Mikrobni egzopolisharidi

Ivanković, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:440534

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Luka Ivanković

Mikrobni egzopolisaharidi

Završni rad

Mentor: dr. sc. Goran Palijan, docent

Osijek, 2016. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Završni rad
Preddiplomski studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Mikrobni egzopolisaharidi

Luka Ivanković

Rad je izrađen: Odjel za biologiju, Zavod za kvantitativnu ekologiju
Mentor: dr. sc. Goran Palijan, docent

Sažetak: Mikrobni egzopolisahardi su vrsta biopolimera koju proizvode mnoge vrste gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te isto tako i drugi mikroorganzimi kao što su gljive i neke vrste algi. Vrsta su biopolimera koji su zbog svojih rasponom velikih fizikalnih i kemijskih svojstava našli široku primjenu u različitim industrijama poput farmaceutske, kozmetičke, prehrambene i drugih. Sama uloga egzopolisaharida ovisi o biotopu na kojemu se mikroorganizmi nalaze, a daljnja proizvodnja ovisi o temperaturi, intezitetu svjetla i tlaku. Najvažnije uloge egzopolisaharida su formiranje biofilma i zaštita bakterije. Dijele se na homopolisaharide i heteropolisaharide. Homopolisaharidi su izgrađeni od jedne vrste monosaharida i toj skupini polisaharida pripadaju dekstran, kurdlan, pululan i levan. Heteropolisaharidi su izgrađeni od više vrsta monosaharida. Heteropolisaharidima pripadaju ksantan i gelan guma.

Broj stranica: 16
Broj slika: 8
Broj literaturnih navoda: 51
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: Mikrobni ezgzopolisaharidi, levan, kurdlan, pululan, ksantan

Rad je pohranjen u:
knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Bachelor's thesis
Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Biology

Microbial exopolysaccharides

Luka Ivanković

Thesis performed at: Department of Biology, Sub Department of Quantitative Ecology
Supervisor: Goran Palijan, PhD, Assistant Professor

Abstract: Microbial exopolysaccharides are a type of biopolymers produced by many different species of gram-positive and gram-negative bacteria, and also by other microorganisms, such as fungi and some types of algae. They are a type of the biopolymers which, due to the wide range of physical and chemical properties, have found their use in various forms of industrial production, such as pharmaceutical industry, cosmetic industry, food industry etc. The role of EPS depends on the biotope in which micro-organisms are found, while further production depends on the temperature, light intensity and pressure. The most important role of EPS is biofilm formation and bacterial protection. They can be divided into homopolysaccharides and heteropolysaccharides. Heteropolysaccharides are made out of one type of monosaccharide and polysaccharides belonging to this group are dextran, curdlan, pullulan and levan. Heteropolysaccharides are made out of several types of monosaccharides. Heteropolysaccharides are xanthan and gellan gum.

Number of pages: 16
Number of figures: 8
Number of references: 51
Original in: Croatian

Key words: Microbial exopolysaccharides, levan, curdlan, pullulan, xanthan

Thesis deposited in:the Library of the Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in the National and University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the website of theDepartment of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 1
2.1. Mikrobni egzopolisaharidi (EPS) 1
2.2. Uloga egzoplisaharida 1
2.3. Homopolisaharidi 3
2.3.1. Levan 3
2.3.2. Kurdlan 4
2.3.3. Pululan 5
2.4. Heteropolisaharidi 6
2.4.1. Ksantan 7
2.5. Metode ekstrakcije 8
2.6. Primjena egzopolisaharida 8
2.6.1. Levan 8
2.6.2. Pululan 8
2.6.3. Kurdlan 9
2.6.4. Ksantan 10
3. ZAKLJUČAK 11
4. LITERATURA 12

1. UVOD

Mikrobni egzopolisahardi su vrsta biopolimera koju proizvode mnoge vrste gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te isto tako i drugi mikroorganzimi kao što su gljive i neke vrste algi (Sutherland 1990). Na ovu vrstu polisaharida se sve više obraća pozornost zbog širokog spektra fizikalnih i kemijskih svojstava zbog kojih je moguća njihova primjena u različitim industrijama kao što su farmaceutska ili prehrambena industrija i dr. te medicina. Unatoč zanimljivim svojstvima i širokoj primjeni, u nekim slučajevima proizvodnja i izolacija mikrobnih egzopolisaharida na industrijskoj razini još uvijek nije ekonomski prihvatljiva (Freitas i sur. 2012). Ovaj će se rad temeljiti na dosadašnjim saznanjima o proizvodnji, izolaciji, svojstvima i primjeni pojedinih egzopolisaharida s obzirom da je ovo područje relativno neistraženo.

