

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА»

На правах рукописи



**ФОКИНА НАДЕЖДА АЛЕКСАНДРОВНА**

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ  
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И  
ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор Карпунина Л. В.

Саратов – 2021

## Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	11
1.1. Экзополисахариды микробного происхождения (структура и физико – химические свойства).....	11
1.2. Функциональная роль экзополисахаридов бактерий.....	17
1.3. Применение экзополисахаридов бактерий.....	23
2. Экспериментальная часть.....	35
2.1. Объекты и методы исследований.....	35
2.1.1. Объекты исследований.....	35
2.1.2. Среда, используемые для культивирования бактерий.....	39
2.1.3. Выделение и очистка экзополисахаридов.....	39
2.1.4. Определение белка.....	40
2.1.5. Определение углеводов.....	40
2.1.6. Определение нуклеиновых кислот.....	40
2.1.7. Определение молекулярной массы экзополисахаридов.....	40
2.1.8. Определение химической природы экзополисахаридов.....	40
2.1.9. Определение моносахаридного состава экзополисахаридов.....	41
2.1.10. Определение вязкости растворов экзополисахаридов.....	41
2.1.11. Моделирование ожогов у крыс.....	42
2.1.12. Определение живой массы и микробиологических показателей сельскохозяйственной птицы.....	42
2.1.13. Статистическая обработка.....	43
2.2. Результаты исследований и их обсуждение.....	44
2.2.1. Влияние условий культивирования (источник углерода и время) на продукцию экзополисахаридов <i>L. lactis</i> B-1662 и <i>S. thermophilus</i> .....	44
2.2.1.1. Продукция экзополисахаридов в зависимости от источника углерода и времени культивирования <i>L. lactis</i> B-1662.....	45

2.2.1.2. Продукция экзополисахарида в зависимости от источника углерода и времени культивирования <i>S. thermophilus</i> .....	48
2.2.2. Выделение и очистка экзополисахаридов <i>L. lactis</i> В-1662 и <i>S. thermophilus</i> .....	50
2.2.2.1. Выделение и очистка экзополисахарида <i>L. lactis</i> В-1662.....	50
2.2.2.2. Выделение и очистка экзополисахарида <i>S. thermophilus</i> .....	52
2.2.3. Физико-химическая характеристика экзополисахаридов <i>L. lactis</i> В-1662 и <i>S. thermophilus</i> .....	55
2.2.3.1. Физико-химическая характеристика экзополисахарида <i>L. lactis</i> В-1662.....	55
2.2.3.2. Физико-химическая характеристика экзополисахарида <i>S. thermophilus</i> .....	61
2.2.4. Изучение влияния экзополисахаридов <i>L. lactis</i> В-1662 и <i>S. thermophilus</i> на заживление ран при моделировании ожогов у крыс.....	67
2.2.5. Изучение влияния экзополисахарида <i>S. thermophilus</i> на организм сельскохозяйственной птицы.....	74
Заключение.....	79
Выводы.....	83
Список сокращений и условных обозначений.....	84
Список литературы.....	85

## Введение

**Актуальность темы.** Среди биополимеров бактериального происхождения особое место занимают экзополисахариды (ЭПС), которые хорошо зарекомендовали себя в различных областях деятельности человека: медицине, ветеринарии, нефтяной, пищевой промышленности, в сельском хозяйстве (Онищенко и др., 2002; Перепелкин, 2005; Ботина, Рожкова, Семенихина, 2010; Сопрунова, Виет Тиен, 2010; Глоба, Гвоздяк, 2015; Сенник, 2015; Ширококов, 2015; Лавина и др., 2016; Ибрагимова, Фомкина, 2016; Пархоменко, 2019). Известно, что полисахариды бактерий обладают реологическими, иммунностимулирующими, ранозаживляющими, пленкообразующими и другими свойствами (Бухарова и др., 2009; Полукаров, 2009; Ботина, Рожкова, Семенихина, 2010; Правдивцева, Карпунина, Бухарова, 2012; Ревин и др., 2018). Экзопалисахариды бактерий в отличие от большинства химически созданных полимеров, являются биоразлагаемыми и не вредят экологии (Muhammadi, Ahmed, 2008).

Исходя из этого, изыскание новых продуцентов ЭПС бактериального происхождения является приоритетной задачей в настоящее время.

