

Исследование продуцирования экзополисахаридов молочнокислыми бактериями, применяемыми в хлебопекарной промышленности, и сравнение методов их определения

В.В. Мартиросян¹, М.Н. Костюченко¹, М.В. Рейнов¹, О.Е. Тюрина¹, О.А. Савкина²

¹ Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности, г. Москва, Российская Федерация

² Санкт-Петербургский филиал ФГАНУ НИИ хлебопекарной промышленности, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Экзопполисахариды представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из остатков моносахаридов и их производных, обладающие биологической активностью и выполняющие протекторную роль в физиологических процессах. Поиск штаммов молочнокислых бактерий, продуцирующих экзополисахариды, является перспективным направлением исследования за счет доказанного положительного влияния их на реологические свойства ферментированных пищевых продуктов, а также здоровье человека.

Цель: Провести исследование способности штаммов молочнокислых бактерий из коллекции Федерального государственного автономного научного учреждения «Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности» (далее ФГАНУ НИИХП) продуцировать экзополисахариды, а также проведение сравнения различных методов их определения – гравиметрического, фенол-серноокислого по Дюбуа, метода с применением антронового реактива и титриметрического по Бертрану.

Материалы и методы: Для определения способности продуцировать экзополисахариды культуры молочнокислых бактерий культивировали на 12 % солодовом сусле в течение 48 ч при оптимальной для каждого штамма температуре. После удаления белка и проведения диализа в культуральной жидкости определяли количество экзополисахаридов различными методами.

Результаты: Установлено, что все коллекционные штаммы образовывали экзополисахариды в разном количестве. Определены штаммы, продуцирующие наибольшее количество экзополисахаридов — *L. amilolyticus*-2, *L. plantarum* A-63(d), *L. amilolyticus* -1, *L. brevis*-78(d), *L. paracasei*-6. Выход продукта, содержащего экзополисахариды, продуцентами которых являлись молочнокислые бактерии, находился в пределах от 7 до 14,4 мг в 1 мл культуральной жидкости. Результаты исследования позволили сделать вывод о корректности метода Дюбуа для оценки содержания применительно к экзополисахаридам, продуцируемым молочнокислыми бактериями.

Выводы: Проведенные исследования подтверждают способность штаммов молочнокислых бактерий из коллекции ФГАНУ НИИХП продуцировать экзополисахариды. Установлена корректность метода по Дюбуа для определения экзополисахаридов, продуцируемых молочнокислыми бактериями.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии; экзополисахариды; фенол-серноокислый метод по Дюбуа; антроновый реактив; титриметрический метод по Бертрану

Корреспонденция:
Владимир Владимирович
Мартиросян,
E-mail: info@gosniihp.ru

Конфликт интересов:
авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 12.04.2024
Принята: 16.12.2024
Опубликована: 27.12.2024

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Мартиросян, В. В., Костюченко, М. Н., Рейнов, М. В., Тюрина, О. Е., & Савкина, О. А. (2024). Исследование продуцирования экзополисахаридов молочнокислыми бактериями, применяемыми в хлебопекарной промышленности, и сравнение методов их определения. *FOOD METAENGINEERING*, 2(4), 12–25. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.4.67>

Study of Exopolysaccharide Production by Lactic Acid Bacteria used in the Baking Industry and Comparison of Methods for Their Determination

Vladimir V. Martirosyan¹, Marina N. Kostyuchenko¹, Mikhail V. Reynov¹, Olga E. Tyurina¹, Olesia A. Savkina²

¹ Scientific Research Institute for the Baking Industry, Moscow, Russian Federation

² Saint-Peterburg Branch of «Scientific Research Institute for the Baking Industry», Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Exopolysaccharides are high molecular weight compounds consisting of monosaccharide residues and their derivatives, which have biological activity and play a protective role in physiological processes. The search for strains of lactic acid bacteria producing exopolysaccharides is a promising area of research due to their proven positive effect on the rheological properties of fermented food products, as well as human health.

Purpose: To study the ability of lactic acid bacteria strains from the collection of FGANU NIIHP to produce exopolysaccharides, as well as to compare different methods of their determination — gravimetric, phenol-sulfuric acid Dubois method, anthrone reagent method and titrimetric Bertrand method.

Materials and Methods: To determine the ability to produce exopolysaccharides, cultures of lactic acid bacteria were cultured on 12% malt mash for 48 hours at the optimum temperature for each strain. After protein removal and dialysis, the amount of exopolysaccharides was determined in the culture fluid by different methods.

Results: It was found that all the collection strains formed exopolysaccharides in different amounts. The strains producing the highest amount of exopolysaccharides were identified as *L. amilolyticus*-2, *L. plantarum*A-63(d), *L. amilolyticus*-1, *L. brevis*-78(d), *L. paracasei*-6. The yield of the product containing exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria ranged from 7 to 14.4 mg in 1 ml of culture liquid. The results of the study allowed us to conclude the correctness of Dubois method for estimating the content with respect to exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria.

Conclusion: The conducted studies confirm the ability of strains of lactic acid bacteria, from the collection of FGANU NIIHP, to produce exopolysaccharides. The correctness of the Dubois method for the determination of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria was established.

Keywords: Lactic acid bacteria; exopolysaccharides; Dubois phenol-sulfuric acid method; anthrone reagent; Bertrand titrimetric method

Correspondence:

Vladimir V. Martirosyan,
E-mail: info@gosniihp.ru

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 12.04.2024

Accepted: 16.12.2024

Published: 27.12.2024

Copyright: © 2024 The Authors



To cite: Martirosyan, V. V., Kostyuchenko, M. N., Reynov, M. V., Tyurina, O. E., & Savkina, O. A. (2024). Study of exopolysaccharide production by lactic acid bacteria used in the baking industry and comparison of methods for their determination. *FOOD METAENGINEERING*, 2(4), 12–25. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.4.67>

ВВЕДЕНИЕ

В последние два десятилетия большое внимание уделяется исследованиям способности микроорганизмов синтезировать экзополисахариды (ЭПС) — высокополимерные соединения, состоящие из остатков моносахаридов и их производных, продуцируемые растениями, водорослями, грибами и бактериями. Микробные внеклеточные ЭПС представляют собой полисахариды, которые ассоциированы или связаны с поверхностью клетки, образуя капсулу, или выделяются наружу в виде слизи. Интерес к ЭПС, синтезированным молочнокислыми бактериями (МКБ), обусловлен тем, что на международном уровне их продуцентам, присвоен статус безопасности — GRAS (generally recognized as safe), подтверждающий возможность применения этих организмов в производстве безопасных пищевых продуктов. Наиболее часто используются для производства ЭПС штаммы МКБ, таких родов как *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и *Weissellale*. *Lactobacillus*, признанные безопасными микроорганизмами, также способны создавать ЭПС с множеством различных структур без какого-либо риска для здоровья (Korcz, 2021; Nguyen, 2020; Oleksy-Sobczak, 2020). Экзопполисахариды, продуцируемые МКБ, проявляют противоопухолевую, противовоспалительную, антиоксидантную, иммуностимулирующую активности, способствуют снижению уровня холестерина в крови человека. Молочнокислые бактерии продуцируют различные функциональные олигосахариды, имеющие большое промышленное значение в качестве пребиотиков, нутрицевтиков, подсластителей, иммуностимуляторов (Jurášková, 2022; Kim, 2010; Patel, 2012). В технологии пищевых продуктов ЭПС могут быть использованы в качестве натуральных биоагустителей, стабилизаторов, эмульгаторов, желеобразующих агентов, так и выступать в роли факторов адгезии полезных микроорганизмов на стенках кишечника. Преимущества использования штаммов лактобактерий, синтезирующих ЭПС *in situ*, состоят в увеличении продолжительности холодильного хранения, уменьшении синерезиса, улучшении текстуры и реологических характеристик ферментированных молочных продуктов (Daba 2021; Dilna, 2015; Jurášková, 2022; Nguyen, 2020; Prete, 2021). Новым направлением применения ЭПС является использование их в качестве биофлокулянтов, биопоглочителей, средств для выведения тяжелых металлов из организма, средств доставки лекарств (Zajsek, 2013).