2. OPĆI DIO

2.1. Mikrobni ezgopolisaharidi (EPS)

Polisaharidi su polimeri ugljikohidrata koji su građeni od velikog broja monosaharidnih jedinica povezanih glikozidnim vezama. Mikrobne polisaharide možemo podijeliti u intracelularne polisaharide, strukturalne polisaharide i ekstracelularne polisaharide ili egzopolisaharide što ovisi o tome nalaze li se oni unutar ili van stanice. Intracelularni polisaharidi opskrbljuju stanicu energijom, strukturalni polisaharidi izgrađuju staničnu stijenku, a mikrobni egzopolisaharidi sintetiziraju se u mikrobnim stanicama te se izlučuju u izvanstanični prostor u obliku kapsule ili EPS-a biofilma (Donot i sur. 2012). Mikrobni egzopolisaharidi imaju razne kemijske strukture i posjeduju velike molekulske mase (10 do 30 kDa) (Kumar i sur. 2007). Egzopolisaharidi se sastoje od ponavljajućih jedinica šećera pričvršćenih na lipidni nosač i mogu biti povezani s organskim i anorganskim spojevima, lipidima, proteinima i metalnim ionima (Mishra i Jha 2013), a možemo ih podijeliti na homopolisaharide i heteropolisaharide (Donot i sur. 2012).

2.2. Uloga egzopolisaharida

Fiziološka uloga egzoplisaharida ovisi o biotopu na kojem se mikroorganizmi nalaze, a proizvodnja ovisi o različitim ekološkim uvjetima kao što su temperatura, intezitet svjetla ili tlak (Tablica 1) (Dudman 1977; Otero i Vincenzini 2003). Egzopolisaharidi su sastavni dio

glikokaliska koji pomaže mikroorganizmima pri formiranju biofilma (Vu i sur. 2009). Uloge egzopolisaharida osim formiranja biofilma su i prihvaćanje na površinu, a važnu ulogu ima pri adaptaciji bakterija na različite fizičke i kemijske uvjete u okolišu. Sloj egzopolisaharida koji okružuje bakteriju posjeduje velik sadržaj vode što pridonosi zaštiti same bakterije, a osim toga anionska priroda EPS-a omogućuje zadržavanje bitnih minerala i nutrijenata (Donot i sur. 2012). Određene bakterije mogu biti otporne na surfaktante i antibiotike zbog utjecaja biofilma na biocide direktnom inaktivacijom.

Tablica 1. Optimalni uvjeti proizvodnje EPS-a (Preuzeto iz Donot i sur. 2012)

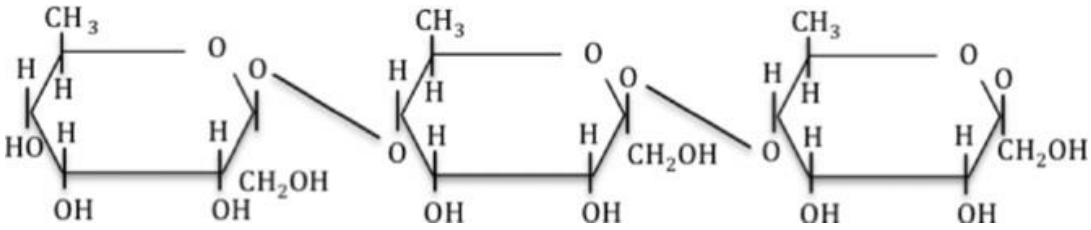
Mikrooganizam	Egzopolisaharid	Soj bakterije	Substrat	Koncentracija EPS (g/L)	Uvjeti rasta
Kvaščeve gljivice	Pululan	*Aureobasidium pullulans*	Saharoza	1,3-52,5	pH=4-4,5; 30°C; 100h
Bakterija	Celuloza	*Acetobacter xylinum*	Fruktoza/glukoza	7-23,6	pH=4-5; 30°C; 40h
Bakterija	Celuloza	*Acinetobacter sp.*	Etanol/dizel	4,7	pH=7;30°C;1 bar
Bakterija	Alginat	*Pseudomonas aerugina*	Ksiloza	0,4	30-37°C; 1 bar; 72h
Bakterija	Alginat	*Azobacter sp.*	Fruktoza/glukoza	1,1-7,5	pH=7; 35°C, 1 bar; 72h
Bakterija	Dekstran i derivati kurdlana	*Leuconostoc sp.*	Saharoza	8,17	pH=5,5; 35°C; 1 bar
Bakterija	Dekstran i derivati kurdlana	*Agrobacterium*	Glukoza/saharoza	5,02-76	pH=7,5; 30°C; 5 d
Bakterija	Gelan	*Alcaligenes faecalis*	Glukoza	30-72	pH= 7,5: 30°C; 120h
Bakterija	Gelan	*Shingomonas*	Škrob	13,2-35,7	pH=7-7,5; 30-32°C
Bakterija	Hijaluronska kiselina	*Streptococcus sp.*	Glukoza	5-10	pH=7;37°C
Bakterija	Ksantan guma	*Xanthomonas campestris*	Melasa	53	pH=7; 28°C; 1 bar; 24h
Bakterija	Levan	*Erwinia sp.*	Saharoza	15	
Bakterija	Levan	*Bacilius spp.*	Glukoza/saharoza	0,32-86,3	pH=5,6-5,8; 37°C; 1 bar; 3d
Bakterija	Levan	*Zymonas mobilis*	Saharoza	22-50	30°C; 120h

2.3. Homopolisaharidi

Homopolisaharidi su izgrađeni od jedne vrste monosaharida. Dekstran, kurdlan, pululan i levan pripadaju takvoj vrsti polisaharida.