**Степень разработанности темы исследования.** Источником получения ЭПС являются многие бактерии (Няникова и др., 2002; Рысмухамбетова и др., 2008; Лахтин и др., 2012; Ксенофонтов и др., 2015; Кичемазова и др., 2017; Boyd, 1995; Garcia - Ochoa, 2000). К бактериям, способным продуцировать ЭПС, относятся и молочнокислые микроорганизмы (Новик, 2002; Ганина, Рожкова, 2005; Абрамова, Семенихина, 2008; Еникеев, 2011; Красникова, Маркелова, 2013; Хохлачева, 2015; Артюхова, Меньших, 2016; Кебекбаева, Молжигитова, Джакибаева, 2017; Kitazawa, 1996; Savadogo et al, 2004; Paulo et al., 2012; Zeidan et al., 2017). Среди них можно выделить бактерии рода *Lactococcus* и *Streptococcus* (Cerning, 1988; Deveau, 2002; Yuksekdag, 2008), представители которых входят в состав нормальной микрофлоры человека и животных (Хавкин, Бельмер, 2003; Макарова,

Намазова – Баранова, 2015; Beasley, Saris, 2004), а также входят состав заквасок при производстве кисломолочной и мясной продукции (Рожкова, 2006; Стоянова, 2008; Орлова, Иркитова, 2014; Ханхалаева, Митыпова, 2014; Артюхова, Моторная, 2015; Хохлачева, 2015; Иркитова, 2017). Однако роль этих биополимеров является не до конца изученной. Для обоснования принципа воздействия ЭПС молочнокислых бактерий на живой организм, необходимо иметь более обширные знания об их строении, физико - химических и биологических свойствах (Zeidan et al., 2017).

В связи с этим исследования, посвященные изучению физико-химических и биологических свойств экзополисахаридов молочнокислых бактерий рода *Lactococcus* и *Streptococcus*, являются актуальными и могут иметь значительный научный интерес и прикладное значение.

**Цель работы** состояла в оптимизации условий культивирования *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus* для обеспечения максимального выхода ЭПС, их выделении, характеристике и перспективах использования.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать условия культивирования (источник углерода, время культивирования) *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, для обеспечения максимального продуцирования ими экзополисахаридов.
2. Выделить и очистить экзополисахариды из бактерий *L. lactis* В-1662 и *S.thermophilus*.
3. Определить физико-химические свойства (молекулярную массу, химическую природу, углеводный состав, вязкость) экзополисахаридов *L.lactis* В-1662 и *S thermophilus*.
4. Изучить влияние *in vivo* *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран у экспериментальных животных (крыс).

5. Изучить влияние ЭПС *S. thermophilus* на организм сельскохозяйственной птицы (прирост живой массы птицы и микрофлору) при добавлении в корм.

### **Научная новизна**

Впервые выделены ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, определены их молекулярные массы, химическая природа, моносахаридный состав и вязкость. Показано, что *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* максимально продуцируют экзополисахариды на питательной среде А.Welman с соавт. (2003) с сахарозой в нашей модификации при 27 °С, рН 5,5 на 48 ч культивирования – *L. lactis* В-1662; при 38 °С, рН 5,5 на 48 ч культивирования – *S. thermophilus*. Показано влияние ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран у крыс, в большей степени проявляющееся у ЭПС стрептококка. Обнаружено, что добавление в корм сельскохозяйственной птицы ЭПС *S. thermophilus* способствует увеличению массы тела и количества молочнокислых бактерий.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Полученные результаты вносят значимый вклад в фундаментальные исследования экзополисахаридов бактериального происхождения и открывают перспективы их возможного использования в экспериментальной биологии, ветеринарии и сельском хозяйстве.

По материалам диссертационной работы получен патент на изобретение «Способ выращивания цыплят-бройлеров» (№ 2736967 от 23.11.2020), опубликованы «Методические рекомендации по изучению влияния условий культивирования молочнокислых бактерий на их способность образовывать биоплёнку» (в соавторстве с А.Ю. Тяпкиным, Г.Т. Урядовой, Л.В. Карпуниной, 2019) для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, сотрудников микробиологических и биотехнологических лабораторий, рассмотренные и одобренные на заседании кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» (протокол № 16 от 28 апреля 2019 г.);

