

УДК 579. 222. 3

**І. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. М. Василюк,
Л. Т. Олещенко**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ-143, Україна, 03143,
e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

ПРОДУКЦІЯ ЕЗКОПОЛІСАХАРИДІВ ШТАМАМИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ФЕРМЕНТОВАНИХ ПРОДУКТІВ

Мета. Провести пошук штамів молочнокислих бактерій (МКБ), що продукують екзополісахариди, серед ізолятів з традиційних кисломолочних продуктів, ферментованих фруктів та овочів. **Методи.** Ідентифікацію ізольованих культур проводили за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями. Здатність до синтезу та кількість екзополісахаридів визначали на середовищах MRS з 5% вуглеводу (сахароза, глюкоза, фруктоза чи лактоза). **Результати.** При рості на агаризованих середовищах з різними джерелами вуглеводів здатність до утворення ЕПС виявили 25% штамів МКБ. На середовищі MRS з сахарозою ЕПС синтезували всі штами *Leuconostoc* spp. (у кількості 0,40–18,00 г/л) і 93% штамів *Pediococcus* spp. (0,35–9,40 г/л), тоді як серед *Lactobacillus* spp. – тільки 37,5% штамів (0,15–2,75 г/л). В той же час штами *Lactobacillus* spp. продукували ЕПС при рості на середовищах MRS з глюкозою, фруктозою чи лактозою у кількості 0,15–0,90 г/л. **Висновки.** Здатність до продукції ЕПС штамми МКБ залежала від родової належності і наявного в середовищі вуглеводу. Відібрано штами МКБ, які є перспективними для подальших досліджень біологічної активності та структури їх екзополісахаридів.

Ключові слова: екзополісахариди, молочнокислі бактерії, ферментовані продукти.

Продукція екзополісахаридів (ЕПС) молочнокислими бактеріями (МКБ) інтенсивно вивчається і на сьогоднішній день накопичено багато даних щодо їх складу, структури та властивостей. Штами продуценти ЕПС виявлені серед представників родів *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* та *Weissella* [9]. Екзополісахариди МКБ мають унікальні фізичні та реологічні властивості, які зумовлюють їх використання у харчовій промисловості як в'язучих, стабілізувальних, гелеутворювальних агентів, особливо при виробництві кисломолочних продуктів [6]. У останні роки все більше уваги приділяється вивченню біологічної активності ЕПС. Зокрема показано, що вони володіють імуностимулювальною, протипухлинною та антиоксидантною активностями [7, 13, 14]. Оскільки біологічна активність ЕПС є штамоспецифічною, пошук нових штамів-продуцентів серед МКБ – представників природної мікробіоти ферментованих продуктів є актуаль-

© І. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. М. Василюк, Л. Т. Олещенко, 2017



ним. Штами, що продукують ЕПС, особливо у великій кількості, є цікавими з точки зору їх використання як для покращення реологічних властивостей продукту, так і для можливого оздоровчого впливу на організм людини.

Метою роботи було провести пошук штамів МКБ, що продукують екзополісахариди, серед ізолятів з традиційних кисломолочних продуктів, ферментованих фруктів та овочів.

Матеріали і методи

Як джерело виділення молочнокислих бактерій були використані ферментовані овочі та фрукти, виготовлені традиційними методами в домашніх умовах, а саме квашені капуста, яблука, баклажани та селера, сквашений томатний сік. Молочнокислі бактерії виділяли на середовищі MRS при культивуванні за температури 30 °C протягом 48–72 год. В роботі також використано штами родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* та *Pediococcus*, що були ізольовані нами раніше з традиційних кисломолочних продуктів і ферментованих овочів [1, 5].

Ідентифікацію виділених культур на рівні роду проводили з використанням традиційних мікробіологічних методів за низкою фізіолого-біохімічних і морфолого-культуральних ознак, як описано раніше [5].

Здатність до синтезу екзополісахаридів досліджували на агаризованих середовищах MRS, що містили сахарозу, лактозу, глюкозу чи фруктозу у концентрації 5%. Чашки з посівами інкубували при температурі 30 °C протягом 24–72 год і візуально відмічали здатність до синтезу екзополісахариду за утворенням слизових чи в'язких колоній [10]. Кількісне визначення продукції екзополісахаридів проводили шляхом вирощування на рідкому середовищі MRS з відповідним вуглеводом протягом 24 годин. Екзополісахариди виділяли з культуральної рідини [6] та кількісно визначали вуглеводи фенол-сірчанокислотним методом [3]. Статистичне опрацювання даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням програми Statistika 7.0.

