

FERMANTASYON YOLUYLA PULLULAN ÜRETİMİ VE GIDA ENDÜSTRİSİNDE KULLANIMI

Ercan Yatmaz, İrfan Turhan*

Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 19.08.2011

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 14.11.2011

Kabul tarihi / Accepted: 16.11.2011

Özet

Pullulan, mikrobiyel kaynaklı üretimi yaygın olarak gerçekleştirilen ve önemli özellikleri sayesinde gıda formülasyonlarında ve ambalaj endüstrisinde kaplama materyali olarak geniş kullanım alanına sahip olan bir polisakkarittir. Ayrıca, pullulan; polimorfik mantar olan *Aureobasidium pullulans* tarafından üretilen ve glikoz birimlerine sahip bir homopolisakkarit olup maltotriozların α -1,6 bağlanmasıyla oluşan zincir yapı olarak da tanımlanmaktadır. Pullulan üretiminde mikrobiyel yolların kullanılması saflık değeri yüksek ve düşük maliyetli pullulan üretimini olanaklı kılmaktadır. Pullulan "Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen (GRAS)" bileşenler statüsünde yer aldığından gıdalarda uygun dozlarda olmak üzere kullanımında herhangi bir sorun teşkil etmemektedir. Bu çalışma kapsamında pullulan, fermantasyonla pullulan üretimine etki eden faktörler ve pullulanın kullanım alanları ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Pullulan, fermantasyon, gıda endüstrisi

PULLULAN PRODUCTION BY FERMENTATION AND USAGE IN FOOD INDUSTRY

Abstract

Pullulan, which is generally materialized by the production of microbial origin, has widely usage as a coating agent in food formulations and packaging industry owing to its unique properties. Moreover, pullulan is a linear homopolysaccharide produced by the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*, which is composed of glucose units and often described as α -1,6-linked maltotriose. Using microbial techniques enable to produce cheap and high purity pullulan. Pullulan takes place in "Generally Recognized As Safe (GRAS)" and therefore appropriate doses can be used in foods seamlessly. The aim of this study is to present a review about pullulan, effect fermentation parameters of producing pullulan and usage of pullulan in the food industry.

Keywords: Pullulan, fermentation, food industry

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ iturhan@akdeniz.edu.tr,

☎ (+90) 242 310 6573

☎ (+90) 242 227 4564

GİRİŞ

Biyoteknoloji alanında gerçekleşen gelişmelere bağlı olarak üretilen mikrobiyel kaynaklı polisakkaritler sahip oldukları üstün özellikler sayesinde çeşitli endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu polisakkaritlerden birisi olan pullulan, *Aureobasidium pullulans* başta olmak üzere diğer bazı mikroorganizma türleri (1-6) tarafından da sentezlenen bir biyopolimerdir (7).

Günümüzde halen pullulan üretim maliyeti nispeten yüksektir ve bu nedenle mikroorganizmanın gelişebilmesini ve pullulan üretebilmesini sağlayacak besinsel zenginliğe sahip ucuz karbon ve azot kaynakları araştırılmaktadır (8). Tatlı patates (8), hindistan cevizi yan ürünleri (9), nişastanın hidrolizat ürünleri (10), şeker kamışı (11) ve keçiboynuzu (12) pullulan üretimi üzerine çalışılmış çeşitli karbon kaynaklarıdır.

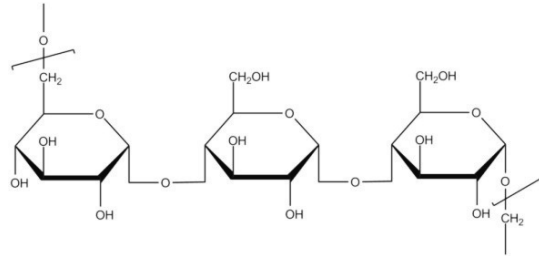
Pullulan, 20 yıldan uzun bir süredir Japonya'da gıda bileşeni olarak yaygın bir şekilde kullanım alanı bulmaktadır ve ABD'de "Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen (GRAS)" bileşenler statüsünde bulunmaktadır (13). Pullulan mutajenik olmayan, toksik olmayan, tatsız, kokusuz ve yenilebilir bir polisakkarittir (14). Pullulan ilk zamanlar sindirilemeyen bir polimer olarak düşünülürken, yapılan çalışmalarla yavaş bir şekilde sindirilebilir olduğu ortaya konmuştur ve

Çizelge 1. Pullulanın Bazı Fiziksel Özellikleri (10, 19, 20, 22- 24)