«Методические рекомендации по изучению влияния экзополисахаридов молочнокислых бактерий и пленочных покрытий, созданных на их основе, на заживление ожоговых ранений у лабораторных животных» (в соавторстве с Г.Т. Урядовой, Л.В. Карпуниной, 2020) для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, сотрудников микробиологических, биотехнологических и ветеринарных лабораторий, рассмотренные и одобренные на заседании кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» (протокол № 16 от 28 апреля 2020 г.). Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций по микробиологии, биотехнологии, проведении лабораторно-практических занятий и написании дипломных работ в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

**Методология и методы исследования.** Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам выделения и очистки экзополисахаридов, изучению их химического состава, физико-химических и биологических свойств. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы. При проведении исследования и изложения материала были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Оптимальными условиями культивирования для продукции экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* являются: инкубирование на модифицированной питательной среде A.Welman с соавт.

(2003) с сахарозой рН 5,5, время культивирования 48 ч при 27 °С и 38 °С соответственно.

2. Выделенные из культуральной жидкости ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* представлены одной нейтральной фракцией с молекулярными массами 10 кДа и 20 кДа соответственно. ЭПС *L. lactis* В-1662, состоит из глюкозы, ксилозы в соотношении 1:1 и следовых количеств рамнозы (5,8%); обладает вязкостью 1,3 мм<sup>2</sup>/с. ЭПС *S. thermophilus*, состоит из рамнозы, галактозы, маннозы в соотношении 1:2:1 с присутствием следов глюкозы (4,4%); обладает вязкостью 1,23 мм<sup>2</sup>/с.

3. Экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* обладают ранозаживляющим действием при ожогах у крыс, более выраженный эффект проявляет ЭПС *S. thermophilus*.

4. Добавление ЭПС *S. thermophilus* в корм сельскохозяйственной птицы способствует увеличению массы тела и количества молочнокислых бактерий у них.

**Работа выполнена** на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

#### **Степень достоверности и апробация работы**

Степень достоверности результатов обеспечена использованием стандартных биологических, микробиологических, биохимических, физико-химических методов исследований и методов статистической обработки данных.

Материалы диссертации были представлены на: конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы (Саратов, 2011; 2015-2018); IV Всероссийской школе – конференции «Химия и биохимия углеводов» (Саратов, 2011); «Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы»

(Саратов, 2014); Всероссийском конкурсе научно-технического творчества молодежи «НТТМ-2015» (Москва, 2015), Ежегодной Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2015); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий» (Саратов, 2016); VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2016); Международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии». (Саратов, 2017); 1-м Российском микробиологическом конгрессе (Москва, 2017); IV Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Москва, 2017); 22-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы пищевых и биотехнологии» (Саратов, 2019); Национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения» (Саратов, 2020); 24-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2020); Международной научной конференции PLAMIC 2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 22 работы, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе данных Scopus и 1 патент.

**Личный вклад соискателя** состоит в подготовке и проведении научных исследований на всех этапах выполнения диссертационной работы, трактовке полученных результатов, оформлении патента и подготовке публикаций, участии в конференциях.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, двух глав: обзора литературы и экспериментальной части, включающей объекты и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста и включает 7 таблиц и 15 рисунков. Список литературы включает 230 наименований, в том числе 99 отечественных, 131 зарубежных.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Экзополисахариды микробного происхождения (структура и физико-химические свойства)

Широкое распространение среди биополимеров занимают экзополисахариды микробного происхождения (Ботвинко, 1985; Новик и др., 2002, Няникова и др., 2002; Ганина, Рожкова, 2005; Рысмухамбетова и др., 2008; Лахтин и др., 2012; Ксенофонов и др., 2015; Кичемазова и др., 2017; Boyd, 1995; Garcia-Ochoa, 2000; Vaningelgem, 2004). Понятие «экзополисахариды» (exopolysaccharide) [греч. ехо – вне, снаружи, poly – много, многое и sakcharon – сахар] – высокомолекулярные соединения с разнообразным углеводным составом, состоящие из остатков моносахаров, образующие линейные или разветвленные цепи посредством гликозидных связей (Кочетков, 1967; Колешко, Завезенова, 1999). Экзополисахариды выделяются бактериями в окружающее их пространство и относятся к внеклеточным полисахаридам. Некоторые из ЭПС могут акцентироваться микробами на внешней стороне клетки, формируя при этом совместно с гликопротеидами капсульную оболочку. Таким образом, сформированная капсула соединена ковалентными связями с клеточной поверхностью, а также экзополисахаридами, образующими слизистый слой (Zhang et al., 1998; Chapot-Chartier, 2014; Tytgat, Lebeer, 2014; Schmid, Sieber, Rehm, 2015; Mistou, van Sorge, 2016). Также ЭПС могут располагаться в виде слабо связанных с клеткой слизей (Sanchez et al., 2006). Эти внеклеточные полисахариды различимы своим строением и способностью проникновения в окружающую среду. Распределенные на наружности микробных клеток полисахариды могут являть собой рыхлые пласты в сочетании с водной фракцией, с низко – и высокомолекулярными группировками. Также, у многочисленных капсул обводненные полисахариды могут находиться в полутвердом состоянии (Zhang, Bishop, Kupferle, 1998). Термин «экзополисахариды» применяют в основном к полисахаридам свободной

