

# Drobnoustrojowy polisacharyd — pululan, właściwości, biosynteza i zastosowanie

Edward Galas  
Łucja Tarabasz-Szymańska  
Teresa Pankiewicz  
Instytut Biochemii Technicznej  
Politechnika Łódzka  
Łódź

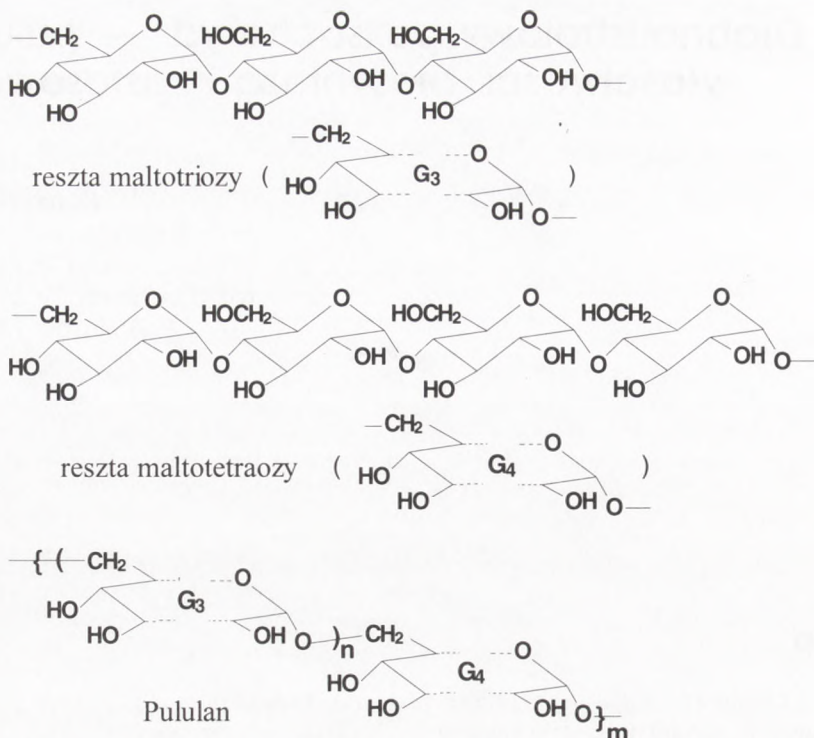
## 1. Wstęp

Stałe i ciągle rosnące zapotrzebowanie na wielocukry stymuluje poszukiwanie nowych źródeł ich otrzymania. Polisacharydy pochodzenia drobnoustrojowego, takie jak pululan, kurdlan, skleroglukan czy ksantan posiadają wiele cech, których nie mają sacharydy roślinne.

Wielorakie możliwości zastosowania tych związków w różnych gałęziach przemysłu powodują dynamiczny rozwój działu biotechnologii zajmującego się mikrobiologiczną biosyntezą wielocukrów. Jednym z nich jest pululan produkowany przez drożdże *Pullularia pullulans*. Z jego unikatowych właściwości fizykochemicznych wynikają liczne, możliwe zastosowania.

Nazwę tego polimeru zaproponowali w 1959 r. Bender i wsp. (1) dla poza-komórkowego polisacharydu wytwarzanego przez szeroko rozpowszechniony drożdżopodobny grzyb *Aureobasidium pullulans*, który obecnie częściej określa się jako *Pullularia pullulans*. Początkowo gatunek ten zaliczono do grzybów niedoskonałych (*fungi imperfecti* rodziny *Moniliales*), ostatnio jednak przyjęto, że grzyb ten należy do *Ascomycetes* rodziny *Dothideales*, mimo że jego forma doskonała nie jest dotąd znana (2).