Большое значение имеет использование ЭПС в хлебопечении. Так эффективным способом повышения качества хлеба из муки пшеничной с пониженным содержанием клейковины является применение в качестве улучшителей гидрофильных добавок различного происхождения, в том числе микробных полисахаридов. ЭПС действует как гидроколлоид, улучшающий качество пшеничного хлеба с высоким содержанием клетчатки (Katina, 2009).

Различные экзополисахариды, продуцируемые *Leuconostoc mesenteroides*, положительно влияют на реологию теста, текстуру хлеба и позволяют снизить добавки гидроколлоидов при производстве безглютеновых изделий (Das, 2015; Galle 2010; Moroni, 2011). Полимеры, продуцируемые *L. mesenteroides*, *W. confusa*, *W. cibaria* и *Pediococcus parvulus*, улучшают реологические свойства, текстуру, восприятие вкуса у ферментированных продуктов, в том числе пшеничного хлеба (Kavitate, 2016). В ряде исследований было показано, что применение таких ЭПС как декстран, продуцируемый *Leuconostoc mesenteroides* и *Weissella cibaria*), леван *L. sanfranciscensis*, рейтеран *L. reuteri*, положительно влияет на реологию теста, текстуру хлеба и может заменить или сократить использование гидроколлоидов в пшеничном и безглютеновом хлебе (Zarour, 2017; Galle 2010; Moroni, 2011; Rhmkorf, 2012).

Закваска на основе молочнокислых бактерий и дрожжей играет важную роль в технологии хлеба. Основной функцией МКБ являются подкисление теста, а также образование веществ, участвующих в формировании вкуса и аромата хлеба (Локачук, 2023). Особая метаболическая активность, такая как синтез ЭПС, также может иметь большое значение при производстве хлеба, поскольку, несмотря на многие полезные свойства ЭПС, продуцируемых бактериями рода *Lactobacillus*, процесс их получения делает их нерентабельным из-за низкой эффективности их синтеза и высоких технологических затрат. В связи с этим перспективным представляется разработка и использование полуфабрикатов с направленным культивированием ЭПС-продуцирующих штаммов молочнокислых бактерий.

Актуальным является проведение исследований по изучению способности штаммов МКБ продуцировать экзополисахариды. Экзопполисахариды, продуцируемые МКБ, представляют собой разветвленные полимеры — гомополисахариды или гетерополисахариды. Первые — макромолекулы, построенные из остатков

моносахарида одного типа, к ним относятся декстран, мутан, альтернан, пуллулан, леван, инулин и другие. Вторые состоят из повторяющихся одинаковых блоков, построенных из остатков моносахаридов разных типов, к ним относятся геллан, ксантан, кефиран и другие. Большинство ЭПС представляют собой гетерополисахариды, содержащие от трех до восьми повторяющихся единиц, состоящих из двух или более моносахаридов (Ryan, 2014). Гетерополисахариды могут также содержать остатки аминокислот, глюкуроновой кислоты, различные функциональные группы, такие как ацетильная, фосфатная и другие. Масса гетерополисахаридов лежит в диапазоне от 10^4 до 10^6 Да, гомополисахариды тяжелее — их средняя масса составляет 10^7 Да (Amiri, 2019; Goh, 2005; Абрамова, 2009).

Несмотря на глобальные исследования экзополисахаридов, продуцируемых *Lactobacillus* sp., механизм их синтеза до конца не открыт. Очень мало известно о кинетике синтеза ЭПС, особенно когда продолжительность культивирования штаммов является одной из переменных процесса (Oleksy-Sobczak, 2020). Показано, что в процессе ферментации МКБ глюкоза и/или фруктоза используются для синтеза глюканов (декстранов), фруктанов (леванов) или альтернанов (Zarour, 2017). Состав среды (источники углерода и азота, витамины, минералы и т.д.), тип лабораторных штаммов и условия роста (температура, перемешивание, продолжительность инкубации, pH, концентрация кислорода и т.д.) являются важными факторами для общего выхода ЭПС, продуцируемых МКБ.

Несмотря на большое количество исследований все еще недостаточно информации о кинетике синтеза ЭПС, где изменения в выходе продукции и составе ЭПС могут привести к значительной потере продукции (Fukuda, 2010; Jurášková, 2022; Oleksy-Sobczak, 2020). Количественная оценка ЭПС, произведенных молочнокислыми бактериями, требует извлечения из культуральной среды или пищевых матриц. В настоящее время используют несколько методов выделения ЭПС из биологических масс. В основном для выделения и определения количества ЭПС биологическую массу растворяют в воде, центрифугированием или фильтрованием отделяют нерастворимую часть. Из водного раствора ЭПС выделяют осаждением этиловым или изопропиловым спиртом. Очищают многократным переосаждением спиртом, белковые примеси из водных растворов осаждают трихлоруксусной или сульфосалициловой кислотой, от низкомолекулярных примесей избавля-

ются с помощью диализа (Goh, 2005; Абрамова, 2009; Куис, 2009; Винокуров, 2004; Piermaria, 2008; Cerning, 1988). Существует метод выделения ЭПС с использованием аппарата электроосаждения с полупроницаемой разделительной мембраной (Григорьев, 1990). Наиболее чистый продукт с разделением на фракции по весу получают с использованием гель-хроматографии (Куис, 2009; Фокина, 2015). Широко применяется метод количественного определения полученных после очистки ЭПС — фенол-сернокислый метод по Дюбуа (Dubois, 1956). Для определения структуры ЭПС их подвергают гидролизу и анализируют мономерный состав методами ионнообменной, высокоэффективной жидкостной или газовой хроматографий (Кичемазова, 2019).

Наиболее распространенным методом определения содержания углеводной части полисахаридов является фенол-сернокислый метод Дюбуа. Однако имеются данные о неточности этого метода, не отражающего реальную концентрацию полисахарида, а носящего скорее сравнительный характер (Еникеев, 2011). Точное определение содержания ЭПС — определение массовой доли полисахарида в пределах погрешности измерения — могут дать методы гель-хроматографии, высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии, а также капиллярного электрофореза после предварительного гидролиза полисахаридов, и чаще всего неотделимо от изучения строения полисахарида. Однако высокая стоимость и трудоемкость этих методов делает их применение нецелесообразным в случаях, где не предусматривается задача изучения строения ЭПС или определения точного их содержания. Во многих практических случаях достаточно лишь оценки содержания ЭПС.