слизи и капсульным полисахаридам (Ботина, Рожкова, Семенихина, 2010). ЭПС входят в состав живой клетки, присутствуя в ней как локализованно, так и в ассоциациях с другими нутриентами: липидами, белками, нуклеиновыми кислотами (Zhang, Bishop, Kupferle, 1998; Flemming, Wingender, 2001). За последние десятилетия ЭПС приобрели большое практическое значение благодаря разнообразию своего строения, физико-химическим и биологическим свойствам, а также расположению в клетках.

ЭПС, продуцируемый молочнокислыми бактериями, может быть двух типов: слой слизи, который образует коллоидный агрегат в виде аморфного слизистого вещества вокруг клетки, с небольшим или нулевым прилипанием клеток, или форма капсулы, которая является когезионной и прилипает к клетке (Boels et al., 2001).

Согласно работам J.W. Sutherland (1982), а также J. Cerning, I.H. Roissart, F.M. Luquet (1994), A. Boyd, A.M. Chakrabarty (1995), F. Bouzar, J. Cerning, M. Desmazeaud (1997), L. de Vuyst, B. Degeest (1999), И.А. Хусаинов (2014) ЭПС образуют две группы. Первая группа представлена гомополисахаридами ( $\alpha$ -D-глюканы,  $\beta$ -D-глюканы, фруктаны и полигалактаны), состоящими из повторяющихся моносахаров одного вида. Такие ЭПС имеют большой молекулярный вес, который превышает  $5 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$  Да. Имеются литературные данные, показывающие большое разнообразие молекулярных масс, в частности у *Streptococcus thermophilus*, в диапазоне от 10 до  $> 2000$  кДа (Vaningelgem, 2004). Самым распространенным примером является декстран (Finore, 2014). Вторую группу представляют гетерополисахариды, которые составлены из повторных единиц различных моносахаридов в диапазоне от двух до восьми. В состав гетерополисахаридов входят следующие мономеры, к которым относятся глюкоза, галактоза, рамноза, манноза, N-ацетилглюкозамин, глюкуроновая кислота. В некоторых случаях встречаются фосфаты, ацетил, глицерин (de Vuyst, Degeest, 1999; Ruas-Madiedo, Hugenholtz, Zoon, 2002). Остатки фосфорной, серной, янтарной,

уксусной и пировиноградной кислот также встречались в ЭПС (Kenne, Lindberg, 1983).

Экзополисахариды отличимы друг от друга по фракционному составу. Нейтральные фракции образуются не только карбонильными и спиртовыми группами, но также аминсахарами, имеющими помимо карбонильных и спиртовых групп вдобавок и аминогруппу. Она и задает основные свойства этих соединений. Кислые же фракции содержат добавочные карбоксильные группы. При нахождении карбоксила на удаленном расстоянии от альдегидной группы образуются полисахариды, относящиеся к уроновым кислотам.

Согласно классификации (Sutherland, 1982) микробные ЭПС формируют пять групп. Декстраны образуют первую группу, относящуюся к гомополисахаридам. Синтез ЭПС у них возможен лишь в присутствии сахарозы в среде культивирования. На средах с другими сахарами синтез не происходит. Продуцентами в этой группе являются бактерии родов *Leuconostoc* и *Streptococcus* (Burchard, 2005).

Вторую группу образуют гетерополисахариды, у которых необходимость в определенных углеводных компонентах.

Третью группу ЭПС формируют гомополисахариды, состоящие, как правило, из углеводов (бактериальная целлюлоза), а также содержащие ацильные группы, для биосинтеза которых требуются различные углеводные источники.