2.3.1. Levan

Levan je visoko razgranati homopolisaharid fruktoze. Sinteza i polimerizacija levana odvija se izvan stanice bakterije preko izlučenih enzima koji pretvaraju supstrat u polimer u izvanstaničnom okruženju (Rehm 2009). Enzim levansaharaza katalizira reakciju hidrolize saharoze u levan. Levansaharaza je izvanstanični enzim kojeg sintetiziraju gram-pozitivne bakterije *Bacilius sp.* i gram-negativne bakterije *Erwinia sp.* i *Zymomonas mobilis* (Panagiotopoulos i sur. 2001). Levansaharaza se prije izlučivanja nakuplja u periplazmi gdje ujedno poprima i završnu konformaciju (Donot i sur. 2012). Sinteza levansaharoze odvija se u kiseloj okolini, a temperatura pri kojoj se sinteza odvija ovisi o soju bakterije. Inhibicija sinteze levansaharoze može biti potaknuta prisustvom glukoze i visoke temperature (Tablica 1.). Levan se sastoji od D-fruktofuranoznih jedinica povezanih β-(2-6) vezom i na mjestu grananja β-(2-1) vezom (Mishra i Jha 2013) (Slika 1).

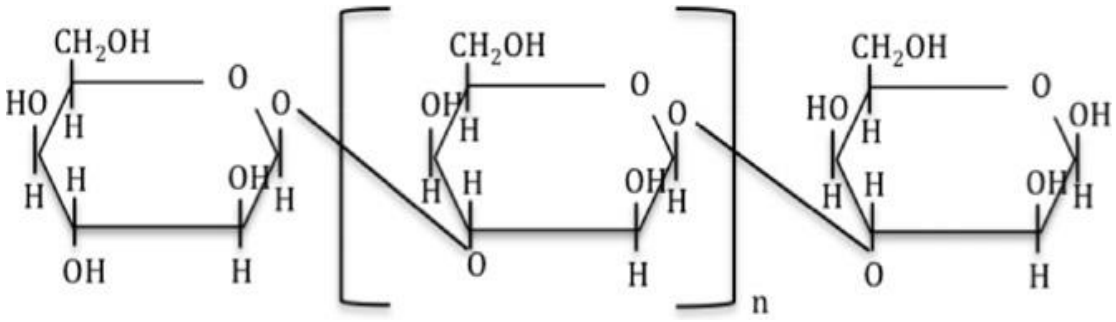


Slika 1. Kemijska struktura levana (Donot i sur. 2011)