*Pullularia pullulans* charakteryzuje się dużym polimorfizmem. Zależnie od warunków i czasu wzrostu może przyjmować różnorodne postacie morfologiczne, takie jak okrągłe formy drożdżopodobne (*yeast-like cells*), wydłużone formy mycelialne, czy też chlamydospory i blastospory. Potoczną nazwę „czarne drożdże” grzyb ten zawdzięcza produkcji ciemnych barwników melaninowych. *Pullularia pullulans* jest najbardziej rozpowszechniony w strefie umiarkowanej, gdzie występuje na powierzchni roślin i owoców, w glebie, w wodach słodkich i słonych, ściekach, jak również na żywych organizmach. Drobnoustrój ten odpowiedzialny jest m.in. za patologiczne mięknięcie tka-



Rys. 1. Struktura pululanu, z której wynika obecność zarówno dominujących reszt maltotriozyowych jak i nielicznych reszt maltotetraozowych połączonych wiązaniami  $(1\rightarrow6)$ - $\alpha$ -D-glikozydowymi.

nek roślinnych. Stwierdzono, że niektóre szczepy *P. pullulans* mogą zasiedlać skórę i inne tkanki człowieka, nie udowodniono jednak ich patogenności (2).

Poza szczepami *Pullularia pullulans*, pululan produkowany jest również przez pokrewne gatunki *P. fusca* i *P. fermentans* (3).

## 2. Budowa chemiczna i właściwości pululanu

Pululan (rys. 1) jest obojętnym poliglukanem zbudowanym z liniowych łańcuchów, składających się z reszt D-glukopiranozy, połączonych ze sobą rozmieszczonymi regularnie wiązaniami  $(1\rightarrow6)$ - $\alpha$ -D-glikozydowymi oraz  $(1\rightarrow4)$ - $\alpha$ -D-glikozydowymi. Po dwóch kolejnych wiązaniach  $\alpha(1\rightarrow4)$  następuje wiązanie  $\alpha(1\rightarrow6)$  i ta sekwencja powtarza się wielokrotnie. Innymi słowy strukturę pululanu można określić jako połączone wiązaniami  $(1\rightarrow6)$ - $\alpha$ -D-glikozydowymi jednostki maltotriozyowe. W przeprowadzonych bardziej szczegółowo badaniach wykazano, że są one czasem zastępowane resztami maltotetraozy, przez co zostaje zaburzona regularność struktury pululanu. Zawartość fragmentów maltotetraozowych może sięgać nawet 5-7% (4,5).

Molekularna struktura pululanu została szczegółowo przedyskutowana w pracy Catleya (6).

Wysuszony pululan jest bezbarwnym proszkiem bez smaku i zapachu. W normalnych warunkach atmosferycznych nie wykazuje higroskopijności. Polisacharyd ten dobrze rozpuszcza się w wodzie tworząc lepkie, obojętne roztwory trwałe nawet przy wysokich stężeniach soli (7). Wodne roztwory pululanu, podobnie jak roztwory dekstranu, mogą tworzyć dwufazowe układy z glikolem polietylenowym (PEG) (8). Stwierdzono, że wodne roztwory pululanu wykazują nienewtonowskie właściwości reologiczne, przy wyższych stężeniach roztworu obserwuje się nawet jego pseudoplastyczność (9).

Odparowując wodę z roztworów pululanu można otrzymać błony o dobrych właściwościach mechanicznych, odporne na oleje mineralne i tłuszcze. Błony takie cechują się dobrą przepuszczalnością tlenu. Stosując odparowanie termiczne roztworu pululanu pod zwiększonym ciśnieniem uzyskuje się bardzo cienkie folie polimeru o grubości rzędu nawet 10  $\mu\text{m}$ . Z roztworu pululanu można także otrzymywać włókna polisacharydu charakteryzujące się dobrymi właściwościami mechanicznymi.

Sproszkowany pululan połączony z niewielką ilością wody może być wytłaczany, dając materiał przypominający syntetyczne polimery. W ten sposób można na przykład otrzymać produkt przypominający polistyren swą twardością i wytrzymałością na rozciąganie, jednakże charakteryzujący się większą elastycznością (3,10).

