ölçümler yapmıştır. pH 1.5 ile 3.5 arası en düşük pullulan sentezi olurken en yüksek biyomasın pH 2.5'da elde edildiğini bulmuşlardır [18, 15]. Maksimum pullulan değerini ise pH 5.5'da elde etmişlerdir [1].

Lee & Yoo (1993) en yüksek pullulan üretimini pH 6.0' da elde etmiştir. Lacroix ve diğerleri (1985) sentetik ortamda *Aureobasidium pullulans* 140B ve *Aureobasidium pullulans* 2552 suşu ile optimum başlangıç pH değerinin 5.5 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *Aureobasidium pullulans*'ın asidik pH değeri olan pH 2.0'de çok iyi bir şekilde gelişebildiğini, ancak bu durumda pullulan sentezleyemediğini belirtmişlerdir [14].

Göksungur ve diğerleri (2003) sentetik ortamda *Aureobasidium pullulans* P56 ile optimum başlangıç pH değerinin 7.5 olduğunu bildirmişlerdir. Cheng, Demirci & Catchmark (2010) en yüksek pullulan üretimini pH 5.0' da elde etmiştir [10,14,15]. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, çalkalamalı kültürde *Aureobasidium pullulans* P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karışık kültürü ile % 5 şeker içeren sentetik ortamın kullanılmasıyla (pH= 7.5) pullulan üretimi konusunda başarılı bir sonuç elde edilebileceği ortaya çıkmaktadır. Pullulan üretiminin artırılması için çeşitli parametreler (üretimi arttırıcı besin elementlerinin ilavesi, azot konsantrasyonu vb.) üzerinde çalışmalar yapılması gerektiği kanısına varılabilir.



Grafik 3. Farklı pH değerlerinin polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi

3.4. Substrat Konsantrasyonunun Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karşık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde optimum substrat konsantrasyon değerinin bulunması için çalkalamalı inkübatörde 3gün, pH 7.5 ile 28°C sıcaklıkta 28 g/l, 49 g/l ve 68 g/l inülin içeren başlangıç değerlerinde denemeler yapılmıştır.

Artan substrat konsantrasyonunun pullulan üretimini inhibe edici etkisi vardır. Tabloda görüldüğü gibi en iyi sonuç % 5 şeker içeren ortamdan elde edilirken; şeker konsantrasyonu arttıkça (% 7'de) pullulan üretiminin engellendiği ortaya çıkmaktadır. Yapılan deneylerin sonucu Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Farklı substrat konsantrasyonlarının polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi

Substrat konsantrasyonu	% 3	% 5	% 7
Üretilen polisakkarit miktarı (g/L)	16.02	24.12	20.34
Üretilen pullulan miktarı (g/L)	9.52	17.32	4.93

Schuster ve diğerleri (1993) tarafından *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile çalkalamalı inkübatörde % 5 şeker içeren sentetik ortam kullanarak 0.19 g/l/h hacimsel verimlilik değeri elde edilmiştir [14, 15].

Göksungur ve arkadaşları (2003) tarafından *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile % 3, % 5, % 7 şeker içeren sentetik ortamlardan üretilen pullulan miktarları (çalkalamalı inkübatör, 28°C, pH 7.5) ile yapılan çalışmada; maksimum pullulan üretimi % 5 şeker içeren ortamda 5.günde 16.7 g/l olarak gerçekleştiğini görmüşlerdir. % 3 şeker içeren ortamda üretilen pullulan miktarı ise ortamdaki şekerin tamamının tüketilmesiyle belli bir seviyede kaldığını ve 5.günde 9.2 g/l pullulan üretildiğini tespit etmişlerdir. % 7 şeker içeren ortamda üretilen polisakkarit miktarları birbirine yakın seviyede gerçekleşmesine karşın, bu ortamlarda üretilen pullulan değerleri birbirinden çok farklı miktarlarda olduğunu bulmuşlardır. Bu durum belli bir seviyeye kadar substrat konsantrasyonunun artmasıyla pullulan üretiminin arttığını, daha sonraki seviyelerde ise substrat inhibasyonu nedeniyle pullulan üretimin azaldığını göstermektedir. Chul Shin ve diğerleri (1987) da benzer şekilde yüksek başlangıç sakkaroz konsantrasyonlarında pullulan üretiminin engellendiğini öne sürmüşlerdir [1, 15].