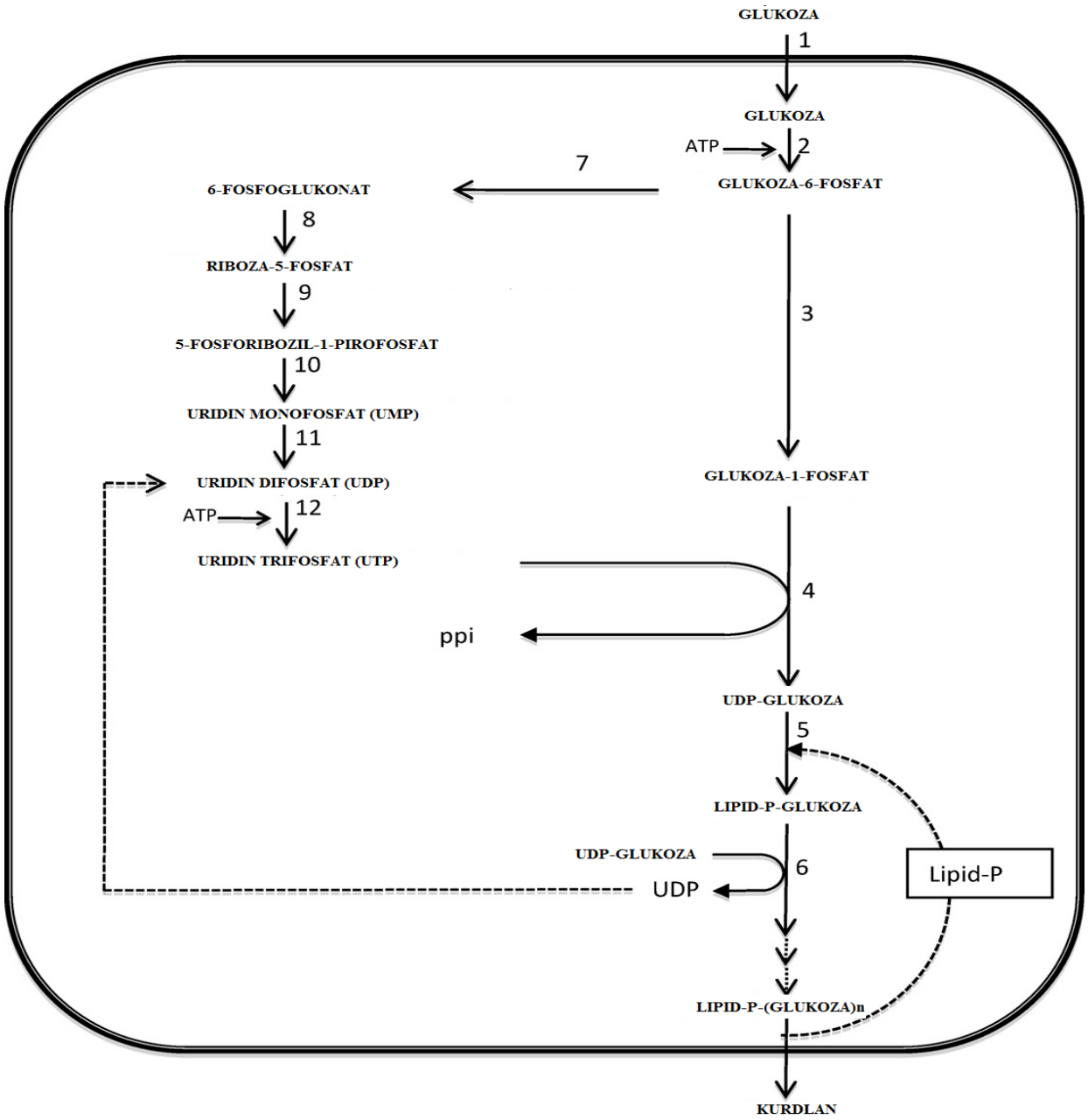
2.3.2. Kurdlan

Kurdlan je linearni homopolisaharid koji se sastoji od glukoznih jedinica povezanih β-(1-3) glikozidnim vezama (McIntosh i sur. 2005) (Slika 2). Bakterije iz kojih se kurdlan dobiva su iz roda *Agrobacterium* koje posjeduju transportere za glukozu, galaktozu, fruktozu i laktozu. Transporteri se sastoje od tri komponente: periplazmatski protein koji se veže na šećer, transmembranski proteina i ATP vežući protein koji pokreće prijenos šećera (Cornish i sur. 1988; Kemner i sur. 1997). Sinteza kurdlana započinje ulaskom glukoze pomoću aktivnih transportera u stanicu te dolazi do fosforilacije glukoze u glukoza-6-fosfat pomoću enzima heksokinaza. Nakon toga se glukoza-6-fosfat prevodi u glukoza-1-fosfat pomoću enzima fosfoglukomutaza. Tada enzim UDP-glukoza fosforilaza katalizira pretvorbu glukoze-1-fosfat i uridin trifosfata u UDP-glukozu koja je glavni prekursor kurdlana. Završni korak je prevođenje UDP-glukoze u lipid-P-glukozu pomoću enzima UDP-galaktoza-4-epimeraza te polimerizacija lipid-P-glukoze pomoću β-(1-4)-galaktoziltransferaze u kurdlan (Donot i sur. 2011) (Slika 3).

Najpovoljniji uvjeti pri kojima bakterije iz roda *Agrobacterium* proizvode najviše kurdlana su: optimalna količina nutrijenata fosfata i nitrata, pH vrijednost od 4 do 5 i temperatura 30°C (Kim i sur. 2001). Kurdlan je netopljiv u vodi, alkoholu i većini organskih otapala, ali je topljiv u dimetilsulfoksidu, formijatnoj kiselini, dimetilacetilamidu i aprotičnim otapalima (Yotsuzuka 2001).



Slika 2. Kemijska struktura kurdlana (Donot i sur. 2012)