Результати досліджень та їх обговорення

Із зразків ферментованих овочів та фруктів було ізольовано 194 штами молочнокислих бактерій. Облігатно гомоферментативні коки з сферичною формою клітин, згруповані у мазках в кластери чи тетради, стійкі до ванкоміцину було віднесено до роду *Pediococcus* (18 штамів). Гетероферментативні кокобацили з характерною морфологією клітин, що не зброджують аргінін та стійкі до ванкоміцину були віднесені до роду *Leuconostoc* (56 штамів). Факультативно гетероферментативні та гетероферментативні паличкоподібні бактерії було віднесено до роду *Lactobacillus* (120 штамів). Слід відзначити, що спектр представників різних родів молочнокислих бактерій різнився залежно від ферментованого продукту (рис. 1). Так, із зразків квашеної селери були ізольовані тільки лактобацили, які також склали переважну більшість ізолятів з квашених баклажанів, тоді як в квашеній капусті переважали лейконостоки, а в квашеному томатному соці – педіококи.



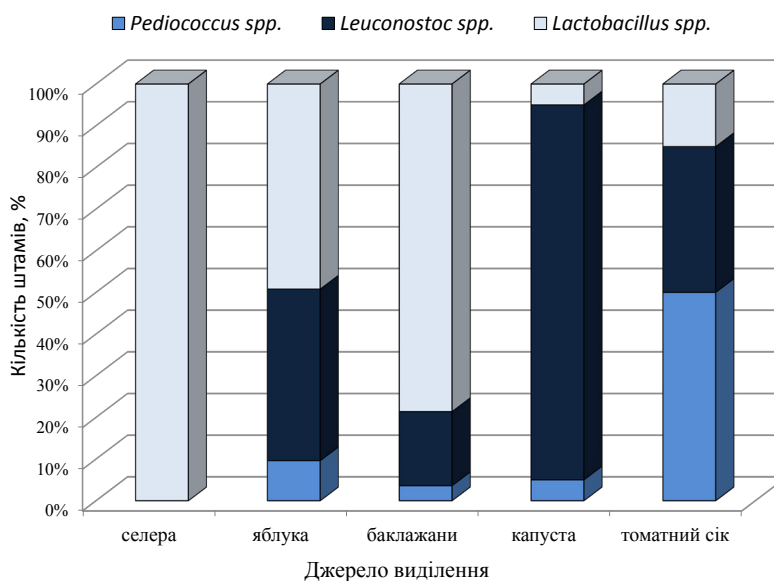


Рис. 1. Частота виділення штамів МКБ різних родів з зразків ферментованих овочів та фруктів.

Fig 1. Frequency of LAB strains isolation of different genera from samples of fermented vegetables and fruits

В літературі описано декілька методів скринінгу штамів МКБ, що продукують екзополісахариди. Найбільш простим є метод візуальної оцінки колоній бактерій на поверхні агаризованого середовища, даний підхід є найбільш придатним для первинного скринінгу великої кількості штамів [10].

При рості на поверхні агаризованих середовищ з різними джерелами вуглеводів здатність до утворення ЕПС виявили 25% (88 з 351) досліджених в роботі штамів молочнокислих бактерій, утворюючи слизові чи в'язкі колонії. На середовищі MRS з сахарозою ЕПС продукували 81,8% штамів, на середовищі з глюкозою – 21,5% штамів, на середовищах з фруктозою і лактозою – 7,9% і 1,13%, відповідно. Отримані нами дані щодо частоти виділення ЕПС-продуцентів співпадають з даними інших авторів [4, 11]. Крім того, за даними літератури молочнокислі бактерії різних родів продукують ЕПС при рості на середовищах з сахарозою, як єдиним джерелом вуглеводів, частіше, порівняно з іншими цукрами, такими як глюкоза, фруктоза, мальтоза, рафіноза, галактоза, лактоза [12].

На рис. 2 наведено дані щодо частоти виділення продуцентів ЕПС залежно від джерела виділення. Найбільша кількість штамів, що продукують ЕПС, виявлено серед ізолятів з квашених яблук (71,6% штамів), причому ЕПС продукувалися при вирощуванні на всіх використаних в роботі середовищах з різними вуглеводами. Найменша кількість ЕПС-продуцентів виявлена серед ізолятів з квашеної селери (2,8% штамів).