Özellik	Etki
Çözünürlük	Suda yüksek çözünürlük gösteren pullulan, dimetilformamid ve dimetil sülfoksit dışındaki organik çözücülerde çözünmez.
Kararlılık	1, 4 ve 6. karbonlardaki bağlar sayesinde pullulan nispeten kararlıdır. 250-280 °C'lerde nişasta ile benzer şekilde ayrışmakta ve kömürleşmektedir.
Viskozite	Suda stabil viskoz bir yapı oluşturarak çözünür. Diğer polisakkaritlere göre daha az viskozdur ancak viskoz özelliğini kolay kaybetmez. Viskozite moleküler ağırlığı (MA) ile orantılıdır. Yüzey gerilimi suya yakındır (74 dyne/cm ²).
Film oluşturabilme	%5-25'lik sulu çözeltileri yenilebilir filmlerin içerisinde oluşturulabilir. Düşük oksijen geçirgenliği (0.5 cc/m ² /24 saat; %60 RH ve 23 °C), termal stabilite, anti-statik ve dondurulduktan sonra elastisitesini koruma özelliklerine sahiptir. Lezzet öğelerini tutar ve yağa dayanıklıdır.
Yapışma ve bağlayıcılık	Yoğun yapışkan özelliğe sahip olup; gıdalarda kullanıma uygundur. Püskürtme proseslerinde iyi bir yardımcı elemandır.
Nem tutma	RH<%70'de %10-15 nem içeriğine sahiptir. Higroskopik ve yapışkan değildir. Nemlendirici ve bağlayıcı olarak kullanılabilir.
Biyobozunurluk	Sindirimi yavaş bir polisakkarit olup pullulanaz ve izopullulanaz gibi mikrobiyel enzimler tarafından parçalanabilmektedir.

nişasta ikame edici olarak düşük kalorili gıdalarda kullanılmaktadır (15). Pullulan filmlerin transparan, renksiz ve yenilebilir özelliklere sahip olması güvenilir kaplama materyali olarak kullanılması yönünde de büyük ilgi çekmektedir (16). Ayrıca kozmetik ürünlerinde, losyonlarda ve şampuanlarda da kullanılmaktadır (1). Bu uygulamaların yanı sıra son zamanlarda ilaçlar, doku mühendisliği, yaraların iyileştirilmesi ve tanısal görüntüleme gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda pullulanın uygunluğu araştırılmaktadır (17).

Bu kadar yaygın kullanım alanına sahip olmasına rağmen, pullulanın fermentatif yolla üretiminde bazı problemler de mevcuttur. Bunlar (i) melanin pigmenti oluşumu; (ii) fermantasyon ortamındaki



Şekil 1. Pullulanın kimyasal yapısı (21)

yüksek şeker konsantrasyonunun inhibitör olarak davranması; (iii) pullulanın çökeltme ve geri kazanımına bağlı olarak yüksek üretim maliyetidir (18).

PULLULANIN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Pullulan, başta *Aureobasidium pullulans* türleri olmak üzere *Tremella mesenterica*, *Cytaria harioti*, *Cytaria darwinii*, *Cryphonectria parasitica*, *Teloschistes flavicans*, *Rhodototula bacarum*, *Eurotium chevalieri* gibi farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler ve suda çözünebilir mikrobiyel bir polisakkarittir (1-6) .

Pullulan, (1-6)- α -D-glikozidik bağları ile bağlanmış maltotrioz alt ünitelerinden (ör. α -(1-4) Glucopyranosyl- α -(1-4) Glucopyranosyl- α -(1-6) Glucopyranosyl) oluşan lineer α -D-glukandır (1) (Şekil 1). Pullulan'ın sahip olduğu bazı fiziksel özellikler Çizelge 1'de verilmiştir.

GELİŞME PARAMETRELERİNİN PULLULAN ÜRETİMİNE ETKİLERİ

Başlangıç Şeker İçeriğinin Etkisi

Göksungur ve ark. (25), yaptıkları bir çalışmada pullulan üretiminde farklı başlangıç şeker içeriği düzeylerinin etkisini incelemişlerdir. Başlangıç şeker içeriğine göre üretilen maksimum polisakkarit miktarları 30, 50, 70 ve 90 g/L için sırasıyla 12.73 \pm 0.22 g/L, 16.21 \pm 0.21 g/L, 20.62 \pm .62 g/ L ve 18.7 \pm 0.41 şeklinde gerçekleşmiş olup bu polisakkaritlerin sırasıyla 46.2%, 70.9%, 77.7% ve 79.5% miktarını pullulan oluşturmaktadır. Benzer bir çalışmada, maya suyu Y68 ile yapılan pullulan üretim denemelerinde 28 °C ve 180 devir/dk ve %8 glikoz içeren besiyerinde en yüksek pullulan verimi (%5.4) elde edilmiştir (5).