Pululan nie rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, w tym w metanolu i acetonie. Rozpuszczalniki te są zatem często stosowane do wytrącania polisacharydu z roztworów wodnych. Roztwory pululanu skręcają płaszczyznę światła spolaryzowanego w prawo ( $[\alpha] = +180^\circ$  do  $190^\circ$ ). Widmo IR wykazuje silną absorpcję przy  $750\text{ cm}^{-1}$ , charakterystyczną dla reszt  $\alpha$ -D-glukopiranozylowych. Absorpcja przy  $755$  i  $955\text{ cm}^{-1}$  wynika z obecności wiązań (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D i (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glikozydowych (11,12). Widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR pululanu zostały szczegółowo opisane i zinterpretowane przez Arnosti i Repeta (13).

Masa cząsteczkowa pululanu zależy zarówno od indywidualnych cech szczepu produkującego polisacharyd, jak i od warunków oraz czasu biosyntezy (14). Waha się ona w granicach  $1,5 \cdot 10^3$  do  $8,1 \cdot 10^8$ , co odpowiada od około 100 do 5000 jednostek glukopiranozy (3).

Stwierdzono, że pululan jest odporny na działanie zasad oraz słabych kwasów. Silne kwasy hydrolizują polisacharyd rozrywając wiązania glikozydowe. Końcowym produktem takiej reakcji jest glukoza. Pululan może być też hydrolizowany enzymatycznie. Enzymem specyficznie działającym na polisacharyd jest pululanaza — pozakomórkowy enzym wytwarzany przez szczepy *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella aerogenes*), *Streptomyces flavochromogenes*, *Bacillus* sp. i inne (15,16). Enzym ten hydrolizuje wyłącznie wiązania (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glikozydowe, dając jako ostateczny produkt maltotriozę oraz niewielką ilość maltotetraozy. Inny enzym określany mianem izopululanazy lub (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-pululanazy, produkowany m.in. przez *Aspergillus niger* (17,18), hydrolizuje wyłącznie wiązania (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glikozydowe łączące w pu-

lulanie tę resztę glukozy, która w pozycji C-6 łączy się wiązaniem (1→6)- $\alpha$ -D-glikozydowym z resztą glukozy w kolejnej maltotriozie. Końcowym produktem hydrolizy pululanu przez ten enzym jest izopanoza, a także niewielkie ilości 6- $\alpha$ -maltotriozyloglukozy (4). Enzym neopululanaza rozrywa w pululanie drugie z obecnych w reszcie maltotriozonej wiązań (1→4)- $\alpha$ -D-glikozydowych (łącznie tę resztę glukozy, która w pozycji C-1 łączy się wiązaniem (1→6)- $\alpha$ -D-glikozydowym z inną jednostką maltotriozy) (19). Końcowym produktem hydrolizy pululanu z udziałem tego enzymu jest panoza. Mechanizm degradacji pululanu przez wiele bakterii obecnych w glebie i wodzie nie jest szczegółowo poznany (15,16).

Pululan ulega wielu reakcjom chemicznym typowym dla polisacharydów. Wolne grupy hydroksylowe mogą być częściowo lub całkowicie zestryfikowane bądź zeteryfikowane. Takie przekształcenia chemiczne modyfikują właściwości fizyczne pululanu, na przykład zmniejszają lub całkowicie znoszą rozpuszczalność polisacharydu w wodzie (3,10). Uwodornienie pululanu zwiększa jego odporność na wysoką temperaturę. Pululan cyjanoetylowany oprócz termoodporności charakteryzuje się także wysoką stałą dielektryczną (20).

Pululan, jak inne polisacharydy, jest materiałem palnym. Jego ciepło spalania wynosi około 16,7 kJ/g (4 kcal/g) (3). Utlenienie części grup hydroksymetylowych pululanu rozpuszczonego w wodzie do grup karboksylowych prowadzi do usieciowania cząsteczek i utworzenia jonowego hydrożelu (21,22).

Proporcję wiązań (1→6)- $\alpha$ -D i (1→4)- $\alpha$ -D-glikozydowych w polimerze można określić w oparciu na reakcji utleniania pululanu nadjodanami, oznaczając ilość zużytego nadjodanu i otrzymanego kwasu (23). Proporcję tę można również określić analizując produkt permetylowania pululanu (24).