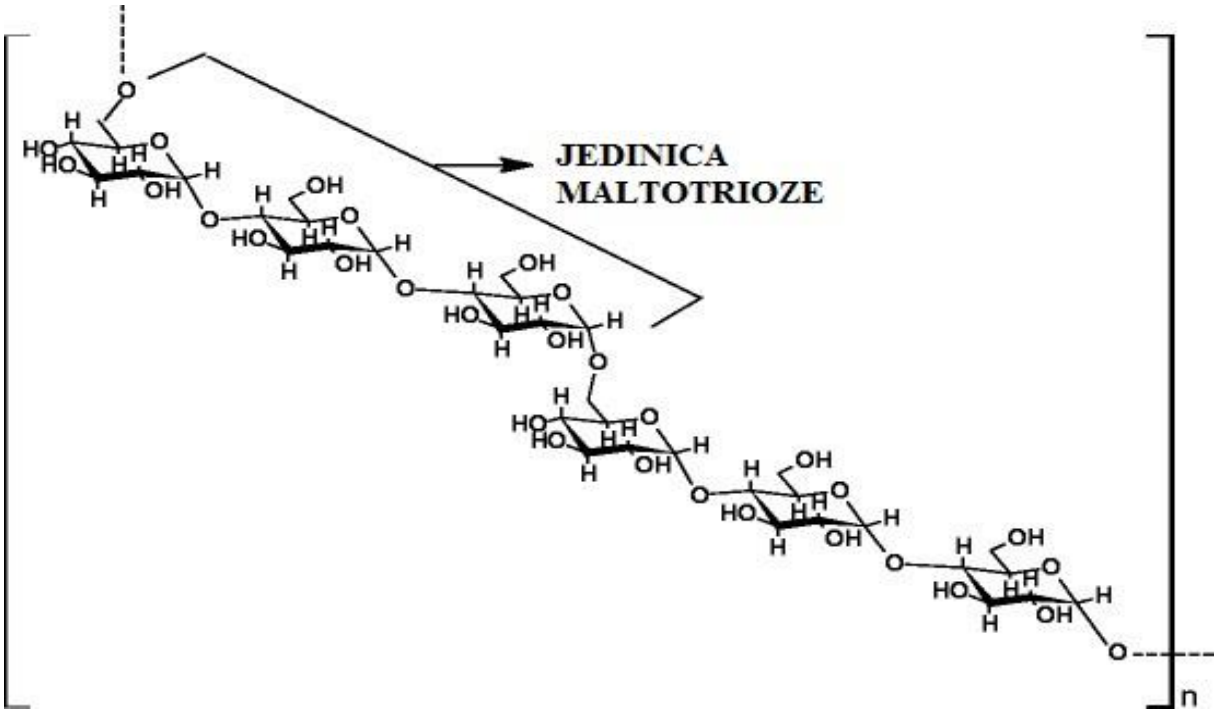
Slika 3. Put sinteze kurdlana (Donot i sur. 2011)

2.3.3. Pululan

Pululan je linearni polisaharid koji se sastoji od maltotrioznih jedinica povezanih α-(1-4) glikozidnim vezama, a maltotrioza je trisaharid čije su sastavne jedinice molekule glukoze (Chi i sur. 2009). Pululan proizvode gljivice *Aureobasidium pullulans* koje nalikuju kvaščevim gljivicama u aerobnim uvjetima (Wang i sur. 2015). *Aureobasidium pullulans* su sve prisutne gljivice izolirane iz okoliša koje su patogene za biljke (Cooke 1959). Pululan se

sintetizira u citosolu stanice te se zatim izlučuje u izvanstanično okruženje, ali enzimi koji kataliziraju polimerizaciju i izlučivanje još nisu poznati (Donot i sur. 2012).

Optimalni uvijeti za sintezu pululana su: pH u vrijednosti od 4 do 5 (Madi i sur. 1996), raspon temperatura ovisno o soju mikroorganizma varira od 24°C do 30°C (Cheng i sur. 2011). Osim toga na sintezu utječe i prisutnost određenih vitamina i minerala poput tiamina (Bender i sur. 1959), biotina, željezovog klorida, magnezijevog klorida i cinkovog klorida (West i Reed-Hamer 1992; West i Strohfus 1997). Najučinkovitiji supstrat za sintezu je saharoza, a pospješuje ju i dodatak $NaNO_3$ u medij u kojem se kultura razvija (Ravella i sur. 2010). Višak supstrata koji je ujedno i izvor ugljika negativno utječu na sintezu pululana (Kim i sur. 2000).



Slika 4. Kemijska struktura pululana (Izvor: web 1)

2.4. Heteropolisaharidi

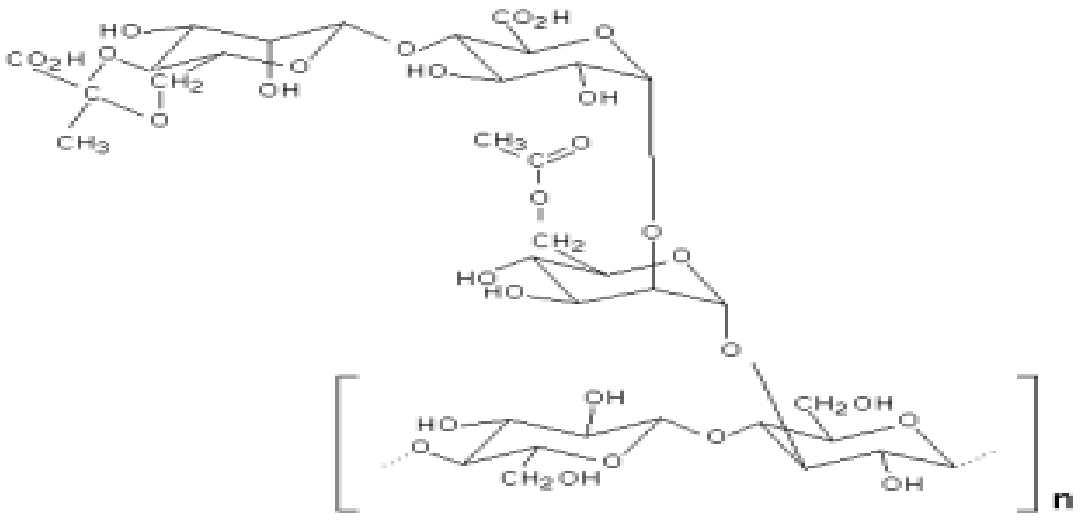
Heteropolisaharidi su izgrađeni od više vrsta monosaharida i imaju kompleksnu građu. Ksantan i gelan guma pripadaju heteropolisaharidima. Sinteza heteropolisaharida započinje

nakupljanjem jednostavnih šećera pa sastavljanjem pentasaharidnih podjedinica pričvršćenih na lipidni nosač i zatim slijedi polimerizaija i izlučivanje polisaharida (Whitfield i sur. 1993).