Karbon Kaynaklarının Etkisi

Yapılan çalışmalar sonucunda pullulan üretiminde en yüksek verimin sakkaroz, glikoz, früktoz, maltoz, nişasta veya malto-oligosakkaritlerin karbon kaynağı olarak kullanımı sonucu elde edildiği tespit edilmiştir (26). Benzer bir çalışmada farklı karbon kaynaklarının pullulan verimine etkisi incelenmiş ve en yüksek verim glikoz (52.47 \pm 0.09 g/L) kullanılması halinde elde edilmiş ve onu sırasıyla sakkaroz (40.54 \pm 1.36 g/L), dekstrin (38.83 \pm 0.25 g/L), früktoz (25.54 \pm 1.79 g/L), maltoz (23.26 \pm 0.78 g/L) ve ksiloz (15.72 \pm 3.98 g/L) izlemiştir (27). Bu şekerlerin yanı sıra arabinoz, mannoz, galaktoz, ramnoz ve laktoz gibi şekerlerde pullulan üretiminde kullanılabilen ancak bunlardan düşük pullulan verimi elde edilmektedir (26). Bu karbon kaynaklarının kullanımı ile pullulan verimi artmakla birlikte maliyet de

artmaktadır. Bu nedenle endüstriyel ölçeklerde pullulan üretiminin gerçekleştirilebilmesi için daha düşük maliyetli karbon kaynaklarının üretime elverişli olması gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli atık ve yan ürünlerin pullulan üretiminde kullanılabilirliği üzerine çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Yapılan bir çalışmada ucuz ve zirai olarak temin edilebilirliği kolay olan tatlı patatesin enzimler ile hidrolize edilmesi sonucunda pullulan üretimine elverişli olduğu ve ayrıca glikozla elde edilenden %139.07 ve sakkarozla elde edilenden de %39.02 daha fazla pullulan verimi elde edildiği tespit edilmiştir (8). Benzer bir çalışmada şeker kamışı ekstraktında yapılan arıtılmamış şeker kamışının karbon kaynağı olarak kullanılması sonucunda *A. pullulans*'ın iyi bir gelişim gösterdiği, üretilen pullulanın renksiz olduğu ve sakkarozdan üretilen pullulana göre daha viskoz olduğu bildirilmiştir (26). Bunların yanı sıra hindistan cevizi yan ürünleri (9), nişastanın hidrolizat ürünleri (10) ve keçiyoynuzu (12) pullulan üretimi üzerine çalışılmış farklı karbon kaynaklarındandır.

Azot Kaynaklarının Etkisi

Pullulan üretiminde ve maliyetinin belirlenmesinde diğer en önemli faktör kullanılan azot kaynağıdır. Maya ekstraktı pullulan üretiminde yaygın olarak kullanılan bir azot kaynağıdır. Ancak yüksek verim elde edilmesinin yanı sıra pahalı bir azot kaynağıdır. Göksungur ve ark. (25), yaptıkları bir çalışmada pullulan üretiminde en yüksek verim maya ekstraktında (16.02 \pm 0.41 g/L) tespit edilmiş ve bunu 12.60 \pm 0.24 g/L ile soya proteini ve 12.09 \pm 0.18 g/L ile de üre takip etmiştir. Maya ekstraktı ve üreden yaklaşık aynı polisakkarit konsantrasyonu elde edilmesine rağmen, maya ekstraktından elde edilen polisakkaritlerin %77.7'si pullulan iken ürede bu değer %62.4 olarak tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında (3-5-7 g/L) çalışılmış ve azot kaynağı miktarı arttıkça biyokütle miktarında artış gözlenmesine rağmen bu artış pullulan miktarına yansımamıştır. En yüksek pullulan üretim miktarı 23.1 g/L ile 5 g/L amonyum sülfat konsantrasyonunda elde edilmiştir. 5 ve 7 g/L amonyum sülfat konsantrasyonları kıyaslandığında maksimum biyokütle miktarı ve maksimum spesifik gelişme hızı 7 g/L konsantrasyonda tespit edilmesine karşın; maksimum pullulan miktarı 5 g/L konsantrasyonda

tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak fermantasyonun başlarında biyokütle gelişimi esnasında azotun tam olarak kullanılmaması ve bu nedenle de biyokütle miktarı artmasına rağmen pullulan miktarında bir artış olmadığı düşünülmektedir (28).