W badaniach serologicznych stwierdzono, że pululan może wywoływać odpowiedź immunologiczną. Wykazano, że chociaż serologicznie pululan i dekstran różnią się, to ludzka surowica antydekstranowa zawiera pewną ilość przeciwciał reagujących również z pululanem (7,25).

### 3. Produkcja pululanu

Pululan może być otrzymywany zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej na drodze fermentacji z zastosowaniem szczepów *Pullularia pullulans*. Źródłem węgla w podłożach hodowlanych są najczęściej węglowodany. Opisano otrzymywanie pululanu z D-glukozy, sacharozy, D-fruktozy, maltozy, D-ksylozy, laktozy, D-galaktozy, D-arabinozy, L-ramnozy i rafinozy, a także ze zhydrolizowanego torfu (26,27). Stwierdzono, że najwyższą efektywność przekształcania źródła węgla w pululan uzyskuje się stosując sacharozę o stężeniu do 70%. Ważnymi składnikami pożywki są sole mineralne — najczęściej  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NaNO_3$ ,  $MgSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $FeSO_4$ ,  $FeCl_3$ . Zwykle stosuje się także dodatek ekstraktu drożdżowego oraz tiaminy (7,24).

Optymalną temperaturą dla biosyntezy polisacharydu jest 25-28°C. Dla uzyskania wysokiej wydajności tego procesu ważne jest także odpowiednie

pH pożywki, zwykle zawierające się w zakresie 4,5-7,5. Biosynteza pululanu zachodzi w warunkach tlenowych, zatem podłoże fermentacyjne wymaga silnego napowietrzania i wydajnego mieszania (8,28,29). Maksymalne wydajności polimeru uzyskuje się najczęściej po 48-120 godzinach hodowli, w zależności od użytego szczepu i warunków prowadzenia procesu.

Biosyntezę pululanu można prowadzić trzema zasadniczymi metodami: wsadową, wsadową z dożywianiem oraz metodą ciągłą. Pierwsza z wymienionych metod jest najprostsza, polega bowiem na jednorazowym wprowadzeniu do fermentora pożywki zawierającej komplet składników odżywczych. Druga, wymaga uzupełniania składników odżywczych w miarę zużywania ich przez drobnoustrój; dotyczy to w szczególności źródła węgla. Prowadzony w ten sposób proces pozwala uzyskać większą wydajność biosyntezy (wyrażaną w g pululanu z 1 dcm<sup>3</sup> pożywki), choć nie zawsze towarzyszy jej większa efektywność procesu (wyrażana zwykle w % masy źródła węgla przekształconego w polisacharyd). Trzecia metoda produkcji pululanu polega na ciągłym odbieraniu części płynu hodowlanego i jednoczesnym uzupełnianiu fermentora świeżą pożywką. Ta ostatnia metoda jest najbardziej perspektywiczna dla procesów prowadzonych w skali przemysłowej.

Porównując wydajność biosyntezy pululanu w pożywkach z różnymi węglowodanami Badr-Eldin i wsp. (30) stwierdzili, że najlepszym źródłem węgla jest sacharoza przed fruktozą i maltozą, natomiast najlepszym źródłem azotu jest octan amonu, przed siarczanem i cytrynianem amonu. Autorzy ci wykazali, że wysoki stosunek zawartości pierwiastków C/N w podłożu jest korzystny dla produkcji polisacharydu, ponieważ mała zawartość azotu ogranicza tworzenie biomasy, a duża zawartość węgla umożliwia efektywne przetworzenie go na pululan.

Jednym z problemów biosyntezy pululanu jest otrzymanie go w postaci nie zanieczyszczonej melaninami. Problem ten próbowano rozwiązać otrzymując mutanty *P. pullulans* nie syntetyzujące tych związków lub produkujące je w wyraźnie niższej ilości, lub w późniejszym stadium rozwoju grzyba (31). Innym rozwiązaniem może być zaproponowane przez Shabtai i Mukmeneva (32) zatrzymywanie przemian morfologicznych komórek szczepu *P. pullulans*, nie dopuszczające do wytworzenia się silnie zabarwionych chlamydospor. Autorzy twierdzą, że uzyskiwali zamierzony efekt prowadząc biosyntezę pululanu w dwóch etapach. W pierwszym stadium użyto jako źródło węgla olej sojowy, zaś źródłem azotu był kwas glutaminowy. W tych warunkach następowało namnażanie się szczepu w formie komórek drożdżopodobnych. Gdy drobnoustrój zużył niemalże w całości podstawowe składniki podłoża, do układu wprowadzano sacharozę. Przy deficycie źródła azotu, dodawany w drugim etapie cukier był wykorzystywany głównie do produkcji pululanu wolnego od barwników melaninowych, bowiem w takich warunkach następowało zahamowanie rozwoju form produkujących pigment, czyli ciemno-barwiących się chlamydospor.