Для корректной оценки содержания ЭПС актуальным является проведение сравнения различных методов определения полисахаридов, а также определение содержания примесей в выделенных продуктах.

Кроме того, в настоящее время большой ряд работ посвящен исследованию влияния различных питательных сред и внесения сахаров на синтез разными штаммами молочнокислых бактерий ЭПС. Однако в значительной части работ в качестве питательной среды для культивирования МКБ используется бульон Мана-Рогозы-Шарпа (MRS). Молочнокислые бактерии для хлебопекарной промышленности поддерживаются в коллекции и культивируются не на молочных питательных средах, а на зерновых средах, в частности, солодовом сусле с 12% сухих веществ, более близкой по составу теста

В.В. Мартиросян, М.Н. Костюченко, М.В. Рейнов, О.Е. Тюрина, О.А. Савкина

и заквасок. В связи с тем, что состав питательной среды оказывает непосредственное действие на синтез ЭПС, актуальным является определение способности к синтезу ЭПС молочнокислых бактерий, при культивировании их на солодовом сусле.

Целями текущего исследования являлись изучение способности штаммов МКБ из коллекции ФГАНУ НИИХП продуцировать ЭПС и сравнение методов определения ЭПС — гравиметрического, фенол-серноокислого по Дюбуа, метода с применением антронового реактива и титриметрического по Бертрану. Для определения чистоты продукта и оценки корректности гравиметрического метода определено содержание в качестве примеси белка в выделенных продуктах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Для исследования были использованы штаммы молочнокислых бактерий из музейной коллекции ФГАНУ НИИХП промышленно-ценных штаммов для хлебопекарной промышленности. Перечень используемых штаммов и температура их культивирования представлены в Таблице 1.

Таблица 1
Температура культивирования штаммов МКБ

Table 1
Cultivation Temperature of LAB Strains

Оптимальная температура культивирования, °C	Перечень штаммов МКБ, культивируемых при данной температуре
30	<i>L.brevis</i> -78(d), <i>L.casei</i> -1(d), <i>L.brevis</i> -5(d), <i>L. plantarum</i> A-63(d), <i>L.rapi</i> -1
37	<i>L.dioliworans</i> -1, <i>L. fermentum</i> -34 (d), <i>L. paracasei</i> -2, <i>L. paracasei</i> -6, <i>L. paracasei</i> -5, <i>L. paracasei</i> -4, <i>L. paracasei</i> -3, <i>L. paracasei</i> -1, <i>L.dioliworans</i> -1
50	<i>L. helveticus</i> -1, <i>L.amilolyticus</i> -1, <i>L.amilolyticus</i> -2

Процедура и методы исследования

Культивирование МКБ для анализа

Для получения ЭПС культуры МКБ культивировали на 12 % солодовом сусле в течение 48 ч при оптимальной для каждого штамма температуре (Таблица 1).

Определение титра клеток

Содержание клеток МКБ определяли в конце культивирования посевом на питательную среду MRS -агар (Condalab, Испания).

Подготовка к анализам.

Выделение высушенного остатка

Культуральную жидкость в объеме 9–14 мл центрифугировали 30 минут при 8000 об/мин. Осадок после отделения надосадочной жидкости промывали 3 мл дистиллированной воды, центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин. Центрифугаты объединяли и упаривали на роторном испарителе под вакуумом, не допуская сильного пенообразования, до объема в 2–3 мл. По каплям и при перемешивании прибавляли 8 мл этилового спирта и выдерживали смесь сутки при 3–7 °С. Надосадочную жидкость сливали. Остаток растворяли в 2–3 мл дистиллированной воды, при необходимости нагревая до 40–50 °С, при перемешивании, и после полного растворения осадка повторяли процедуру осаждения спиртом. Для очистки от белка осадок растворяли в 2 мл дистиллированной воды, прибавляли раствор, содержащий 350 мг трихлоруксусной кислоты в 2 мл воды, и выдерживали смесь при 3–7 °С в течение двух суток. Затем смесь центрифугировали 15 минут при 10 000 об/мин, осадок после отделения надосадочной жидкости промывали 2 мл воды и центрифугировали, центрифугаты объединяли. Проводили диализ против дистиллированной воды в мешке с диаметром пор 3,5 кДа. Центрифугат в диализном мешке выдерживали в емкости с 2 л воды в течение нескольких суток при 3–7 °С, дважды в день аккуратно перемешивая и трижды меняя воду через 12–24 ч. После окончания диализа упаривали почти всю воду из содержимого диализного мешка на роторном испарителе под вакуумом при 55–60 °С, не допуская сильного пенообразования. Для максимального удаления воды к остатку прибавляли 10 мл безводного изопропанола и стеклянной палочкой затирали вязкую смесь до образования однородной кристаллической массы, затем изопропанол отгоняли и в течение часа выдерживали остаток под вакуумом при температуре 57–60 °С. Колбу с остатком взвешивали и определяли массу выделенного высушенного продукта, содержащего ЭПС. Пересчитывали количество выделенного высушенного продукта на 1 мл культуральной жидкости, мг/мл. Далее сухой продукт исследовали разными методами — фенол-серноокислотым по Дюбуа, фотометрическим методом с использованием антронового реактива, а также по Бертрану

Фенол-сернокислый метод по Дюбуа

Для определения содержания ЭПС в выделенном продукте непосредственно перед анализом взвешивали выделенный сухой продукт на аналитических весах с точностью до десятой доли миллиграмма (в количестве 10–13 мг) и растворяли в 200 мл дистиллированной воды для получения концентрации ЭПС около 50 мкг/мл, оптимальной для определения фотометрическими методами. В емкость типа термостойкой пробирки приливали 1 мл анализируемого или градуировочного раствора, добавляли 1 мл 5% свежеприготовленного раствора фенола в дистиллированной воде и перемешивали. При перемешивании по каплям прибавляли 5 мл концентрированной серной кислоты, смесь еще раз хорошо перемешивали и оставляли на 5 минут. После этого в течение 15 минут три раза встряхивали для лучшего поглощения смесью необходимого для реакции кислорода из воздуха. Затем определяли оптическую плотность раствора при длине волны 490 нм. Для кюветы сравнения готовили смесь по вышеуказанной методике, взяв вместо раствора сахара 1 мл дистиллированной воды. В качестве градуировочных использовали растворы глюкозы с концентрациями 9, 18, 36, 54, 72 и 90 мкг/мл.

Фотометрический метод с использованием антронового реактива

Взвешивали выделенный сухой продукт на аналитических весах с точностью до десятой доли миллиграмма (10–13 мг) и растворяли в 200 мл дистиллированной воды. Определение проводили по методике ГОСТ 26176–91 «Определение содержания углеводов в комбикормах». При взаимодействии полисахарида, серной кислоты и антрона образуются окрашенные продукты реакции, оптическая плотность раствора определяется при длине волны 625 нм. Для построения градуировочной зависимости использовали растворы глюкозы.