2.4.1. Ksantan

Ksantan je prvi industrijski sintetiziran polimer koji je ujedno i najbolje istražen (Rosalam i England 2006). Sastoji se od glukozne okosnice na koju je vezan trisaharid koji sadrži glukonsku kiselinu, manozu, piruvat i acetilne ostatke, a sintetiziran je i izlučen iz bakterija roda *Xanthomonas* (Freitas i sur. 2011). Sinteza ponavljajućih jedinica počinje prijenosom glukozil-1-fosfata iz UDP-glukoze u poliizoprenofosfat kao lipidni transporter što je popraćeno izlučivanjem raznih ostataka šećera kako bi se formirala cijela ponavljajuća jedinica (Becker i sur. 1998). Ostaci acetila i piruvata su tada povezani u lipidno povezani pentasaharid. Za svaki od ovih koraka nužan je supstrat poput glukoze i manoze, a uz njega i odgovarajući enzimi polimeraza i transferaza koji su karakteristični za sintezu ksantana (Leigh i Coplin 1992). U slučaju da izostane bilo supstrat potreban za određeni korak bilo enzim, sinteza se obustavlja.

Optimalni uvjeti za sintezu ksantana su temperatura koja varira izmedu 30°C i 33°C, neutralan pH u vrijednosti od 6 do 8, a kao izvor ugljika koristi se glukoza ili saharoza s dodatkom nitrata u formi glutamata (Garcia-Ochoa i sur. 2000). Za sintezu ksantana potrebna je dodatna aeracija (Rehm 2009).



Slika 5. Kemijska struktura ksantana (Izvor: web 2)

2.5. Metode ekstrakcije

Jedan od postupaka kojim se vrši ekstrakcija polisaharida iz tekuće kulture (bujona) je uklanjanje mikroorganizama pomoću centrifugiranja i filtracije. Drugi postupak je taloženje polimera iz supernatanta dodavanjem taložnih sredstava (metanol, etanol, izopropanol, aceton) u kojima se polimer može otopiti i treći postupak obuhvaća isušivanje istaloženog polimera (Freitas i sur. 2012). Problem pri ekstrakciji je pojava spojeva niske molekulske mase koji nastaju ili se dodaju za vrijeme ekstrakcije, a na kraju završavaju kao nečistoće (ostaci stanica, soli i proteini) (Kumar i sur. 2007). Upravo zbog pojave nečistoća polimer je potrebno podvrgnuti ponovnom taloženju iz razrijeđene vodene otopine u kojoj se polimer nalazi, kemijskoj deprotonizaciji (Ayala-Herna´ndez i sur. 2008) ili enzimatskim metodama. Metode, iako pravilno provedene u nekim slučajevima mogu uzrokovati promjenu kemijske strukture polimera i time naštetiti krajnjem produktu (Freitas i sur. 2012).

2.6. Primjena egzopolisaharida

2.6.1. Levan

Levan ima široku primjenu te se koristi u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Prah je bijele boje, bez mirisa i okusa, nehigroskopan, slabo topljiv u vodi. U prehrambenoj industriji se koristi kao dodatak prehrani jer potiče obnovu crijevne mikroflore. U kozmetičkoj industriji služi kao dodatak kozmetičkim preparatima koji smanjuju iritaciju i vlaže kožu, a potiče i obnovu stanica kože. Levan se može primjeniti kao materijal za izradu ovojnice pri izradi lijekova (Rehm 2009).

2.6.2. Pululan

Pululan se u prehrambenoj industriji koristi u proizvodnji biorazgradivih slojeva, zamjena za škrob u dijetalnoj prehrani i dodatak u prehrani kao prebiotičko sredstvo. U slojeve načinjene od pululana mogu se dodati razne boje, okusi pa čak i lizozimi zbog kojih film ima antimikrobno djelovanje (Cheng i sur. 2011; Kandemir i sur. 2005; Oku i sur. 1979; Yuen 1974). U farmaceutskoj industriji pululan ima široku primjenu u proizvodnji kapsula jer nema mutagena ni kancerogena svojstva (Kimoto i sur. 1997). Također se koristi i kao zamjena