Dufresne i wsp. (33) badali wpływ ciśnienia na biosyntezę pululanu. Stwierdzili, że zwiększenie tego parametru od 0,5 do 0,75 MPa powodowało wzrost wydajności produkcji zarówno polisacharydu, jak i biomasy. Przy dal-

szym zwiększaniu ciśnienia następowało jednak obniżenie ilości polimeru i biomasy grzyba, a także zmiana form morfologicznych komórek szczepu. Autorzy tłumaczą ten efekt dwojakim działaniem podwyższonego ciśnienia. Wraz z jego wzrostem zwiększa się rozpuszczalność tlenu w pożywce, co jest zjawiskiem korzystnym dla drobnoustroju, jednakże zbyt wysokie ciśnienie oddziałuje negatywnie na wiele procesów życiowych komórki, co daje efekt inhibicyjny.

#### 4. Mechanizm biosyntezy pululanu

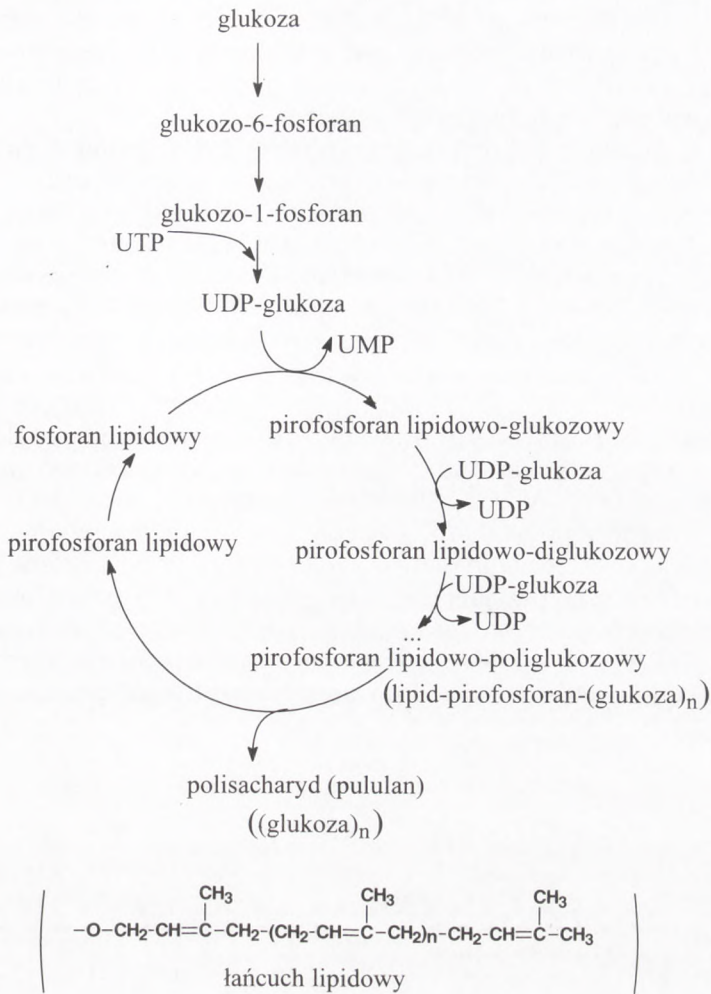
Mechanizm biosyntezy pululanu nie jest w pełni poznany. Stwierdzono m.in., że polisacharyd tylko wówczas powstaje, gdy roztwór sacharozy inkubuje się z zawiesiną komórkową lub z enzymami uzyskanymi z homogenatu komórkowego. Efektu takiego nie obserwowano podczas inkubacji sacharozy z filtратem cieczy hodowlanej (34). Obecnie przyjmuje się, że biosynteza pululanu zachodzi według schematu przedstawionego na rysunku 2 (35). Wiadomo, że glukoza zostaje najpierw przekształcona w kilku typowych reakcjach do UDPG, natomiast dalsze etapy biosyntezy nie są do końca sprezyowane.