Четвертая группа представлена гетерополисахаридами с повторяющимися звеньями. Это самая многочисленная группа. Ксантан – самый известный ее представитель.

К пятой группе относится альгинат, также относящийся к гетерополисахаридам, но не имеющий повторных блоков в своем составе (Худайгулов, Логинов, Мелентьев, 2011). Мономеры двух типов (D-маннуронозная, L-гулууронозная кислоты, O-ацетильные группы) образуют его.

Альгинат отличается от полисахаридов предыдущей группы наличием неповторяющихся звеньев.

Альгиновая кислота образует несколько типов альгинатов с поливалентными металлами. В полных альгинатах с катионами связаны все карбоксильные группы. Данные альгинаты не растворяются в воде. Неполные же альгинаты могут как растворяться так и не растворяться в воде. Следует уточнить, что полные альгинаты одновалентных металлов при растворении в воде образуют хорошо вязкие и клейкие растворы. Растворимость альгинатов обусловлена наличием солей калия, натрия, а также магния и аммония. Если в образовании альгината участвуют катионы одного металла, то образуются монокатионные альгинаты, если катионами нескольких металлов - олиокатионные (Хотимченко и др., 2001; 2005).

Экзополисахариды относятся к биополимерам, существующим в виде линейных или разветвленных структур.

Большинство микробных ЭПС имеют в своем составе схожий ряд моносахаров, таких как D-глюкоза, D-манноза, D-галактоза, D-глюкуроновая кислота, реже – L-рамноза, L-фукоза, крайне редко – D-маннуронозная и L-гулууронозная кислоты. Все же, несмотря на это, свойства этих высокомолекулярных соединений масштабны и многогранны. Это объясняется весомой градацией в элементном составе, а, следовательно, и в физико-химических свойствах (Mack et al., 1996).

Комплектность, а также строение часто указывают на трехмерную локацию полисахаридов (Елинов, 1984; Laws, Gu, Marshall, 2001; Tuinier et al., 2001; Ruas-Madiedo, Hugenholtz, Zoon, 2002).

Первичная структура экзополисахаридов характеризуется содержанием, очередностью и специфичностью связи мономерных составляющих в полисахариде.

Вторичная структура определяется ограниченным распределением полисахаридных цепей в допустимых границах для ковалентного сцепления

мономерных единиц и углов валентности гликозидных связей и, вследствие этого, принимаемой ими конфигурацией. У некоторых полисахаридов, обладающих вторичной структурой, установленная очередность 1,4-  $\beta$ - или 1,3- $\beta$ - связей придает весому жесткость - модуль сдвига (пример, *Xanthomonas campestris*). За счет 1,2- $\alpha$  – либо 1,6-  $\alpha$  – связей полисахариды обладают более пластичной конструкцией, что прослеживается, к примеру, у большинства декстранов (Sutherland, 1997).

Третичная структура обуславливается организованной коммуникацией единичных спиралей с основанием двойных и тройных спиралей, т.е. активно положительной взаимосвязью между цепями полисахарида. Четкость модулирования увеличивается с возрастанием нековалентных соединений и образованием жесткой вторичной структуры, а снижается она со спадом конформационного хаоса, энергии гидратации, электростатического разряжения, структурной хаотичности и разветвлений. Баланс этих сил переменчив и может быть нарушен тепловым воздействием и сдвигом ионного потенциала раствора.

Четвертичная структура экзополисахаридов обозначается созданием агрегатов вследствие коммуникации полисахаридных "глобул" друг с другом, а также с другими полимерными соединениями, имеющими компактную третичную структуру.

В соответствии с функциональными признаками бактериальные ЭПС делятся на несколько классов: структурные, сорбционные, поверхностно-активные, информационные, с окислительно - восстановительной активностью, нутриционные (Flemming, Wingender, 2010; Zeidan et al., 2017).

Как правило, структура веществ, в данном случае биополимеров предопределяет его свойства, в первую очередь физико-химические. Изучение этих свойств необходимо с целью дальнейшего применения в различных сферах деятельности человека конкретно под их потребности. Ведь только изучив физико-химическую характеристику того или иного

компонента, возможно дальнейшее его апробирование. Это касается и бактериальных ЭПС (Cuadros, 2017; Costa, Raaijmakers, Kuramae, 2018). Проводится большая работа по изучению, как давно используемых, так и недавно полученных ЭПС среди отечественных и зарубежных исследователей.