pH, Sıcaklık ve Fermantasyon Süresinin Pullulan Üretimine Etkisi

Fermantasyon proseslerinde verime etki eden en önemli parametreler arasında pH, sıcaklık ve fermantasyon süresi de yer almaktadır. Her çalışmada uygun gelişim parametrelerinin seçimi ile verimde kayda değer artışlar sağlanabilir. Yapılan bir çalışmada hidrolize patates nişastasında pullulan üretimi denenmiş ve maksimum pullulan konsantrasyonuna (19.2 g/L) başlangıç pH'sı 7.26, başlangıç substrat miktarı 79.4 g/L, sıcaklık 28 °C ve inkübasyon süresi 111.8 saat olduğunda ulaşılmış ve pullulan konsantrasyonunda %20 artış sağlanmıştır (25). Benzer bir çalışmada cevap yüzey metodu ile maksimum pullulan üretimi için fermantasyon şartlarının optimizasyonu yapılmış ve maksimum pullulan konsantrasyonuna (30.28 g/L), 28 °C'de, fermantasyonun 5. gününde ve başlangıç pH değeri 5 iken ulaşılmıştır (29). Bir başka çalışmada tatlı patatesin pullulan üretiminde kullanılabilirliği incelenmiştir. Karbon kaynağı olarak hidrolize tatlı patatesin kullanımının pullulan verimini sakkarozu göre %139.07 ve glikoza göre %39.02 arttırdığı tespit edilmiş ve optimal başlangıç pH değerinin 5.5 ve bu değerle pullulan üretim miktarının 29.43 g/L olduğunu hesaplamışlardır. Pullulan üretiminin, hücre gelişimden bağımsız olarak gerçekleştiğini de gözlemlemişlerdir (8). Bunların yanı sıra biotin, ferrik klorür, manganez klorür ve çinko klorürün pullulan formasyonunu geliştirdiği bulunmuştur (30). Buna karşılık, Fe⁺³ ve Zn⁺²'nin maya benzeri hücreler ve polisakkaritlerin gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (31).

Biyoreaktörde pullulan üretimi

Cheng ve Demirci (32), yaptıkları bir çalışmada *A. pullulans* (ATCC 201253) ile biyofilm reaktörde pullulan üretimi üzerine PCS (Plastik Kompozit Destek; Plastic Composite Support) ve pH profilinin etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla 13 farklı PCS tüp hazırlanmış ve 3 farklı pH profilinde biyoreaktörde fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Diğer faktörler (gram PCS

başına azot içeriği, azot süzme oranı ve PCS materyaline tutunan biyokütle miktarı) göz önüne alındığında kesikli biyofilm reaktörde *A. pullulans* ile pullulan üretiminde yüksek biyokütle bağlanabilirliği ve yüksek pullulan üretimi sağlayan en uygun PCS materyalinin SYRG+ (soya gövdesi, yağsız soya unu, maya ekstraktı, kurutulmuş sığır kırmızı kan hücreleri ve mineral tuzlar içeren PCS) olduğu belirlenmiştir. Farklı pH profillerinden ise en yüksek pullulan üretim miktarı (32.9±0.7 g/L) ve ürün verimi (42.2±0.7%) profil 2'de gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışmada, pullulan üretiminde üç kritik besin bileşeni olan sakkaroz, maya ekstraktı ve amonyum sülfatın optimum konsantrasyonlarının belirlenmesinde Box-Behnken dizayn ile cevap yüzey metodu kullanılmış ve optimal değerler sırasıyla 100, 0 ve 0 g/L olarak bulunmuştur. Optimum besiyeri koşullarında pullulan üretimi 60.7 g/L olarak gerçekleşmiş olup bu değer orijinal besiyeri kullanımı sonucu üretilen pullulan miktarından 1.8 kat, süspansiyon besiyeri kullanımı sonucu üretilen pullulan miktarından ise 2.4 kat daha fazladır (33).

Farklı bir çalışmada, *A. pullulans* ile gerçekleştirilen pullulan üretim denemelerinde havalandırmanın biyokütle ve pullulan üretimine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda optimum havalandırma oranı 1 vvm olarak bulunmuş ve geleneksel karıştırıcı fermentörlere göre kullanmış oldukları OBF (Oscillatory Baffled Fermenter)'de daha iyi performans gözlemlenmiştir (34).

Choudhury ve ark. (35), farklı yabani çiçeklerden izole ettikleri mayalardan ozmotolerant ve pigmentiz *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 ile yapmış oldukları denemelerde %15 glukoz içeren besiyerinde gerçekleştirilen denemelerde 66.79 g/L melaninsiz ekzopolisakkarit ürettiğini tespit etmişler ve bu ekzopolisakkariti FTIR (Fourier-transform infrared) ile analiz ettiklerinde elde edilen ürünün standart pullulanla aynı olduğunu belirlemişlerdir.