W badaniach przeprowadzonych z użyciem protoplastów *P. pullulans* wykazano, że polimeryzacja UDPG do pululanu zachodzi prawdopodobnie w periplazmie (36), czyli zewnętrznej części błony komórkowej. Oznacza to, że nie pululan, a prawdopodobnie jego prekursor, czyli UDPG jest transportowany z cytoplazmy przez błonę komórkową. Nie można jednak zupełnie wykluczyć hipotezy, że polisacharyd jest wytwarzany wewnątrz komórki i wydzielany na jej powierzchnię w procesie egzocytozy (35).

Przyjmuje się, że UDPG reaguje z hydrofobową cząsteczką, będącą prawdopodobnie ufosforylowanym lipidem lub pirofosforanem lipidowo-cukrowym. W wyniku tej reakcji powstaje pirofosforan lipidowo-glukozowy. Łańcuch polisacharydowy takiej pochodnej w wyniku reakcji z kolejnymi cząsteczkami UDPG ulega stopniowemu wydłużaniu, a w końcu powstaje pirofosforan lipidu związany z pululanem jako resztą cukrową. Uważa się, że hydrofobowe cząsteczki, spełniające prawdopodobnie rolę przenośników pululanu przez membranę komórkową mają łańcuchy lipidowe o strukturze izoprenoidowej (rys. 2).

#### 5. Zastosowanie pululanu

Właściwości pululanu sprawiły, że znalazł on różnorodne zastosowania. Dzięki możliwości tworzenia cienkich błon, które nie przepuszczają tlenu, są nietoksyczne, bez zapachu i smaku, pululan znajduje zastosowanie do pakowania lub pokrywania żywności (3,10,37). Ze względu na odporność tego polisacharydu na enzymy trawienne człowieka, może być bezpośrednio dodawany do żywności niskokalorycznej jako składnik zastępujący skrobię. Do



Rys. 2. Schemat biosyntezy pululanu i jego transportu przez membranę komórkową.

żywności stosowany jest także dodatek pululanu modyfikowanego chemicznie poprzez kowalencyjne przyłączenie do łańcuchów polisacharydu różnych potrzebnych organizmowi związków chemicznych, np. tiaminy (38). W wyniku hydrolizy pululanu przy użyciu neopululanazy (39), można otrzymać niskokaloryczny środek słodzący, zawierający głównie panosę.

Pululan znalazł także zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako materiał służący do pokrywania i kapsułkowania leków. Stwierdzono, że w wielu przypadkach zastosowanie tego polisacharydu do takich celów jest korzystniejsze ponieważ nie wykazuje on właściwości alergizujących.

Pululan może być użyty do otrzymywania płynów zastępujących plazmę krwi. Do tych celów stosuje się wolny od pyrogenów pululan o masie czą-

steczkowej z zakresu 30-90 kDa, który rozpuszcza się do stężenia 4-10% w fizjologicznym roztworze chlorku sodu. Wykazano, że zastosowany w takiej formie polisacharyd jest po pewnym czasie metabolizowany i całkowicie usuwany z organizmu (krwiobiegu) (7,40).

Pululan może być też stosowany jako nośnik antygenów i wirusów w produkcji przeciwciał (41) i szczepionek przeciwwirusowych (42).