Метод определения ЭПС по Бертрону

Гидролиз ЭПС проводили по методике Плешкова¹. Навеску 30–50 мг полученного сухого продукта, взвешенную на аналитических весах с точностью до десятой доли миллиграмма, растворяли в 5 мл 0,7н соляной кислоты и нагревали смесь на кипящей водяной бане в те-

чение трех часов. После охлаждения прибавляли одну небольшую каплю 1 % спиртового раствора фенолфталеина и подщелачивали 5 % раствором гидроксида натрия до появления слабо-розового окрашивания.

Определение содержания моносахаридов проводили по методике ГОСТ 5672–68. При взаимодействии реактива Фелинга с восстанавливающими сахарами образуется выпадающая в осадок закись меди, которая отделяется и обрабатывается раствором железоммонийных квасцов в кислой среде с образованием солей двухвалентного железа. Титрованием раствором перманганата калия двухвалентное железо окисляется и по расходу титранта определяется количество присутствовавшего в аликвоте восстанавливающего сахара.

Определения содержания ЭПС реализовывалось с опорой на эмпирическую таблицу соответствия количества меди и глюкозы Загибалова и соавт.²

Определение возможного содержания белков и пептидов

Содержание белка и пептидов определяли по методике, представленной в ГОСТ 25832–89 с использованием полуавтоматического дигестора. При взаимодействии концентрированной серной кислоты и азоторганических веществ в присутствии катализатора образуется аммиак, который после обработки смеси щелочью отгоняется и определяется титриметрически. По количеству выделенного аммиака рассчитывают содержание белка.

Анализ данных

Все эксперименты проводились в общей сложности пять раз. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Excell. Сравнение влияния факторов проводилось методом со значимостью, проверенной на уровне достоверности 95 %, а различия между средними определялись с использованием наименьшей значимой разницы и теста Дункана двухфакторного дисперсионного анализа с одним повторением (ANOVA). Доверительные интервалы, показанные на гистограммах и в таблице, отражают точность используемых методов.

¹ Плешков, Б.П. (1976). Практикум по биохимии растений. Москва: Издательство «Колос».

² Загибалов, А. В., & Зверькова, А. С. (1992). *Технология консервирования плодов и овощей и контроль качества продукции*. Москва: Агропромиздат.

В.В. Мартиросян, М.Н. Костюченко, М.В. Рейнов, О.Е. Тюрина, О.А. Савкина

РЕЗУЛЬТАТЫ

Условия культивирования молочнокислых бактерий и продуцирование экзополисахаридов

Исследовали влияние условий культивирования молочнокислых бактерий на содержание клеток в культуральной жидкости и образование экзополисахаридов (Таблица 2).

Выделенный и высушенный продукт, содержащий ЭПС, взвешивали и определяли его содержание в 1 мл культуральной жидкости (Таблица 2, столбец 4). Определяли соотношение полученных ЭПС и клеток МКБ в куль-

туральной жидкости после 48 часов культивирования (Таблица 2, столбец 5).

Полученные данные показали, что все коллекционные штаммы продуцировали ЭПС в разном количестве. Наибольшее количество выделенного высушенного продукта, содержащего ЭПС в перерасчете на 1 мл культуральной жидкости было определено у штаммов *L.amilolyticus*-2, *L. plantarum*A-63(d), *L.amilolyticus*-1, *L.brevis*-78(d), *L. paracasei*-6, *L.rapi*-1, *L.diolorans*-1. Полученные данные коррелируют с данными другого исследования, в котором отмечается около 30 видов *Lactobacillus* spp., способных синтезировать ЭПС, среди которых также отмечается *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum* (Oleksy-Sobczak, 2020)

Таблица 2

Условия культивирования молочнокислых бактерий для продуцирования экзополисахаридов

Table 2

Cultivation Conditions of Lactic Acid Bacteria for Exopolysaccharide Production

Название штамма МКБ	Температура культивирования, °C	Кол-во клеток, ×10 ⁸ КОЕ/мл	Количество выделенного высушенного продукта, содержащего ЭПС, в пересчете на 1 мл культуральной жидкости, мг/мл	Отношение выделенного продукта, содержащего ЭПС, к количеству клеток, мг/(10 ⁸ × КОЕ)	Содержание углеводной основы ЭПС, определенное по методу Дюбуа в выделенном продукте, %	Содержание углеводной основы ЭПС, определенное по методу Бертрана в выделенном продукте, %*	Возможное содержание белков и пептидов, % по массе*
<i>L.brevis</i> -78(d)	30	9,2 ± 0,5a	12,5 ± 0,5a	1,36 ± 0,02a	76,0 ± 0,5a	70,9 ± 0,5a	-
<i>L.casei</i> -1(d)	30	29,0 ± 0,5b	7,8 ± 0,5a	0,27 ± 0,01c	70,9 ± 0,4b	69,5 ± 0,4c	—
<i>L.diolorans</i> -1	37	3,8 ± 0,2c	9,6 ± 0,4c	2,53 ± 0,04d	70,7 ± 0,4b	69,7 ± 0,4c	—
<i>L.brevis</i> -5(d)	30	8,9 ± 0,5a	8,7 ± 0,3d	0,98 ± 0,02e	74,7 ± 0,4c	69,4 ± 0,4c	—
<i>L.fermentum</i> -34 (d)	37	8,5 ± 0,2d	9,9 ± 0,3c	1,16 ± 0,02f	70,3 ± 0,4b	64,9 ± 0,4d	—
<i>L.paracasei</i> -2	37	12,0 ± 0,5e	12,0 ± 0,4a	1,00 ± 0,02e	74,0 ± 0,4d	71,2 ± 0,4b	—
<i>L.paracasei</i> -6	37	7,9 ± 0,5d	11,7 ± 0,5a	1,48 ± 0,02g	72,4 ± 0,4e	70,6 ± 0,4a	—
<i>L.amilolyticus</i> -1	50	5,2 ± 0,5f	12,3 ± 0,5a	2,36 ± 0,02h	67,9 ± 0,4f	65,1 ± 0,4d	—
<i>L.plantarum</i> A-63(d)	30	5,7 ± 0,2f	12,8 ± 0,5a	2,25 ± 0,02i	68,9 ± 0,4g	—	3,1 ± 0,3a
<i>L.paracasei</i> -5	37	35,0 ± 0,5g	11,5 ± 0,3e	0,33 ± 0,01j	73,9 ± 0,4d	—	2,2 ± 0,2b
<i>L.paracasei</i> -4	37	22,0 ± 0,4h	10,0 ± 0,3f	0,45 ± 0,02k	66,2 ± 0,4h	—	2,4 ± 0,2b
<i>L.paracasei</i> -3	37	19,0 ± 0,5i	11,5 ± 0,3e	0,61 ± 0,02l	73,6 ± 0,4i	—	4,8 ± 0,4c
<i>L.paracasei</i> -1	37	13 ± 0,2j	11,6 ± 0,5a	0,89 ± 0,02m	72,1 ± 0,4e	—	1,6 ± 0,1d
<i>L.diolorans</i> -1	37	8,8 ± 0,5a	11,2 ± 0,5e	1,27 ± 0,02n	71,2 ± 0,4e	—	2,4 ± 0,4b
<i>L.amilolyticus</i> -2	50	3,5 ± 0,5c	14,4 ± 0,5g	4,11 ± 0,02o	71,9 ± 0,4j	—	2,8 ± 0,4e
<i>L.rapi</i> -1	30	4,3 ± 0,4c	9,9 ± 0,5f	2,30 ± 0,02p	73,4 ± 0,4i	—	4,2 ± 0,4f

Примечание. * Прочерк означает, что значение показателя не определяли.

a-p = средние значения ± SD в одном столбце с разными строчными надстрочными буквами значительно различаются (P ≤ 0,05)

Note: * A dash indicates that the value of the parameter was not determined.

a-p = Mean values ± SD in the same column with different lowercase superscript letters differ significantly (P ≤ 0.05).