Продукція ЕПС на середовищі з певним вуглеводом залежала від родової належності. На середовищі MRS з сахарозою ЕПС синтезували всі шта-



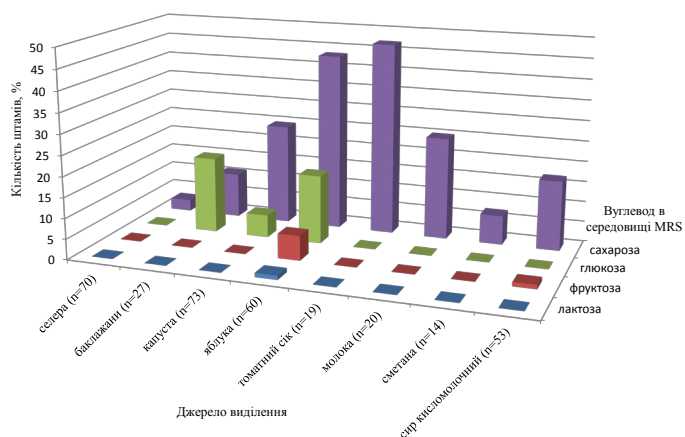


Рис. 2. Частота виділення штамів МКБ, що продукують екзополісахариди, залежно від джерела виділення.

Fig. 2. Frequency of isolation of exopolysaccharide-producing LAB strains depending on the source of isolation

ми лейконостоків і 93% штамів педіококів, тоді як серед лактобацил – тільки 37,5% штамів. В той же час штами *Lactobacillus* spp. продукували ЕПС при рості на середовищах MRS з глюкозою, фруктозою чи лактозою. Деякі штами МКБ продукували ЕПС при рості на декількох середовищах з різними цукрами і серед цих ізолятів переважали лактобацили (рис. 3). Так, штам *Lactobacillus* sp. 19я, ізольований з квасених яблук, продукував ЕПС на середовищах з сахарозою, глюкозою і лактозою. Найчастіше штами лактобацил продукували ЕПС як на MRS з глюкозою, так і на MRS з фруктозою.

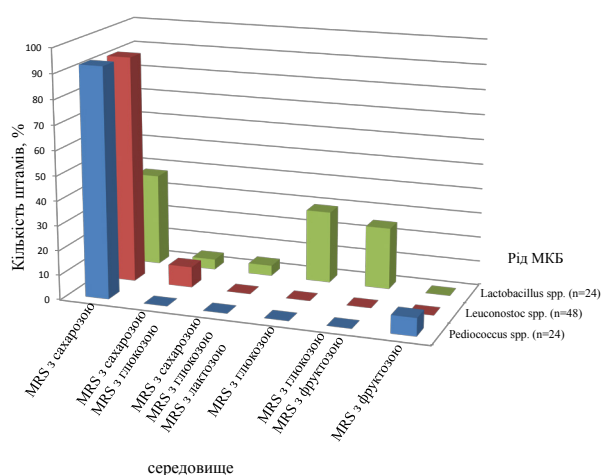


Рис. 3. Продукція екзополісахаридів штамами родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Pediococcus* на середовищах MRS з різними вуглеводами

Fig. 3. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* strains on MRS media with different carbohydrates

Кількість екзополісахаридів, що продукувалася штамами МКБ, варіювала в широких межах і також залежала як від родової належності, так і від джерела вуглеводу. На середовищі з сахарозою найбільшу кількість ЕПС продукували штами *Leuconostoc* spp. (0,40–18,00 г/л), тоді як представники *Lactobacillus* spp. і *Pediococcus* spp. – 0,35–9,40 і 0,15–2,75 г/л, відповідно (рис. 4).

На середовищах з глюкозою і фруктозою кількість ЕПС, що продукували в основному штами *Lactobacillus* spp. була в середньому на порядок нижчою, в порівнянні з середовищем з сахарозою, і складала 0,15–0,55 г/л і 0,15–0,90 г/л, відповідно.

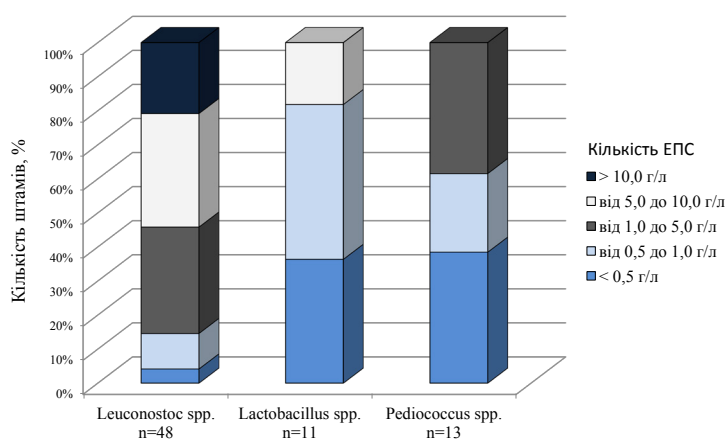


Рис. 4. Розподіл штамів МКБ за кількістю екзополісахаридів, що продукуються на середовищі MRS з сахарозою