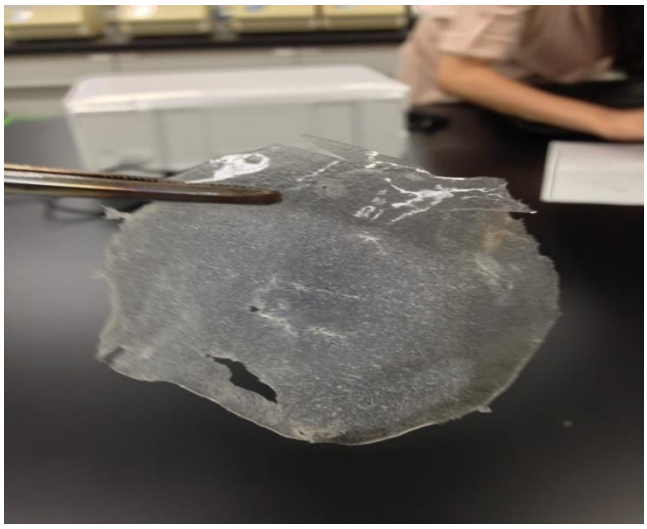
krvne plazme jer su znanstvenici uspjeli razviti anionsku modifikaciju pululana (Shingel i Petrov 2002). Sojevi bakterija koje proizvode pululan mogu se koristiti u remedijaciji okoliša jer uklanjaju teške metale (Cheng i sur. 2011)



Slika 6. Kapsula od pululana (Izvor: web 3)

2.6.3. Kurdlan

Kurdlan je polisaharid bez boje, okusa i mirisa. U prehrambenoj industriji koristi se kao sredstvo za želiranje i kao prirodni zgušnjivač (Slika 7.). Zanimljivo svojstvo kurdlana je to što može s obzirom na različite uvjete zagrijavanja te koncetracije dodanog kurdlana poprimiti i različita fizikalna svojstva gela kojeg formira. Upravo zbog svojih odličnih fizikalnih svojstava u formi gela koja mu omogućuju kontrolirano otpuštanje aktivnih supstanci lijekova našao je svoju upotrebu i u farmaceutskoj industriji (McIntosh i sur. 2005).



Slika 7. Kurdlan u formi gela (Izvor: web 4)

2.6.4. Ksantan

Europska unija je 1980. godine odobrila korištenje ksantana u prehrambenoj industriji pod brojem E415. Otopine niske koncentracije ksantana jako su viskozne. Ksantan je termostabilan i podnosi velike razlike u pH (Kierulf i Sutherland 1988). Zbog tih svojstava izrazito je stabilan pa se koristi kao stabilizator, emulgator i zgušnjivač u prehrambenoj industriji, ali isto tako i drugim industrijama u proizvodnji boja, pesticida, detergenata te u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Becker i sur. 1998).



Slika 8. Ksantan u obliku praha (Izvor: web 5)

3. ZAKLJUČAK

Mikrobni egzopolisahardi su vrsta biopolimera koju proizvode mnoge vrste gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te isto tako i drugi mikroorganzimi kao što su gljive i neke vrste algi. Vrsta su biopolimera koji su zbog svojih rasponom velikih fizikalnih i kemijskih svojstava našli široku primjenu u različitim industrijama poput farmaceutske, prehrambene, kozmetičke i drugih te medicine. Znanstvenici pokušavaju optimizirati proizvodnju EPS-a odabirom soja bakterije te djelovanjem na razne uvjete kao što su temperatura, tlak, pH i odabir supstrata kako bi u kraćem vremenu proizveli što više egzopolisaharida. Najvažnije uloge egzopolisaharida za mikroorganizme su formiranje biofilma i zaštita bakterije. Dijelimo ih na homopolisaharide (kurdlan, pululan i levan) i heteropolisaharide (ksantan i gelan). Ekstrakcija polisaharida iz tekuće kulture bujona može se vršiti pomoću centrifugiranja i filtracije, taloženjem polimera iz supernatana dodavanjem taložnih sredstava ili pomoću isušivanja istaloženog polimera. Proizvodnja većine egzopolisaharida još uvijek nije dovedena na industrijsku razinu jer su metode proizvodnje i ekstrakcije još uvijek skupe, ali zbog široke primjene ezgopolisaharida znanstvenici sve više provode istraživanja na tom području.

4. LITERATURA

Ayala-Herna´ndez I, Hassan A, Goff HD, Mira de Orduña R, Corredig M. 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. *Int Dairy J* 18:1109–1118.

Becker A, Katzen F, Puhler A, Ielpi L. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:145–152.

Bender H, Lehman J, Wallenfels K. 1959. Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*. *Biochim Biophys Acta* 36:310–317.

Cheng K, Demirci A, Catchmark JM. 2011. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:29.

Chi Z, Wang F, Chi Z, Yue L, Liu G, Zhang T. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:793–804.

Cooke WB 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Mycopathol Mycol Appl* 12:1–45.

Cornish A, Greenwood JA, Jones CW 1988. Binding-protein-dependent glucose transport by Agrobacterium radiobactergrown in glucose-limited continuous culture. *J Gen Microbiol* 134:3099–3110.

Donot F, Fontana A, Baccou JC, Schorr-Galindo S. 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr Polym* 87:951-962.