Zmniejszenie hydrofilowego charakteru cząsteczki pululanu i uzyskanie właściwości hydrofobowych (hydrofobizacja) można osiągnąć, np. poprzez kowalencyjne połączenie go z cholesterolem. Takie pochodne zostały wykorzystane jako przenośniki leków do określonych tkanek lub nawet komórek (43). Jako czynniki kierujące lek mogą być używane zarówno hydrożelowe cząstki polisacharydu, jak i liposomy pokryte pululanem, a czasem nawet emulsje typu olej w wodzie, stabilizowane hydrofobizowanym polisacharydem. Ten ostatni sposób kierowania leku do zmienionych patologicznie tkanek użyto w przypadku kwasu  $\alpha$ -linolenowego, stosowanego jako lek przeciwnowotworowy (44). W badaniach na zwierzętach wykazano, że liposomy pokryte „cholesterolopululanem” okazały się skuteczne w dostarczaniu do guzów mózgu leku przeciwnowotworowego będącego związkami platyny (45). Stwierdzono także, że przyłączenie dodatkowo do hydrofobizowanego pululanu specyficznych przeciwciał, zwiększa wielokrotnie skuteczność transportu leku do chorej tkanki (46). Transport interferonu do wątroby, jak się okazało, był także skuteczniejszy po przyłączeniu tego związku do pululanu (47).

## Literatura

1. Bender H., Lehman J., Wallenfels K., (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 309-316.
2. Deshpande M. S., Rale V. B., Lynch J. M., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 514-526.
3. Yuen S., (1974), *Process Biochem.*, 9, 7-9, 22.
4. Taguchi R., Kikuchi Y., Sakano Y., Kobayashi T., (1973), *Agri. Biol. Chem.*, 37, 1583-1588.
5. Catley B. J., Whelan W. J., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 138-142.
6. Catley B. J., (1974), *Pullulan synthesis by Aureobasidium pullulans*, in: *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*, Eds. Berkeley R. W. C., Godday G. W., Ellwood D. C., Academic Press, Inc., Orlando 69-84.
7. LeDuy A., Zajic J. E., Luong J. H. T., (1988), *Pullulan*, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Eds. Mark H. F., Bikales N. M., Overberger C. G., Menges G., Kroschwitz J. I., Wiley J and Sons., New York, 13, 650-660.
8. Nguyen An-lac., Grothe S., Luong A. T., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 341-346.
9. LeDuy A., Marsan A. A., Coupal B., (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 61-76.
10. Patent Can. 1 007 415 (03.29.1977), Hijiya H., Shiosaka M., to: Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.
11. Sowa W., Blackwood A. C., Adams G. A., (1963), *Can. J. Chem.*, 41, 2314-2319.
12. Bouveng H. O., Kissling H., Lindberg B., McKay J., (1963), *Acta Chem. Scand.*, 17, 1351-1356.
13. Arnosti C., Repeta D. J., (1995), *Starch/Stärke*, 2, 73-75.
14. Wallenfels K., Bender H., Keilich G., Bechtler G., (1969), *Angew. Chem.*, 73, 245-246.