Фотометрические определения экзополисахаридов

Выделенный продукт после очистки, помимо ЭПС, может также содержать воду в составе гидратов ЭПС, белки и высокомолекулярные пептиды. Чтобы оценить степень чистоты продукта, необходимо определить содержание ЭПС и оценить содержание белков и пептидов в выделенных продуктах. При определении содержания ЭПС первоначально предполагали, что исследуемые полисахариды образованы преимущественно из остатков глюкозы и моносахаридов, изомерных глюкозе, а также могут содержать незначительное количество остатков глюкуроновой кислоты, аминокислот и остатков сахаров с функциональными группами, такими как ацетильная, пируватная, фосфатная и др. (Sanalibaba, 2016). В примененных методах определения полисахариды гидролизуются до моносахаридов, которые при использовании методов Дюбуа и с применением антронового реактива реагируют с образованием окрашенных продуктов, определяемых фотометрически; а при использовании метода Бертрана реагируют с образованием закиси меди, которая определяется титриметрически. Рассчитывали соответствующее полученным значениям количество глюкозы, умножали на коэффициент пересчета на полисахариды 0,9 и определяли оценочную массу углеводной основы ЭПС. Отличные от остатков глюкозы и ее изомеров структурные звенья полисахаридов (кроме остатков аминокислот) также определяются указанными методами, но из-за особенностей их строения получаемые при анализе значения (оптической плотности, массы восстановленной меди) несколько отличаются от значений при анализе содержания глюкозы и ее изомеров. Однако если таких структурных фрагментов в ЭПС немного, на точность количественного определения ЭПС обозначенными методами существенного влияния они не окажут.

В литературе представлены различные методики определения сахаров с применением фенол-сернокислого метода Дюбуа, различающиеся количеством реагентов, их соотношением и условиями проведения реакции (Masuko, 2005; Rühmann, 2015). Наиболее качественные результаты позволяет получить методика, изложенная в разделе «Материалы и методы исследований». По этой методике получена градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации глюкозы с коэффициентом корреляции $R = 1,000$ и незначительным стандартным отклонением $S = 0,0057$ (Рисунок 1).

По данным исследований обнаружено, что даже небольшие отклонения от указанной методики значительно ухудшают характеристики градуировочной кривой и, следовательно, снижают точность определения.

Разброс полученных значений, определенных по методу Дюбуа, оказался от 66,2 до 76 % углеводной основы ЭПС от массы выделенного продукта, среднее содержание составило 71,7 %, стандартное отклонение $S=2,5$, причем значения большинства образцов близки к среднему. Эти показатели свидетельствуют о стабильном процентном содержании в выделенных продуктах ЭПС, произведенных различными штаммами МКБ, что дает возможность оценивать содержание ЭПС в выделенном продукте по его массе, не прибегая к спектрофотометрическому и другим методам определения.

Для оценки корректности результатов, полученных по методу Дюбуа применительно к ЭПС, произведенным МКБ, необходимо сравнить их с результатами, полученными с применением других методов.

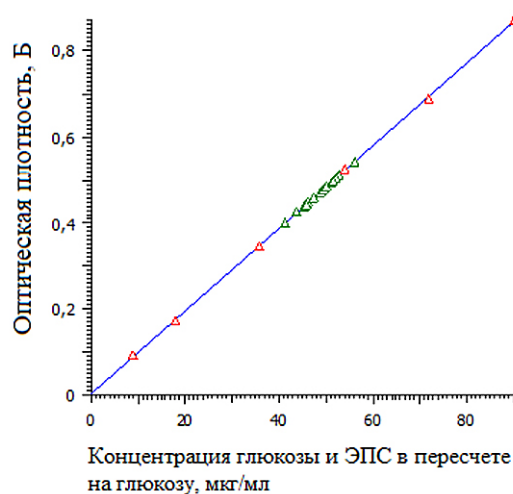
Для определения моносахаридов и полисахаридов часто применяют антроновый метод. По данным Си-

Рисунок 1

Зависимость оптической плотности от концентрации глюкозы

Figure 1

Dependence of Optical Density on Glucose Concentration



Примечание. Формула зависимости: $D = 0,0095624 \cdot C + 0,00115$, где D — оптическая плотность, в Беллах. C — концентрация глюкозы и ЭПС в пересчете на глюкозу, мкг/мл.

Note. The formula for the dependence is: $D=0.0095624 \cdot C+0.00115$, where D is the optical density (in Bel), and C is the concentration of glucose and EPS (calculated as glucose), in $\mu\text{g/mL}$.

нищина³, метод достаточно чувствителен и позволяет определять до 10 мкг/мл сахаров в пробе, поэтому представлялось интересным опробовать его для определения ЭПС, продуцируемых МКБ. Для построения градуировочной зависимости использовали раствор глюкозы в соответствии с методикой, представленной в ГОСТ 26176–91. Получена градуировочная зависимость с коэффициентом корреляции $R = 0,997$ и небольшим стандартным отклонением $S = 0,0068$. Однако результаты определения содержания ЭПС по этому методу оказались почти вдвое ниже результатов, полученных по фенол-серноокислому методу Дюбуа. Поскольку значения содержания ЭПС, определенных по методу Бертрانا (см. следующий абзац), признанного наиболее точным, оказались близкими к значениям, полученным по методу Дюбуа, а приготовление градуировочных растворов нужного состава для корректного определения ЭПС по антроновому методу крайне затруднительно, сделан вывод о его неприменимости для определения ЭПС, произведенных МКБ.

Определение экзополисахаридов методом Бертрана

Универсальным методом титриметрического определения редуцирующих сахаров, в том числе полученных после гидролиза полисахаридов, считается метод Бертрана. По ГОСТ 25832–89 по методу Бертрана определяют общее содержание углеводов в хлебе (включая нерастворимые полисахариды). Таким образом, он признан наиболее универсальным и точным из доступных методов. Недостатками метода Бертрана являются сравнительная трудоемкость и нестехиометрическое соотношение вступившей в реакцию двухвалентной меди и моносахарида. По этой причине содержание сахаров по методу Бертрана определяют с применением эмпирических таблиц или эмпирических формул. В данной работе использовали таблицу соответствия восстановленной меди и глюкозы. Поскольку мономерный состав ЭПС неизвестен, то, используя для сравнения глюкозу, по методу Бертрана нет возможности получить точное значение содержания углеводной основы ЭПС, но поскольку стехиометрия взаимодействия двухвалентной меди и различных моносахаридов отличается несущественно, метод Бертрана дает возможность с хорошей точностью оценить содержание углеводной основы ЭПС.

