

Spis treści

1. Wstęp	9
2. Przegląd literatury	12
2.1. Charakterystyka pullulanu	12
2.1.1. Właściwości chemiczne pullulanu	12
2.1.2. Właściwości fizyczne pullulanu	14
2.1.3. Mechanizm biosyntezy pullulanu	14
2.1.4. Produkcja pullulanu na skalę techniczną	16
2.1.5. Bezpieczeństwo zdrowotne pullulanu	16
2.1.6. Zastosowanie pullulanu	17
2.2. Charakterystyka <i>Aureobasidium pullulans</i>	19
2.2.1. Występowanie <i>A. pullulans</i>	19
2.2.2. Morfologia <i>A. pullulans</i>	20
2.2.3. Fizjologia <i>A. pullulans</i>	21
2.3. Wpływ czynników hodowlanych na syntezę pullulanu	23
2.3.1. Źródła węgla i azotu	23
2.3.2. Kwasowość, temperatura i napowietrzenie środowiska	25
2.4. Doskonalenie szczepów <i>Aureobasidium pullulans</i> w produkcji pullulanu	26
3. Uzasadnienie podjęcia tematu badań i cel pracy	29
4. Metodyka pracy	31
4.1. Organizacja badań	31
4.1.1. Materiał badawczy i jego przygotowanie	31
4.1.2. Metody mutagenizacyjne	32
4.2. Metodyka badań aktywności produkcji pullulanu wybranych szczepów <i>A. pullulans</i> w różnych warunkach hodowlanych	35
4.2.1. Materiał biologiczny	35
4.2.2. Przygotowanie inoculum	35
4.2.3. Podłoża	35
4.2.4. Hodowla kontrolna	36
4.2.5. Badanie wpływu stężenia sacharozy na produkcję pullulanu	36
4.2.6. Badanie wpływu źródła azotu na produkcję pullulanu	36

4.2.7.	Badanie wpływu pH na produkcję pullulanu	36
4.2.8.	Badanie wpływu temperatury na produkcję pullulanu	37
4.2.9.	Badanie wpływu napowietrzania na produkcję pullulanu	37
4.2.10.	Badanie wpływu dodatku oleju sojowego na produkcję pullulanu	37
4.3.	Metodyka badań preparatu pullulanowego oraz metoda jego oczyszczania	37
4.3.1.	Metodyka badań surowego preparatu pullulanowego	37
4.3.2.	Metoda oczyszczania preparatu pullulanowego	38
4.3.3.	Metodyka badań oczyszczonego preparatu pullulanowego	40
4.4.	Metodyka badań cech morfologicznych szczepu rodzicielskiego <i>A. pullulans</i> A.p.-3 i mutantu B-1	40
4.5.	Metodyka badań genetycznych szczepów <i>A. pullulans</i>	41
4.5.1.	Obserwacja materiału genetycznego w komórkach	41
4.5.2.	Usunięcie ściany komórkowej	41
4.5.3.	Izolacja genomowego DNA	42
4.5.4.	Genotypowanie szczepów techniką PCR fingerprinting	42
4.5.5.	Badanie zdolności asymilacji substratów węglowych	43
4.5.6.	Przygotowanie protoplastów mutantu Mx-3	43
4.5.7.	Transformacja protoplastów mutantu Mx-3 genomowym DNA mutantu Dy-17	43
4.5.8.	Metody analityczne	44
4.6.	Metody statystyczne	44
5.	Wyniki, ich omówienie i dyskusja	46
5.1.	Badania nad mutagenizacją szczepu <i>A. pullulans</i> A.p.-3	46
5.1.1.	Badania podatności szczepu <i>A. pullulans</i> A.p.-3 na mutagenizację spontaniczną	46
5.1.2.	Wyznaczenie parametrów mutagenizacji szczepu <i>A. pullulans</i> A.p.-3	47
5.1.3.	Izolacja mutantów	49
5.1.4.	Wybór mutantów do dalszych badań	53
5.2.	Ocena aktywności mutantów <i>A. pullulans</i> w produkcji pullulanu w różnych warunkach hodowlanych	54
5.2.1.	Ocena aktywności białego mutantu <i>A. pullulans</i> B-1 w produkcji pullulanu	54
5.2.2.	Ocena aktywności wysoko wydajnego mutantu <i>A. pullulans</i> Dy-17 w produkcji pullulanu	57
5.2.3.	Ocena aktywności wysoko wydajnego mutantu <i>A. pullulans</i> Du-17 w produkcji pullulanu	59
5.3.	Badania nad uzyskaniem pullulanu w formie oczyszczonej	61
5.3.1.	Skład chemiczny surowych preparatów pullulanowych	61
5.3.2.	Charakterystyka pullulanu otrzymanego ze szczepu rodzicielskiego <i>A. pullulans</i> A.p.-3 i wybranych mutantów	70
5.4.	Porównanie cech morfologicznych mutantu B-1 ze szczepem rodzicielskim A.p.-3	74
5.4.1.	Morfologia kolonii i komórek mutantu B-1	74

5.4.2.	Morfologia kolonii i komórek szczepu rodzicielskiego <i>A. pullulans</i> A.p.-3	75
5.4.3.	Wielkość komórek mutantu <i>A. pullulans</i> B-1 i szczepu rodzicielskiego <i>A. pullulans</i> A.p.-3	78
5.4.4.	Obserwacje form morfologicznych mutantu <i>A. pullulans</i> B-1 i szczepu rodzicielskiego <i>A. pullulans</i> A.p.-3 w mikroskopie skaningowym	79
5.4.5.	Obserwacje ultrastruktur komórkowych mutantu <i>A. pullulans</i> B-1 i szczepu rodzicielskiego <i>A. pullulans</i> A.p.-3 w mikroskopie transmisyjnym	84
5.5.	Badania genetyczne szczepu rodzicielskiego <i>A. pullulans</i> A.p.-3 i wybranych mutantów	95
5.5.1.	Obserwacje materiału genetycznego wybranych mutantów w świetle ultrafioletowym	96
5.5.2.	Opracowanie optymalnej metody usuwania ściany komórkowej badanego szczepu <i>A. pullulans</i>	99
5.5.3.	Porównanie wielkości DNA uzyskanego ze szczepów <i>A. pullulans</i>	99
5.5.4.	Genotypowanie za pomocą techniki PCR fingerprinting	100
5.5.5.	Transformacja protoplastów mutantu <i>A. pullulans</i> Mx-3 genomowym DNA ze szczepu <i>A. pullulans</i> Dy-17	102
6.	Podsumowanie i wnioski	108
	Literatura	113
	Podsumowanie	123
	Summary	125