Bazı fermentasyonlarda polisakkarit konsantrasyonunun maksimuma ulaştıktan sonra azaldığı gözlemlenmektedir. % 5 şeker içeren ortamda pullulan miktarı 5.günde maksimuma ulaşmış ve 6.günde azalmıştır. West ve Strohfus (1996) tarafından fermentasyonun son aşamalarında mikroorganizma tarafından endojen glukoamilaz A enzimin salgılandığı öne sürülmüştür [14]. Bu enzim üretilen polisakkaritleri olduğu kadar pullulanı da parçalayabilme özelliğine sahiptir. Farklı substrat konsantrasyonlarının pullulan üretimi üzerindeki etkisi melaslı ortam kullanılarak incelendiğinde, % 5 başlangıç şeker konsantrasyonuna sahip ortam en iyi sonucu vermiştir [19, 20, 21]. Roukas (1998) sülfürik asit ile muamele edilmiş melaslı ortamda en iyi polisakkarit üretiminin % 7 başlangıç substrat konsantrasyonu ile elde edildiğini ileri sürmüştür [22, 20].

4. SONUÇ

Sonuç olarak, endüstriyel bir polisakkarit olan pullulan biyopolimeri, biyolojik olarak parçalanabilen, yağa dirençli, sıcaklıktan etkilenmeyen, oksijen geçirmeyen, toksik olmayan yapı özellikleri göstermesi ve suda çözünebilmesi nedeniyle yenilebilen filmlerin üretiminde kullanılmak için uygun bir polisakkarittir. Ayrıca, pullulan yenilebilen filmlerin üretiminin yanı sıra ilaç, kozmetik gibi pek çok sanayi alanında kullanılabilir. Günümüzde birçok endüstriyel kullanım alanı bulmuş olan pullulanın, yapılan çalışmaların ışığında kullanım alanlarının gelecekte daha da artacağı açıktır.

Pullulan'ın özelliklerini göz önünde alarak kullanım alanlarını genişletmek için araştırma yapılmalıdır. Ayrıca faydalı ve zararlı yanları belirlenerek, insan sağlığı açısından etkisi incelenebilir. Şu zamana kadar pullulan üretimindeki tüm çalışmalar funguslar üzerinde yapılmıştır. Bakteriler

tarafından pullulan sentezi yapılabilmeyeceği yeni bir araştırma konusu olabilir.

Kaynaklar

[1] Seviour, R. J., Stasinopoulos, S. J., Auer, D. P. F. and Gibbs, P. A., 1992. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (3): 279-329.

[2] Auer, D. P. F., and Seviour, R. J., 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 637-644.

[3] Chi, Z. And Zhao, S., 2003. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan producing yeast. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, 33: 206-211.

[4] Dağbağlı S., Güvenç U., Göksungur Y., 2008. Mikrobiyal bir polisakkarit: pullulan. *Akademik Gıda*, 6(3): 42-48.

[5] Chul Shin, Y., Kim, Y. H., Lee, H. S., Cho, S. J. and Byun, S. M., 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 129-133.

[6] Lacroix, C., LeDuy, A., Noel, G. and Choplin, L., 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 202-207.

[7] Israilides, C., Scanlon, B. Smith, A., Harding, S. E. and Jumel, K., 1994. Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 25: 203-209.

[8] Israilides, C., Smith, A., Harthill, J. E., Barnett, C., Bambalov, G., Scanlon, B., 1998.. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 613-617.

[9] Youssef, F., Roukas, T. and Biliaderis, C. G., 1999. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 34: 355-366.

[10] Göksungur Y., Uçan A. & Güvenç U., 2004. Production of pullulan from beet molasses and synthetic medium by *Aureobasidium pullulans*. *Turkish Journal of Biology*, 28: 23-30.

- [11] Göksungur Y., Dağbağlı S., Uçan A. & Güvenç U., 2005. Optimization of pullulan production from synthetic medium by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 819-827.
- [12] Leathers, T. D., Nofsinger, G. W., Kurtzman, C. G. and Bothast, R. S., 1998. Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3: 231-239.
- [13] Miller, G. L., 1959. Use of DNS reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- [14] Shengyun, W., Chen, H., Jin, Z., Tong, Q., 2010. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26: 737-741.
- [15] Ürküt, Z., 2007. Kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Aureobasidium pullulans* P56 hücreleri ile pullulan üretiminin optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü (yayınlanmamış).
- [16] Uçan, A., 2003. Sentetik Ortam ve Melastan *Aureobasidium pullulans* ile Pullulan Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü (yayınlanmamış).
- [17] Ürküt, Z., Dağbağlı, S., Göksungur, Y., 2007. Optimization of pullulan production using caalginate-immobilized *Aureobasidium pullulans* by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 837-846.
- [18] Catley, B. J., 1980. The extracellular polysaccharide pullulan, produced by *Aureobasidium pullulans*: A relationship between elaboration rate and morphology. *Journal of General Microbiology*, 120: 265-268.
- [19] Roukas, T., 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, 33(8): 805-810.
- [20] Roukas, T., 1999 a. Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22: 617-621.
- [21] Roukas, T., 1999 b. Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15: 447-450.
- [22] Reed-Hammer, B. and West, T. P., 1994. Effect of complex nitrogen sources on pullulan production relative to carbon source. *Microbios*, 80: 83-90.

Geliş Tarihi:11.03.2013

Kabul Tarihi:01.05.2013