Fig. 4. Distribution of LAB strains depending on amount of exopolysaccharides produced on MRS medium with sucrose

Кількість екзополісахаридів, що продукувалися одним штамом при рості на середовищах з різними джерелами вуглеводів, у більшості випадків була співставною у штамів *Lactobacillus* spp. В той же час штами *Leuconostoc* spp. на середовищі з сахарозою продукували ЕПС у кількості 3,7–6,3 г/л, а на середовищі з глюкозою – 0,5 г/л. За даними літератури, кількість ЕПС, що продукують штами МКБ, коливається в широких межах і може залежати як від умов культивування, так і від мономерного складу ЕПС, а саме: для гомополісахаридів це зазвичай високі концентрації – до 20 г/л, а для гетерополісахаридів – низькі, до 1 г/л [2, 11, 12].

Отже, в результаті проведеної роботи було визначено родову належність штамів МКБ, що були ізольовані з традиційних ферментованих фруктів та овочів. Частота виділення штамів-продуцентів ЕПС залежала як від джерела виділення так і роду МКБ. Переважна більшість бактерій продукували ЕПС при рості на середовищі з сахарозою у кількостях 1–18 г/л. Для подальших досліджень з метою встановлення біологічної активності та структури ЕПС нами було відібрано 86 штамів, а саме: 48 штамів *Leuconostoc* spp., 24 штами *Lactobacillus* spp. і 14 штамів *Pediococcus* spp., які є перспективними для практичного використання.



UDK 579. 222. 3

**I. L. Garmasheva, N. K. Kovalenko, O. M. Vasyluk,
L. T. Oleschenko**

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine
154, Zabolotny str, Kyiv-143, Ukraine, 03143,
e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM FERNMENTED PRODUCTS

Summary

Aim. To search for lactic acid bacteria (LAB) strains that produce exopolysaccharides among the isolates from traditional dairy products, fermented fruits and vegetables. **Methods.** Identification of the isolates were carried out according to morphological-cultural and physiology-biochemical properties. The ability to produce and amount of exopolysaccharides were determined on MRS media with 5% carbohydrate (sucrose, glucose, fructose or lactose). **Results.** 25% LAB strains were able to produce EPS on solid media with different carbon sources. All *Leuconostoc* spp. produced EPS on media with sucrose (in amount 0,40–18,00 g/l) and 93% of *Pediococcus* spp. strains (0,35–9,40 g/l), whereas among *Lactobacillus* spp. strains – only 37,5% of strains (0,15–2,75 g/l). At the same time, *Lactobacillus* spp. strains produced EPS on media with glucose, fructose or lactose in amount 0,15–0,90 g/l. **Conclusions.** The ability of LAB strains to produce EPS depended on genus affiliation and available carbohydrate in the medium. The LAB strains promising for further studies of biological activity and the structure of their exopolysaccharides have been selected.

Key words: exopolysaccharides, lactic acid bacteria, fermented products.

УДК 579. 222. 3

**И. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. Н. Василюк,
Л. Т. Олещенко**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев-143, Украина 03143,
e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

ПРОДУКЦІЯ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ ШТАММАМИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛІРОВАННИХ ІЗ ФЕРМЕНТИРОВАННИХ ПРОДУКТІВ

Реферат

Цель. Провести поиск штаммов молочнокислых бактерий (МКБ), которые продуцируют экзополисахариды (ЭПС), среди изолятов из традиционных кисломолочных продуктов, ферментированных фруктов и овощей. **Методы.** Идентификацию изолированных культур проводили по морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим свойствам. Способность к синтезу



и количество экзополисахаридов определяли на средах MRS с 5% углевода (сахароза, глюкоза, фруктоза или лактоза). **Результаты.** При росте на агаризованных средах с разными источниками углеводов способность к образованию ЭПС проявили 25% штаммов МКБ. На среде MRS с сахарозой ЭПС синтезировали все штаммы *Leisconostoc spp.* (в количестве 0,40–18,00 г/л) и 93% штаммов *Pediococcus spp.* (0,35–9,40 г/л), тогда как среди *Lactobacillus spp.* – только 37,5% штаммов (0,15–2,75 г/л). В то же время штаммы *Lactobacillus spp.* продуцировали ЭПС при росте на средах MRS с глюкозой, фруктозой или лактозой в количестве 0,15–0,90 г/л. **Выводы.** Способность к продукции ЭПС штаммами МКБ зависела от родовой принадлежности и присутствующего в среде углевода. Отобраны штаммы МКБ, которые являются перспективными для дальнейших исследований биологической активности и структуры их экзополисахаридов.