Ravella ve ark. (36), Kuzey Wyke Araştırma Birimi (İngiltere) biyogaz reaktörlerinden izole ettikleri mayanın pullulan üretme yeteneğini ve optimal şartlarını çalışmışlardır. Elde ettikleri mayanın optimum yetiştirme şartlarını 100 ml sakkaroz besiyerinde 28 °C'de 200 devir/dk olarak belirlemişler ve karıştırıcı tank fermentörde yapmış oldukları çalışma sonucunda maksimum

polisakkarit konsantrasyonuna (40.1 g/L) ve üretkenlik (12.5 g/L) değerine ulaşmışlardır.

West (37), yapmış olduğu çalışmada immobilize *A. pullulans* ATCC 42023 ile pullulan üretimi gerçekleştirmiş ve elde edilen immobilize hücrelerin iki fermantasyonda kullanılabildiğini ve ikinci fermantasyon esnasında pullulan üretiminin azalmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur.

Wu ve ark. (38), yapmış oldukları çalışmada iki aşamalı sıcaklık uygulamasının pullulan üretimine etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla gerçekleştirdikleri denemeler sonucunda ilk iki gün 32 °C (hücre gelişimi için) ve sonraki iki gün 26 °C (pullulan üretimi için) olmak üzere gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda dört gün 26 °C'de gerçekleştirilen denemelere göre hem pullulan üretiminde artış gözlemlenmiş hem de biyokütle gelişiminde tek düze bir yapı görülmüştür.

Ürküt ve ark. (39), kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *A. pullulans* ile yapmış oldukları optimizasyon çalışmaları sonucunda maksimum pullulan üretimine (21.07±0.48 g/dm³) pH 7.31, 191.5 devir/dk ve 101.2 saat fermantasyon süresi sonucunda elde etmişlerdir. Benzer bir çalışmada immobilize *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253 ile yapılan pullulan üretim denemelerinde %1 kitosan ile tutuklanmış maya hücrelerinin karbon kaynağı olarak mısır şurubu kullanılması durumunda 168 saatlik iki çevrim boyunca pullulan üretme yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. 168 saatlik üretimden sonra ikinci çevrimde üretilen pullulan miktarının (5 g/L) birinci çevrimde üretilen miktardan (3.1 g/L) 1.6 kat daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu belirlemişlerdir (40).

Singh ve ark. (41), *Aureobasidium pullulans* FB-1 ile yapmış oldukları denemelerde cevap yüzey metodunu kullanarak kritik besin öğelerinin optimum değerlerinin belirlenmesini amaçlamışlar ve optimum sakkaroz, amonyum sülfat, maya ekstraktı, dipotasyum hidrojen fosfat ve sodyum klorür miktarlarını sırasıyla %5.31, %0.11, %0.07, %0.05 ve %0.15 olarak belirlemişlerdir.

Cheng ve ark. (42), yapmış oldukları çalışmada *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretiminde biyokütle üretimi, pullulan üretimi ve şeker tüketiminin matematiksel modellemesini yapmışlardır. Çalışma sonucunda modifiye edilmiş

Gompertz modelinin biyokütle üretim, pullulan üretim ve şeker tüketim profillerinin ifadesinde en uygun matematiksel yöntem olduğu belirlenmiştir. Ayrıca modifiye Gompertz modelinin validasyonu biyokütle (eğim= 1.00, R²= 0.991), pullulan (eğim= 1.10, R²= 0.991) ve şeker (eğim= 0.96, R²= 0.001) tahminlerinin doğru olduğunu göstermiştir.

Kim ve ark. (43), yapmış oldukları çalışmada *A. pullulans* HP-2001 ile ürettikleri pullulanın geri kazanım koşullarının optimize edilmesinde cevap yüzey metodunu kullanmışlar ve pullulan geri kazanımında optimal şartları etanol (veya izopropanol): berrak kısım oranı 3.0:1.0, reaksiyon süresini 29.5 saat ve reaksiyon sıcaklığını 20.2 °C olarak belirlemişlerdir. Optimal şartlarda etanol ile geri kazanımda verim %79.2 olarak beklenirken, izopropanol kullanılması durumunda beklenen verim değeri %85.5 olmaktadır. Benzer bir çalışmada maksimum pullulan verimine (%4.47) ise, izopropil alkol:berrak kısım oranı 2:1 ve 12 saat çöktürme süresinde elde edilmiştir (44). Wu ve ark. (45) ise, yapmış oldukları çalışma sonucunda fermantasyon ortamından pullulanın geri kazanımı için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem kapsamında öncelikle santrifüj işlemi ile hücreler topaklaştıktan sonra ortamdan uzaklaştırılmakta, ardından elde edilen melaninli sıvı sıcaklık uygulamasına tabii tutulmakta ve ortamdaki proteinler uzaklaştırılmaktadır. Melanin uzaklaştırma işlemi ise hidrojen peroksitle oksidasyon işlemi sağlandıktan sonra vakumda konsantre etme, etanol ile çöktürme ve kurutma işlemleri sonucunda yüksek saflıkta pullulan elde edilebilmektedir. Farklı bir çalışmada ise pigmentsiz (melaninsiz) pullulan üretiminin mümkün olduğu belirtilmiştir (46).