Метод Бертрана и метод определения белка по Кьельдалю требуют использования большого количества анализируемого вещества, поэтому определить содержание ЭПС по методу Бертрана смогли не во всех выделенных образцах, а только в девяти. Остальные восемь из семнадцати полученных образцов были использованы для определения содержания белка.

Получены значения содержания полисахаридов в диапазоне от 64,9 до 71,3 %, среднее значение составило 69,2 %, на 2,5 % меньше, чем среднее значение по методу Дюбуа. Коэффициент корреляции R для линейной регрессии между полученными значениями определений по Дюбуа и по Бертрану составляет 0,636, что согласно шкале Чеддока говорит о заметной и прямой связи. Хорошее соответствие данных этих двух методов свидетельствует о корректности фенол-серноокислого метода для оценки содержания ЭПС, продуцируемых МКБ разных штаммов при условии введения поправки на завышение: если исходить из того, что метод Бертрана дает оценку, наиболее приближенную к истинному значению, то данные, полученные по методу Дюбуа оказываются несколько завышенными.

Определение остаточного содержания азотсодержащих веществ в выделенных продуктах

Липофильные низкомолекулярные вещества, как и часть гидрофильных, были удалены в результате двойного осаждения спиртом в процессе выделения ЭПС. Оставшиеся низкомолекулярные гидрофильные вещества, в том числе моно- и олигосахариды, были удалены в процессе длительного диализа.

Таким образом, основной примесью в выделенных продуктах могут быть белки и высокомолекулярные пептиды, которые могли частично остаться в растворе после осаждения белков трихлоруксусной кислотой. Содержание белков в выделенных продуктах определяли по методу Кьельдаля, по которому азоторганические вещества разлагаются с образованием аммиака, определяемого титриметрически. Метод не позволяет узнать точное (в пределах погрешности метода измерения) содержание белков и пептидов, но дает возможность оценить содержание белковых веществ. Средняя доля азота в белках составляет около 16 %, исходя

³ Синицын, А. П., Гусаков А. В. & Черноглазов, В. М. (1995). *Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов*. Москва: МГУ.

из этого значения и предположения, что наличие фрагментов аминокислот в полученных ЭПС незначительно, мы оценивали содержание белков и пептидов в выделенных продуктах.

Из представленных в Таблице 1 данных видно, что оценочное содержание белковых веществ в выделенных ЭПС незначительно — в среднем составляет 2,9%, причем явной зависимости между содержанием ЭПС и белка в выделенном продукте нет. Возможно, применение сульфосалициловой кислоты в качестве осадителя белков вместо трихлоруксусной кислоты привело бы к более полному осаждению белков и пептидов и, следовательно, меньшему их содержанию в конечном продукте. Однако образование аммиака при обработке проб выделенных продуктов по методу Кьельдаля может быть также обусловлено содержанием остатков аминокислот в качестве структурных фрагментов ЭПС. Таким образом, средний состав выделенных продуктов: около 70% углеводной основы ЭПС, состоящей из остатков моносахаридов, определяемых по методам Дюбуа и Бертрана; около 3% примеси белка, также в эти 3% могут входить азотсодержащие остатки аминокислот, являющимися структурными фрагментами ЭПС. Остатки аминокислот, составляющие 27–28% массы выделенных продуктов позволяют сделать предположение, что ЭПС, продуцируемые штаммами МКБ, в выделенном виде могут представлять собой устойчивые гидраты, а также содержать увеличивающие массу и искажающие данные анализа по методам Дюбуа и Бертрана функциональные группы, соединенные с остатками моносахаридов, образующими ЭПС.

Из-за указанных особенностей строения ЭПС ни фотометрическими, ни методом Бертрана определить массу ЭПС с точностью до погрешности метода нельзя, для определения точной массы требуется долгое и трудоемкое исследование с использованием дорогостоящих методов (ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором и другие). Однако для практического применения в пищевой промышленности точную массу ЭПС знать не требуется, достаточно лишь ее оценки, что, как показано в настоящем исследовании, успешно достигается методами Дюбуа, Бертрана и гравиметрическим.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты показали, что все исследованные штаммы микроорганизмов (МКБ) при культивировании в солодовом сусле с 12% сухих веществ синтезировали эк-

зополисахариды (ЭПС) в разном количестве. Наибольшее содержание выделенного высушенного продукта было отмечено у штаммов *L. amilolyticus*-2, *L. plantarum* A-63(d), *L. amilolyticus*-1, *L. brevis*-78(d), *L. paracasei*-6, *L. rari*-1 и *L. diolivorans*-1. Эти данные подтверждают выводы других исследований, в которых указано, что ряд видов *Lactobacillus* spp., включая *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* и *Lb. plantarum*, обладают способностью к синтезу ЭПС (Oleksy-Sobczak, 2020). Данное совпадение свидетельствует о репрезентативности наших результатов.

Фотометрический метод, используемый в исследовании, показал, что содержание углеводной основы ЭПС в выделенных продуктах составляет в среднем 71,7%, что указывает на стабильное производство ЭПС различными штаммами. Однако метод Дюбуа дал завышенные результаты по сравнению с методом Бертрана. Полученные результаты подтверждают данные полученные Ruijsenaars et al. (2000), что фенол-серный метод может иметь завышенный результат, поскольку количественно определяет общее количество углеводов, присутствующих во фракции EPS, включая низкомолекулярные углеводы. Корреляция между результатами этих методов ($R=0,636$) подтверждает, что фенол-сернокислый метод может применяться для оценки содержания ЭПС, однако с учетом поправок.

Метод Бертрана, признанный более точным и универсальным, подтвердил применимость полученных данных, демонстрируя среднее содержание углеводной основы ЭПС 69,2%. Несмотря на сложности его использования, полученные значения коррелировали с результатами метода Дюбуа, что подтверждает возможность использования последнего для практических целей при введении поправок.

Сравнение содержания белковых примесей показало, что в среднем их количество не превышает 2,9%, что соответствует низкому уровню загрязнений. Это подтверждает эффективность выбранного метода очистки. Применение других методов осаждения белков, таких как использование сульфосалициловой кислоты, возможно, позволило бы добиться еще большего удаления белков.

Исследование показывает, что ЭПС, продуцируемые штаммами МКБ, обладают сложным составом, включая примеси, которые могут искажать результаты анали-

за, что коррелируют с данным в литературе (Fukuda, 2010; Amiri, 2019; Oleksy-Sobczak, 2020; Jurášková, 2022). Средний состав ЭПС содержит около 70 % углеводной основы, 3 % белка и остаточные 27–28 % могут включать воду в составе гидратов, а также функциональные группы, соединенные с остатками моносахаридов. Эти особенности подтверждают необходимость использования дополнительных методов для точного определения массы ЭПС.