Ключевые слова: экзополисахариды, молочнокислые бактерии, ферментированные продукты.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Василюк О. М., Коваленко Н. К., Гармашева І. Л., Олещенко Л. Т. Виділення та ідентифікація бактерій роду *Lactobacillus* з ферментованих продуктів різних регіонів України // Мікробіол. журн. – 2014. – Т. 76, № 2. – С. 3–9.
2. De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F. and Degeest B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria // Int. Dairy J. – 2001. – 11(9). – P. 687–707.
3. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance // Anal. Chem. – 1956. – 28(3). – P. 350–356.
4. Garai-Ibabe G., Areizaga J., Aznar R., Elizaquivel P., Prieto A., Irastorza A., and M.T. Dueñas. Screening and selection of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization // J. Agric. Food Chem. – 2010. – 58(10). – P. 6149–6156.
5. Garmasheva I. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Ukrainian traditional dairy products // AIMS Microbiol. – 2016. – 2(3). – P. 372–387.
6. Feng M., Chen X., Li C., Nurgul R., and Dong M. Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharide // J. Food Sci. – 2012. – 77(6). – P. T111–T117.
7. Liu C., Tseng K., Chiang S., Lee B., Hsu W. and Pana T. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus exopolysaccharides* // J. Sci. Food Agric. – 2011. – 91(12). – P. 2284–2291.
8. Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. and Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // Int Dairy J. – 2002. – 12(2-3). – P. 163–171.
9. Ryan P.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Caplice N.M., Stanton C. Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications // Food Func. – 2015. – 6(3). – P. 679–693.



10. Smitinont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M., Cescutti P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization // Int. J. Food Microbiology. – 1999. – 51(2-3). – P. 105–111.

11. Tiekling M., Korakli M., Ehrmann M.A., Gänzle M.G. and Vogel R.F. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69(2). – P. 945–952.

12. van Geel-Schutten G.H., Flesch F., Brink ten B., Smith M.R., Dijkhuizen L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – 50(6). – P. 697–703.

13. Wang K., Li W., Rui X., Chen X., Jiang M., Dong M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810 // Int. J. Biol. Macromol. – 2014. – 63. – P. 133–139.

14. Zhang L., Liu C., Li D., Zhao Y., Zhang X., Zeng X., Yang Z., Li S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88 // Int. J. Biol. Macromol. – 2013. – 54. – P. 270–275.

References

1. Vasyliuk OM, Kovalenko NK, Harmasheva IL, Oleshchenko LT. Isolation and identification of bacteria of *Lactobacillus* genus from fermented products in different regions of Ukraine. Mikrobiol Z. 2014;76(2):2-9.

2. De Vuyst L, De Vin F, Vaningelgem F and Degeest B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 2001;11(9):687–707.

3. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. Anal. Chem. 1956;28(3):350–356.

4. Garai-Ibabe G, Areizaga J, Aznar R, Elizaquivel P, Prieto A, Irastorza A and Dueñas MT. Screening and selection of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. J. Agric. Food Chem. 2010;58(10):6149–6156.

5. Garmasheva I. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Ukrainian traditional dairy products. AIMS Microbiol. 2016;2(3):372-387.

6. Feng M, Chen X, Li C, Nurgul R and Dong M. Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharide. J. Food Sci. 2012;77(6):T111-T117.

7. Liu C, Tseng K, Chiang S, Lee B, Hsu W and Pana T. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. J. Sci. Food Agric. 2011;91(12):2284–2291.

8. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J and Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 2002;12(2-3):163–171.



9. Ryan PM, Ross RP, Fitzgerald GF, Caplice NM, Stanton C. Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Func.* 2015;6(3):679-693.
10. Smitinont T, Tansakul C, Tanasupawat S, Keeratipibul S, Navarini L, Bosco M, Cescutti P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 1999;51(2-3):105–111.
11. Tiekling M, Korakli M, Ehrmann MA, Gänzle MG and Vogel RF. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(2):945–952.
12. van Geel-Schutten GH, Flesch F, Brink ten B., Smith MR, Dijkhuizen L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998;50(6):697-703.
13. Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014;63:133– 139.
14. Zhang L, Liu C, Li D, Zhao Y, Zhang X, Zeng X, Yang Z, Li S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013;54:270– 275.

Стаття надійшла до редакції 20.11.2017 р.