PULLULANIN GIDA ENDÜSTRİSİNDE KULLANIMI

Pullulan sahip olduğu özellikler sayesinde hem gıda bileşeni olarak hem de film oluşturma yeteneği sayesinde yenilebilir film olarak etkin şekilde kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada pullulanın pullulanaz enzimi ile hidrolizi sonucunda maltotrioz şurubu elde edilebileceği ortaya konmuştur (47). Bu şurup donma noktasını düşürücü etkisi, hafif tatlılık, nem tutma, gıda maddelerindeki nişastanın retrogradasyonunu önleme, maltoz, glikoz ve sakkaroz şurupları ile kıyaslandığında daha az renk oluşumu, iyi ısı stabilitesi, düşük solüsyon viskozitesi, yüksek fermente olabilirlik ve camsı yapıyı destekleme gibi özellikleri sayesinde gıda

endüstrisinde kullanıma oldukça elverişlidir. Bu özellikleri sayesinde maltotrioz şurupların tatlılar, fırın ürünleri ve mayalı ürünlerde kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ayrıca amilopullulanaz enzimi sayesinde pullulanın maltotrioz ve maltozun yanı sıra glikoza da indirgenemediği bulunmuştur (48).

Yapılan başka bir çalışmada fermantasyon yolu ile üretilen pullulan biyopolimerine uygulanan toksikolojik testlerde, 2000 g/kg'a kadar uygulanan dozlarda ölüm görülmemesi ve 14 günlük izleme döneminde hayvanların dış görünümünde toksisiteye ilişkin semptomların gözlenmemesi; fermantasyon yöntemi ile üretilen pullulanın mutajenik/karsinojenik etki potansiyeli olmadığını ve çeşitli gıdalarda (incir, domates ve kayısı) pullulan filmin güvenli olarak kullanılabilmesini göstermiştir (49). Benzer bir çalışmada pullulan filmin moleküler davranışı incelenmiş ve moleküler davranışın filmin su içeriği ile kuvvetle ilişkili olabileceği gözlemlenmiştir (50). Bir başka çalışmada ise pullulan filmin aljinat ve CMC (karboksil metil selüloz) filmlere göre su buharı geçirgenliğinin daha düşük olduğu; pullulan filme aljinat ve CMC ilavesinin su geçirgenliğini ve mekanik özelliklerini zayıflatmış ve yapılan analizler sonucunda pullulan filme aljinat veya CMC ilavesinin -OH gruplarında rol oynayan hidrojen bağlarının saf pullulandan elde edilen filmdeki bağlara kıyasla daha zayıf olduğu tespit edilmiştir (51). Yenilebilir pullulan filmlerin su buharı geçirgenliğinin iyileştirilmesi üzerine yapılan bir başka çalışmada, pullulan filmlerin su buharı geçirmeme yeteneklerinin filme eklenen pirinç balmumu miktarının artırılması ile geliştiği gözlemlenmiştir. Aynı çalışma kapsamında 0.55 su aktivitesi değerinde BET (The Brunauer-Emmet-Teller) modelinin, 0.12-0.95 su aktivitesi değerlerinde ise GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) modelinin deneysel veriler ile uyumlu sonuçlar verdiği hesaplanmıştır (52).

Yapılan bir çalışmada ise, pullulanın ilaçların tutuklanmasında ve kontrollü olarak salınmasında kullanılabilirliği araştırılmış, düşük toksik etkiye sahip pullulan mikrokürelerinin düşük solüsyon kritik sıcaklıklarının altında ve üstündeki değerlerde bile yüksek konsantrasyonlarda (10 mg/ml) sıcaklığa hassas ünitelerin ve ilaçların kontrollü olarak salınmasına dayalı uygulamalarda kullanım potansiyeli olduğu görülmüştür (53).