Dudman, W. F. (1977). The role of surface polysaccharides in natural environments. In I. W. Sutherland (Ed.), Surface carbohydrates of the prokaryotic cell (pp. 357–454). London: Academic Press.

Freitas F, Alves VD, Reis MAM. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol* 29:388-398.

Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E. 2000. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnol Adv* 18:549–579.

Kandemir N, Yemenicioglu A, Mecitoglu C, Elmaci ZS, Arslanoglu A, Goksungur Y, Baysal T. 2005. Production of antimicrobial films by incorporation of partially purified lysozyme into biodegradable films of crude exopolysaccharides obtained from *Aureobasidium pullulans* fermentation. *Food Technol Biotechnol* 43:343–350.

Kemner JM, Liang X, Nester EW .1997. The Agrobacteriumtumefaciens virulence gene chvE is part of a putative ABC-typesugar transport operon. *J Bacteriol* 179:2452–2458.

Kierulf C, Sutherland IW. 1988. Thermal stability of xanthan preparations. *Carbohydr Polym* 9:185-194.

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.

Kim DY, Jung SB, Choi GG, Kim YB, Rhee YH. 2001. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolyester containing cyclohexyl groups by Pseudomonas oleovorans. *Int J Biol Macromolec* 29:145–150.

Kim JH, Kim MR, Lee JH, Lee JW, Kim SK 2000. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* using glucosamine. *Biotechnol Lett* 22:987–990.

Kumar AS, Mody K, Jha B. 2007. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J Basic Microbiol* 47:103–117.

Leigh JA, Coplin DL. 1992. Exopolysaccharides in plant–bacterial interactions. *Annu Rev Microbiol* 46:1048–1054.

Madi NS, Harvey LM, Mehlert A, McNeil B (1997a) Synthesis of two distinct exopolysaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr Polym* 32:307–314.

Mcintosh M, Stone BA, Stanisich VA. 2005. Curdlan and other bacterial (1→3)-β-D-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:163-73.

Mishra A, Jha B. 2013. Microbial Exopolysacchrides. In: Rosenberg E, DeLong EF, Thompson F, Lory S, Stackebrandt E (Eds.), The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology, 4th ed. Springer Berlin Heidelberg, pp. 179–192.

Oku T, Yamada K, Hosoya N. 1979. Effect of pullulan and cellulose on the gastrointestinal tract of rats. *Nutr Food Sci* 32:235–241.

Otero A, Vincenzini M. 2003. Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity. *J Biotechnol* 102:143–152.

Panagiotopoulos C, Sempere R, Lafont R, Kerherve P. 2001. Sub-ambient temperature effects on the separation of monosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection: Application to marine chemistry. *J Chromatogr* A 920:13–22.

Rehm BHA. 2009. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives, vol. 1 New Zeland:Caister Academic Press

Rosalam S. England R. 2006. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestris sp. Enzyme Microb Technol* 39:197–207.

Shingel KI, Petrov PT. 2002. Behavior of γ-ray-irradiated pullulan in aqueous solutions of cationic (cetyltrimethylammonium hydroxide) and anionic (sodium dodecyl sulfate) surfactants. *Colloid Polym Sci* 280:176–182.

Sutherland IW. 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr Polym* 38:319-328.

Yotsuzuka F. 2001. Curdlan. In: Cho SS, Dreher ML (eds) Handbook of dietary fiber. Dekker, New York, pp 737–757.

Yuen S. 1974. Pullulan and its applications. *Process Biochem* 9:7–9.

Yotsuzuka F (2001) Curdlan. In: Cho SS, Dreher ML (eds) Handbook of dietary fiber. Dekker, New York, pp 737–75.

Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. 2009. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* 14:2535-2554.

Wang D, Chen F, Wei G, Jiang M, Dong M. 2015. The mechanism of improved pullulan production by nitrogen limitation in batch culture of *Aureobasidium pullulans. Carbohydr Polym* 127:325-331.

West TP, Reesd-Hamer B. 1992. Influence of vitamins and mineral salts upon pullulan synthesis of *Aureobasidium pullulans*. *Microbios* 71:115–123.

West TP, Strohfus B. 1997. Effect of manganese on polysaccharides production and cellular pigmentation in the fungus *Aureobasidium pullulans*. *World J* Microbiol Biotechnol 13:233–235.

Whitfield C, Valvano MA, Rose AH. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. Advances in microbial physiology. Academic Press. pp. 135–246.

Web izvori:

Web1

https://www.researchgate.net/publication/278722442_Biosynthesis_of_Pullulan_and_Its_Applications_in_Food_and_Pharmaceutical_Industry 16.9.2016.

Web 2

http://www.cybercolloids.net/information/technical-articles/introduction-xanthan-structure 16.9.2016.

Web 3

https://www.linkedin.com/pulse/pullulan-new-trend-non-gelatin-capsule-thin-film-abernutra-daisy 21.9.2016.

Web 4

http://2013.igem.org/Team:Biwako_Nagahama/Project 22.9.2016.

Web 5

http://www.hlpa4.com/xanthan-gum-powder.htm 22.9.2016.