15. Ueda S., Ohba R., (1972), *Agri. Biol. Chem.*, 36, 2381.
16. Yagisawa M., Kato K., Koba Y., Ueda S., (1972), *J. Ferment. Technol.*, 50, 572-579.
17. Sakano Y., Masuda N., Kobayashi T., (1971), *Agri. Biol. Chem.*, 35, 971.
18. Sakano Y., Higuchi M., Kobayashi T., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 180.
19. Kaneko H., Yanase M., Takata H., Shimada J., Handa S., Takada T., Umeyama H., Okada S., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271(29), 17321-17329.
20. Patent Fr. 2 461 718 (02.06.1981), Muto H., Suzuki H., to: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd..
21. Patent US. 4 152 170 (05.01.1979), Nagase T., Tsuji K., Fujimoto M., Masuko F., to: Sumitomo Chemical Co., Ltd. and Hauashibara Biochemical Laboratories, Inc.
22. Patent Can. 1 094 550 (01.27.1981), Fujita F., Fukami K., Fujimoto M., Nagase T., to: Sumitomo Chemical., Ltd.
23. Jackson E. L., Hudson C. S., (1937), *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 994-1003.
24. Wallenfels K., Bechtler G., Kuhn R., Trischmann H., Egge H., (1963), *Angew. Chem.*, 75, 1014-1022.
25. Patent Ger. 1 096 850 (01.12.1961), Wallenfels K., Bender H., to: Farbwerke Hoechst AG.
26. Imshenetskii A. A., Kondrateva T. F., Smutko A. N., (1981), *Mikrobiologiya*, 50(3), 471-475.
27. Boa J. M., LeDuy A., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 26-30.
28. Noel G., Choplin L., Lajoie A., Lacroix C., LeDuy A., (1984), *A Study of the Evolution of Viscoelastic Properties of Microbial Polysaccharide Fermentation Brots.*, in: *Advances in Rheology, Applications*, Eds. Mena B., Garcia-Rejon A., Rangel-Nafaile C., 4, UNAM, Mexico, 189-207.
29. Schuster R., Wenzig E., Mersmann A., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 155-158.
30. Bard-Eldin S. M., El-Tayeb O. M., El-Masry H. G., Mohamed F. H. A., Abd El-Rahman O. A., (1994), *World J. Microb. Biotechnol.*, 10, 423-426.
31. Tarabasz-Szymańska L., Galas E., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 317-320.
32. Shabtai Y., Mukmenev I., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 595-603.
33. Dufrense R., Thibault J., LeDuy A., Lencki R., (1990), *Appl. Microbiol. Technol.*, 32, 526-532.
34. Taguchi R., Sakano Y., Kikuchi Y., Sakuma M., Kobayashi T., (1973), *Agri. Biol. Chem.*, 37, 1583-1588.
35. Berry D. R., (1988), *Products of Primary Metabolic Pathways*, in: *Physiology of Industrial Fungi*, Ed. Berry D. R., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburg, 146-160.
36. Catley B. J., Hutchison A., (1981), *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 76, 451-456.
37. Patent Europ. 586 034, (09.03.1994), Ozaki Y., Namura T., Miyako T., to: Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku.
38. Patent Jap. 06 041 181 (15.02.1994), Suzuki Y., Suzuki Y., Nagamine K., Endo K., to: Takedo Shokuhin Kogyo KK.
39. Patent Jap. 05 316 992 (03.12.1993), Okad S., Kaubana I., Kuriki T., Takada H., Yanase M., to: Ezaki Glico Co.
40. Patent U.S. 4 370 472 (01.25.1983), Igarashi T., Nomura K., Naito K., Yoshida Y., to: Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.
41. Patent Fr. 2 499 414 (07.13.1982), Mitsuhashi M., Koyama S., to: Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo.
42. Patent Fr. 2, 499 412 (07.13.1982), Mitsuhashi M., Koyama S., to: Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo.
43. Sunamoto J., Akiyoshi K., Degushi S., Nishikawa T., (1996), *Hydrophobized polysaccharides (versatile functions)* in: *Polymeric Materials Encyklopedia*, Ed. Salamone J. C., CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 5, 3134-3142.
44. Fukui H., Akiyoshi K., Sato T., Sunamoto J., Yamaguchi S., Numata M., (1993), *Bioactive and Compatible Polym.*, 8, 305-309.
45. Ochi A., Shibata S., Mori K., Sato T., Sunamoto J., (1990), *DDS. Jpn.* 5, 261.

46. Hirota M., Fukushima K., Hiratani K., Kadota J., Kawano K., Oka M., Tomonaga A., Hara K., Sato T., Sunamoto J., (1988-1989), *J. Liposome Res.*, 1, 15-19.
47. Xi K.L., Tabata Y., Uno K., Yoshimoto M., Kishida T., Sokawa Y., Ikada Y., (1996), *Farmaceut. Res.*, 13(2), 1846-1850.

## **Properties, biosynthesis, and applications of microbial polysaccharide — pullulan**

### **Summary**

The review presents physical, chemical, and biochemical properties of pullulan. Moreover, recent results of studies on biosynthesis of this microbial polysaccharide are discussed. Already existing real and potential applications in many fields are listed.

### **key words:**

pullulan, microbial polysaccharide, biosynthesis.

### *Adres do korespondencji:*

Łucja Tarabasz-Szymańska, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.