SONUÇ

Gıda sanayinde yaygın kullanım alanına sahip olan pullulanın benzersiz özellikleri onu vazgeçilmez kılmaktadır. Koyulaştırıcı özelliği sayesinde çorbalarda, soslarda ve içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yenilebilir filmlere istenilen özelliklerin kazandırılmasında ve rahat şekil verilmesini sağlamadaki özellikleri sayesinde geniş kullanım alanına sahiptir. Bunların yanı sıra sindirimini yavaş bir şekilde gerçekleşmesi nedeniyle düşük kalorili (diyet) gıdaların üretiminde de GRAS listesinde yer alması dolayısı ile rahat bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılacak çalışmalarla daha ucuz üretim yöntemlerinin geliştirilmesi pullulanın kullanım alanlarını daha da genişletecektir. Ayrıca pullulan üretiminde karşılaşılan sorunların yeni teknikler geliştirilerek çözümlenmesi de üretim güvenilirliğini ve stabilitesini sağlayacağından pullulan üretim miktarını ve dolayısıyla da kullanım oranını arttıracığına şüphe yoktur.

KAYNAKLAR

1. Leathers TD. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biot*, 62, 468-473.
2. Forabosco A, Bruno G, Sparapano L, Liut G, Marino D, Delben F. 2006. Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*-I. Production and characterization of the exopolysaccharides. *Carbohydr Polym*, 63, 535-544.
3. Delben F, Forabosco A, Guerrini M, Liut G, Torri G. 2006. Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*-II. Nuclear magnetic resonance evidence. *Carbohydr Polym*, 63, 545-554.
4. Reis RA, Tischer CA, Gorrin PAJ, Iacomini M. 2002. A new pullulan and a branched (1-3)-(1-6)-linked β -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*. *FEMS Microbiol Lett*, 210, 1-5.
5. Chi Z, Zhao S. 2003. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme Microb Tech*, 33, 206-211.
6. Gaur R, Singh R, Tiwari S, Yadav SK, Daramwal NS. 2010. Optimization of physico-chemical and nutritional parameters for a novel pullulan-producing fungus, *Eurotium chevalieri*. *J Appl Microbiol*, 109: 1035-1043.

7. Shingel KI. 2004. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydr Res*, 339, 447–460.
8. Wu S, Jin Z, Tong Q, Chen H. 2009. Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr Polym*, 76, 645–649.
9. Thirumavalavan K, Manikkadan TR, Dhanasekar R. 2009. Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans*. *Afr J Biotechnol*, 8, 254–258.
10. Imeson A. 2010. Food stabilisers, Thickeners and Gelling Agents, Wiley-Blackwell, United Kingdom, pp. 354.
11. Vijayendra SVN, Bansal D, Prasad MS, Nand K. 2001. Jaggery: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CFR-77. *Process Biochem*, 37, 359–364.
12. Roukas T, Biliaderis CG. 1995. Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Appl Biochem Biotech*, 55, 27–44.
13. US FDA. 2002. Agency Response Letter: GRAS Notice No. GRN 000099 [Pullulan]. College Park, Maryland: U.S. Food and Drug Administration (U.S. FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), Office of Food Additive Safety.
14. Kimoto T, Shibuya T, Shiobara S. 1997. Safety studies of a novel starch, pullulan: Chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food Chem Toxicol*, 35, 323–329.
15. Wolf BW. 2005. Use of pullulan as a slowly digested carbohydrate. US Patent Office, Pat. No. 6 916 796.
16. Gounga ME, Xu S, Wang Z. 2007. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *J Food Eng*, 83: 521-530.
17. Rekha MR, Sharma CP. 2007. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 20 (2), 116–121.
18. Youssef F, Roukas T, Biliaderis CG. 1999. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochem*, 34, 355–366.
19. Ghimici L, Constantin M, Fundueanu G. 2010. Novel biodegradable flocculating agents based on pullulan. *J Hazard Mater*, 181: 351-358.
20. Embuscado ME, Huber KC. 2009. Edible Films and Coatings for Food Applications, Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, pp. 403.
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Pullulan.png> (Accessed 04 April 2008)
22. Kshirsagar AC, Yenge VB, Sarkar A, Singhal RS. 2009. Efficacy of pullulan in emulsification of turmeric oleoresin and its subsequent microencapsulation. *Food Chem*, 113: 1139-1145.
23. Rekha MR, Sharma CP. 2009. Blood compatibility and in vitro transfection studies on cationically modified pullulan for liver cell targeted gene delivery. *Biomaterials*, 30: 6655-6664.
24. Zhang H, Gao F, Liu L, Li X, Zhou Z, Yang X, Zhang Q. 2009. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. *Colloid and Surface B*, 71: 19-26.
25. Göksungur Y, Uzunoğulları P, Dağbağlı S. 2011. Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. *Carbohydr Polym*, 83, 1330-1337.
26. Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. 2010. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr Polym*, 73, 515-531.
27. Duan X, Chi Z, Wang L, Wang X. 2008. Influence of different sugars on pullulan production and activities of a-phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68. *Carbohydr Polym*, 73, 587-593.
28. Cheng KC, Demirci A, Catchmark JM, Puri VM. 2010. Effects of initial ammonium ion concentration on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* and its modeling. *J Food Eng*, 103, 115-122.
29. Jiang L. 2010. Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. *Carbohydr Polym*, 79, 414-417.
30. West TP, Strohfus B. 1997. Effect of manganese on polysaccharide production and cellular pigmentation in the fungus *Aureobasidium pullulans*. *World J Microbiol Biotech*, 13, 233–235.
31. Reeslev M, Jensen B. 1995. Influence of Zn²⁺ and Fe³⁺ on polysaccharide production and yeast dimorphism of *Aureobasidium pullulans* in batch cultivations. *Appl Microbiol Biot*, 42, 910–915.
32. Cheng KC, Demirci A. 2009. Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor. *Biotechnological Products and Process Engineering*, 86, 853-861.