Ограничения исследования

Использование различных методов определения содержания ЭПС (фенол-сернокислотный метод Дюбуа, антроновый метод и метод Бертрана) имеет свои ограничения по точности. Метод Дюбуа показал завышенные результаты по сравнению с более точным методом Бертрана, что требует внесения поправок при интерпретации данных. Метод Бертрана, хотя и признан более точным, требует больших объемов материала и сложной подготовки проб, что ограничивает его применение для массовых анализов. Антроновый метод показал недостаточную чувствительность в условиях настоящего исследования, делая его применение менее надежным для определения ЭПС, продуцируемых молочнокислыми бактериями (МКБ).

Тщательная очистка продуктов с использованием трихлоруксусной кислоты могла быть недостаточной для полного удаления белков и высокомолекулярных пептидов, что могло повлиять на точность анализа. Применение других осадителей, таких как сульфосалициловая кислота, могло бы улучшить очистку, но не было протестировано. Исследование базировалось на предположении, что полисахариды состоят преимущественно из остатков глюкозы и ее изомеров, однако присутствие других функциональных групп и остатков сахаров могло исказить результаты анализа.

Процесс пробоподготовки с использованием вакуумного испарения и диализа мог привести к неполному удалению нежелательных примесей, что влияет на чистоту и однородность исследуемого продукта. Многоступенчатая пробоподготовка, включая центрифугирование, диализ и упаривание, увеличивает риск потери материала и возможных изменений в составе ЭПС, что могло сказаться на итоговых результатах.

Все штаммы МКБ культивировались при оптимальной температуре, что не учитывает возможные изменения

синтеза ЭПС при других условиях культивирования, ограничивая интерпретацию и применимость результатов. Определение содержания белка по методу Кьельдаля позволяло лишь оценить общее количество азотсодержащих соединений, не отделяя вклад белков от аминосахаров, что могло повлиять на оценку чистоты выделенных ЭПС. Использование эмпирических таблиц при расчетах содержания восстанавливающих сахаров по методу Бертрана также ограничивало точность полученных результатов.

Исследование проводилось на штаммах молочнокислых бактерий из музейной коллекции, что ограничивает возможность обобщения выводов на другие виды и штаммы бактерий. Способность синтезировать ЭПС может различаться у других штаммов, что требует дополнительных исследований.

Эти ограничения не компрометируют результаты исследования по ряду причин. Во-первых, несмотря на ограничения отдельных методов, исследование использовало несколько различных методов для определения содержания ЭПС, что позволило подтвердить результаты с разных точек зрения. Хотя метод Дюбуа может давать завышенные результаты, его сопоставление с более точным методом Бертрана показало, что фенол-сернокислый метод применим с учетом поправок. Согласованность результатов между этими методами свидетельствует о достаточной точности для практических целей, таких как применение в пищевой промышленности.

Во-вторых, несмотря на возможное остаточное содержание белков и пептидов, их количество было минимальным и не имело значительного влияния на общую оценку содержания ЭПС. Это подтверждается низкой средней долей белка (около 3 %), что позволяет считать анализ чистоты продукта приемлемым. Даже если бы применение других осадителей могло улучшить очистку, результаты с учетом примененного метода всё равно обеспечивают надёжную оценку содержания полисахаридов.

Процесс пробоподготовки, хотя и многозадачен, был тщательно выполнен и включал стандартные методики, что минимизировало возможные ошибки и гарантировало повторяемость результатов. Использование нескольких этапов подготовки и анализов обеспечило получение надежных данных, несмотря на возможные потери материала или присутствие примесей.

Температурные условия культивирования были выбраны с учетом оптимальных параметров для каждого штамма, что обеспечило репрезентативность полученных данных для условий исследования. Это даёт уверенность, что полученные результаты отражают реальный потенциал производства ЭПС штаммами МКБ в подобных условиях.

Ограничения количественного анализа по методу Кьельдаля не повлияли на основные выводы исследования, так как вклад азотсодержащих остатков был незначительным. Основные результаты фокусировались на углеводной основе ЭПС, и методика определения белков служила лишь дополнительной характеристикой, а не ключевым параметром.

Использование штаммов из музейной коллекции ограничивает обобщаемость результатов, но эти штаммы представляют промышленно-ценные культуры, используемые в хлебопекарной промышленности, что делает результаты ценными для практических применений. Даже если другие штаммы могут показывать различия в синтезе ЭПС, это не умаляет важности изученных штаммов и выводов относительно их продуктивности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования способности штаммов молочнокислых бактерий, из коллекции ФГАНУ НИИХП продуцировать экзополисахариды. Определены наиболее продуктивные штаммы: *L. amilolyticus*-2, *L. plantarum*A-63(d), *L. amilolyticus*-1, *L. brevis*-78(d), *L. paracasei*-6. Средние результаты показали штаммы *L. rapi*-1, *L. diolivorans*-1. Полученные данные показывают, что исследуемые штаммы из коллекции ФГАНУ НИИХП обладают потенциалом в качестве источников ЭПС при производстве заквасок и могут быть использованы для разработки микробных консорциумов для хлебопекарной промышленности, позволяющих улучшить реологические свойства, сжимаемость мякиша, удельный объем хлеба и снизить крошковатость и скорость черствения.

Сравнения методов определения ЭПС показали, что для определения содержания ЭПС продуцируемых при культивировании на солодовом сусле промышленно-ценными МКБ для хлебопекарной промышленности, корректным является метод Дюбуа. Для оценки содержания ЭПС можно использовать гравиметрический метод, не прибегая к более трудоемким спектрофото-

метрическому или иным методам определения содержания ЭПС.

Дальнейшим направлением работ по исследованию продуцирования ЭПС промышленно-ценными МКБ видится подбор оптимальных условий для получения ЭПС с наибольшим выходом и оптимизация методики выделения ЭПС.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Владимир Владимирович Мартиросян: концептуализация; разработка методологии исследования; руководство исследованием; администрирование проекта.

Марина Николаевна Костюченко: курирование данных; написание — подготовка черновика рукописи; администрирование проекта.

Михаил Викторович Рейнов: проведение исследования; создание рукописи и её редактирование; формальный анализ.

Ольга Евгеньевна Тюрина: визуализация; проведение исследования; написание — подготовка черновика рукописи; верификация данных.

Олеся Александровна Савкина: создание рукописи и её редактирование; администрирование и верификация данных.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Vladimir V. Martirosyan: conceptualization; development of research methodology; research management, project administration.

Marina N. Kostyuchenko: data curation; writing — preparation of a draft manuscript; project administration.

Mikhail V. Reynov: conducting the study; creating and editing the manuscript; formal analysis.

Olga E. Tyurina: visualization, conducting the study; writing — preparation of a draft manuscript; data verification.