33. Cheng KC, Demirci A, Catchmark JM. 2010. Enhanced pullulan production in a biofilm reactor by using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biot*, 37, 587-594.
34. Gaidhani HK, McNeil B, Ni X. 2005. Fermentation of pullulan using an oscillatory baffled fermenter. *Chem Eng Res Des*, 83(A6): 640-645.
35. Choudhury AR, Saluja P, Prasad GS. 2011. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*. *Carbohydr Polym*, 83: 1547-1552.
36. Ravella SR, Quiñones TS, Retter A, Heiermann TA, Hobbs PJ. 2010. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr Polym*, 82: 728-732.
37. West TP. 2010. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* cells immobilized on ECTEOA-cellulose. *Ann Microbiol*, 60: 763-766.
38. Wu S, Chen H, Jin Z, Tong Q. 2010. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *World J Microbiol Biotechnol*, 26: 737-741.
39. Ürküt Z, Dağbağlı S, Göksungur Y. 2007. Optimization of pullulan production using Ca-alginate immobilized *Aureobasidium pullulans* by response surface methodology. *J Chem Technol Biot*, 82: 837-846.
40. West TP. 2011. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* cells immobilized in chitosan beads. *Folia Microbiol*, 56: 335-338.
41. Singh RS, Singh H, Saini GK. 2009. Response surface optimization of the critical medium components for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* FB-1. *Appl Biochem Biotech*, 152: 42-53.
42. Cheng K, Demirci A, Catchmark JM, Puri VM. 2010. Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *J Food Eng*, 98: 353-359.
43. Kim Y, Lee S, Gao W, Chung C, Son C, Lee J. 2011. Application of statistical experimental design for optimization of downstream process for recovery of pullulan produced by *Aureobasidium pullulans* HP-2001. *Korean J Chem Eng*, 28: 1580-1586.
44. Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. 2009. Downstream processing and characterization of pullulan from novel colour variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1. *Carbohydr Polym* 78: 89-94.
45. Wu S, Jin Z, Kim JM, Tong Q, Chen H. 2009. Downstream processing of pullulan from fermentation broth. *Carbohydr Polym* 77: 750-753.
46. Li B, Zhang N, Peng Q, Yin T, Guan F, Wang G, Li Y. 2009. Production of pigment-free pullulan by swollen cell in *Aureobasidium pullulans* NG which cell differentiation was affected by pH and nutrition. *Appl Microbiol Biot*, 84: 293-300.
47. Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. 2010. Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase. *Carbohydr Polym*, 80, 401-407.
48. Zareian S, Khajeh K, Ranjbar B, Dabirmanesh B, Ghollasi M, Mollania N. 2010. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme Microb Tech*, 46: 57-63.
49. Göksungur Y, Baysal T, Güvenç U, Harsa Ş, Lermioğlu F, Baysal H, Ersus S, Dağbağlı S, Kandemir NS. 2008. *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretiminin optimizasyonu ve kimyasal koruyucu (antioksidan ve antimikrobiyal) içeren pullulan filmin orta nemli gıdaların raf ömrüne etkileri. TOVAG-104 O 155. Ege Üniversitesi, İzmir, 145 s.
50. Sakata Y, Otsuka M. 2009. Evaluation of relationship between molecular behaviour and mechanical strength of pullulan films. *Int J Pharm*, 374, 33-38.
51. Tong Q, Xiao Q, Lim LT. 2008. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. *Food Res Int*, 41, 1007-1014.
52. Shih FF, Daigle KW, Champagne ET. 2011. Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films. *Food Chem*, 127: 118-121.
53. Fundueanu G, Constantin M, Oanea I, Harabagiu V, Ascenzi P, Simionescu BC. 2010. Entrapment and release of drugs by a strict "on-off" mechanism in pullulan microspheres with pendant thermosensitive groups. *Biomaterials*, 31: 9544-9553.