Olesya A. Savkina: creating and editing the manuscript; data administration and verification.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Абрамова, А.Л. (2009). Методы определения экзополисахаридов (ЭПС). *Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ — 80 лет)* (с. 8–12). Москва: ВНИМИ.
- Abramova, A.L. (2009). *Methods for Determining Exopolysaccharides (EPS). Scientific support for the dairy industry (VNIIMI — 80 years)* (p. 8–12). Moscow: All-Russian Scientific Institute of Dairy Industry.
- Винокуров, В. А., Грайфер, В. И., Гринберг, Т. А., Пирог, Т. П., Владимиров, А. И., & Исмагилов, А. М. (2004). *Способ получения экзополисахаридов* (Патент РФ № 2 241 037). Российское патентное ведомство. Опубликовано 27.11.2004, Бюл. № 33.
- Vinokurov, V. A., Graipher, V. I., Grinberg, T. A., Pirog, T. P., Vladimirov, A. I., & Ismagilov, A. M. (2004). *Method for obtaining exopolysaccharides* (Patent No. RU 2,241,037). Russian Patent Office. Published 27.11.2004, Bulletin No. 33.
- Григорьев, Е. Ф., Болоховская, В. А., Халабузарь, В. Г., Кравец, Л. Ф., Дерябин, В. В., & Бовина, Е. В. (1990). *Способ выделения экзополисахаридов* (Патент СССР № 1 549 996). Патентное ведомство СССР. Опубликовано 15.03.1990.
- Grigoriev, E. F., Bolohovskaya, V. A., Halabuzar, V. G., Kravets, L. F., Deryabin, V. V., & Bovina, E. V. (1990). *Method for isolation of exopolysaccharides* (Patent No. SU 1,549,996). Soviet Patent Office. Published 15.03.1990.
- Еникеев, Р. Р., Бобошко, Д. Н., Руденко, Е. Ю., & Зимичев, А. В. (2011). *Способ количественного анализа полисахарида, производимого молочнокислыми бактериями* (Патент РФ № 2 437 092). Российское патентное ведомство. Опубликовано 20.12.2011, Бюл. № 35.
- Enikeev, R. R., Boboshko, D. N., Rudenko, E. Yu., & Zimichev, A. V. (2011). *Method for quantitative analysis of a polysaccharide produced by lactic acid bacteria* (Patent No. RU 2,437,092). Russian Patent Office. Published 20.12.2011, Bulletin No. 35.
- Кичемазова, Н.В. (2019). Экзополисахариды бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*: характеристика и их биологические свойства [Диссертация на соиск. уч. ст. к. биол. н.]. ФГБОУ ВО Вавиловский Университет.
- Kichemazova, N. V. (2019). *Exopolysaccharides of bacteria of the genera Xanthobacter and Ancylobacter: Characteristics and their biological properties* [Unpublished doctoral dissertation]. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Vavilov University.
- Куис, Л. В., & Маркевич, Р. М. (2009). Выделение, фракционирование и анализ экзополисахаридов *Bacillus mucilaginosus*. *Труды БГТУ. Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология* (с. 170–173). Минск: БГТУ.
- Kuis, L. V., & Markevich, R. M. (2009). Allocation, clearing, fractionation and studying exopolysaccharides of *Bacillus mucilaginosus*. *Trudi BGTU. Ser. 2: Chemical technologies, biotechnology, geoeology* (p.170–173). Minsk: BSTU.
- Локачук, М. Н., Савкина, О.А., Павловская, Е. Н., Фролова, Ю.М., Костюченко, М.Н., & Мартиросян, В. В. (2023). Современная таксономия и разнообразие молочнокислых бактерий в заквасках. *Хлебопродукты*, (6), 28–35. <https://doi.org/10.32462/0235-2508-2023-32-6-28-35>
- Lokachuk, M. N., Savkina, O.A., Pavlovskaya, E. N., Frolova, Yu.M., Kostyuchenko, M. N., & Martirosyan, V.V. (2023). Modern taxonomy and diversity of sourdough lactobacilli, *Khleboproducty*, (6), 28–35. <https://doi.org/10.32462/0235-2508-2023-32-6-28-35>
- Фокина, Н.А. (2015). Экзополисахарид *Streptococcus Thermophilus*: условия выделения и свойства. *Актуальная биотехнология*, 14(3), 41–42.
- Fokina, N. A. (2015). Exopolysaccharide of *Streptococcus Thermophilus*: Isolation conditions and properties. *Aktualnaja Biotehnologija*, 14(3), 41–42.
- Хусаинов, И.А. (2014). Современные представления о биосинтезе бактериальных экзополисахаридов. *Вестник Казанского технологического университета*, 17(5), 167–172.
- Khusainov, I.A. (2014). Modern concepts of the biosynthesis of bacterial exopolysaccharides. *Bulletin of the Kazan Technological University*, 17(5), 167–172.
- Amiri, S., Rezaei Mokarram, R., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M., & Alizadeh Khaledabad, M. (2019). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12: Optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 752–765. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.084>
- Cerning, J., Bouillanne, C., & Desmazeaud, M. J. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophiles*. *Biotechnology Letters*, 10, 255–260. <https://doi.org/10.1007/BF01024415>
- Daba, G. M., Elnahas, M. O., & Elkhateeb, W. A. (2021). Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110>
- Das, L., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2015). Effects of hydrocolloids as texture improver in coriander bread. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3671–3680. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1296-8>

- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT — Food Science and Technology*, 64(2), 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E., & Gänzle, M. (2010). Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5834–5841. <https://doi.org/10.1021/jf1002683>
- Goh, K. K. T., Haisman, D. R., Archer, R. H., & Singh, H. (2005). Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. *Food Research International*, 38(6), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.11.014>
- Jurášková, D., Ribeiro, S. C., & Silva, C. C. G. (2022). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11(2), 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>
- Katina, K., Maina, N. H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., Tenkanen, M., & Laitila, A. (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*, 26(7), 734–743. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.008>
- Kavitake, D., Devi, P. B., Singh, S. P., & Shetty, P. H. (2016). Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.099>
- Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S., & Kim, S. H. (2010). Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 123–130. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02859.x>
- Korcz, E., & Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Moroni, A. V., Arendt, E. K., & Dal Bello, F. (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiology*, 28(3), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.016>
- Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., & Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(4), 451–469. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027>
- Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E., & Piekarska-Radzic, L. (2020). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains — Optimization of synthesis and extraction conditions. *LWT*, 122, 109055. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109055>
- Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0148-8>
- Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., & Corsetti, A. (2021). Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods. *Foods*, 10, 1653. <https://doi.org/10.3390/foods10071653>
- Piermaria, J. A., De La Canal, M. L., & Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22, 1520–1527. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.10.005>
- Ruhmkorf, C., Jungkuntz, S., Wagner, M., & Vogel, R. F. (2012). Optimization of homoexopolysaccharide formation by lactobacilli in gluten-free sourdoughs. *Food Microbiology*, 32(2), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.002>
- Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2015). Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6, 565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00565>
- Ruijsenaars, H. J., Stinge, F., & Hartmans, S. (2000). Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides. *Current Microbiology*, 40, 194–199.
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., & Stanton, C. (2014). Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*, 6(3), 679–693. <https://doi.org/10.1039/C4FO00529E>
- Sanalibaba, P., & Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Micro Open Access*, 2, 1000115. <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>
- Zajsek, K., Gorsek, A., & Kolar, M. (2013). Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*, 139(1–4), 970–977. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.142>
- Zarour, K., Vieco, N., Pérez-Ramos, A., Nacher-Vázquez, M., Mohedano, M. L., & López, P. (2017). Food ingredients synthesized by lactic acid bacteria. In *Microbial production of food ingredients and additives* (pp. 89–124). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811520-6.00004-0>