Микробные внеклеточные гетерополисахариды – это в основном линейные молекулы, к которым через равные промежутки времени присоединяются боковые цепи различной длины и сложности. Изучение "семейств" микробных экзополисахаридов с близкородственными структурами позволяет определить влияние незначительных (или крупных) изменений структуры на физические свойства этих макромолекул.

У большинства экзополисахаридов выделяют полезные вязкоупругие свойства при их растворении в воде в очень низкой концентрации. Вязкие в стабильном состоянии, но становящиеся более жидкими при малейшем движении, используются для размешивания или взбалтывания в качестве лосьонов, очищающих средств и красок. Такое свойство называется псевдопластичностью; изучение таких материалов называется реологией. У растворов ЭПС вязкость является важной реологической характеристикой. Результат вязкости – меняющийся признак, который зависит от сущности производителя, химической составляющей, строения молекулы и внешних причин, таких как концентрация вещества, pH, температура, давление и др. (Гвоздяк, Матышевская, 1989).

Так, экзополисахариды, синтезируемые молочнокислыми бактериями во время ферментации, значительно влияют на реологию кислых молочных гелей с отвердеванием и суспензий кислых гелей, полученных из гелей при перемешивании (Girald, Schaffer-Lequart, 2007; Mende et al., 2012; Nachtigall et al., 2019; Surber, Jaros, Rohm, 2020).

Среди микроорганизмов основными продуцентами ЭПС, помимо грибов, являются бактерии, в том числе молочнокислые (Елинов, 1995; Новик и др.,

2002, Няникова и др., 2002; Ганина, Рожкова, 2005; Paulo et al., 2012; Zeidan, 2017).

Структурная информация этих широко разнообразных биополимеров представлена моносахаридным составом, аномальными конфигурациями, типом гликозидных связей, наличием повторяющихся единиц и некарбогидратных заместителей и, наконец, представлением химической молекулярной структуры или композитной модели (Zeidan et al., 2017). Молочнокислые бактерии имеют большой разброс в образовании ЭПС с точки зрения химического состава, количества, размера молекул, заряда, наличия боковых цепей и жесткости молекул (Zannini et al., 2016). Однако среди многообразия продуцентов ЭПС молочнокислые бактерии не теряют актуальность до сих пор.

## **1.2. Функциональная роль экзополисахаридов бактерий**

В природе микробные экзополисахариды выполняют определенные функции. В первую очередь, это защитная, от агрессивного воздействия на клетку окружающей среды. Экзополисахариды непосредственно участвуют в колонизации бактерии, образуя биопленочный матрикс (Decho, 1990; Decho, Herndl, 1995; Flemming, Neu, Wozniak, 2007; Dufour, Leung, Lévesque, 2010), который защищает от пересушивания, замерзания и перепадов температур, pH. Микроорганизмы прикрепляются к поверхностям и образуют биопленки. В пленках экзополисахариды осуществляют особую функцию, которая заключается в инактивации химических соединений, а также воздействуют на специфичность образуемых ими биопленок (Mosharaf et al., 2018). Связанные с биопленкой клетки можно дифференцировать от их суспендированных аналогов путем генерации матрицы внеклеточного полимерного вещества (ЭПС), снижения скорости роста, и повышения, и понижения уровня специфических генов. Присоединение представляет собой сложный процесс, регулируемый различными характеристиками питательной среды, субстрата и клеточной поверхности. Установленная структура

био пленки включает микробные клетки и ЭПС, имеет определенную архитектуру и обеспечивает оптимальную среду для обмена генетическим материалом между клетками. Клетки могут также обмениваться информацией через кворум, что, в свою очередь, может влиять на процессы био пленки, такие как отслоение (Rodney, 2002).

За счет реологических свойств эти метаболиты могут использоваться в качестве естественных заменителей синтетическим полимерам в процессах загустевания (Дробот, Гринберг, 1983; Sikkema, Oba, 1998; Looijesteijn et al., 1999).

Также экзополисахариды принимают участие в межклетном соединении клеток, защищают их от замерзания и высушивания, становятся причиной патогенности и вирулентности, дополнительных источников углерода и т. д. (Nwodo, Green, Okoh, 2012; Kanekar et al., 2017; Casillo et al., 2018).

Названные, таким образом, структурные и структурно-метаболические экзополисахариды являются составной частью клеточной стенки, что определено генетически. Первые представители, формируют негибкий остов клеточной стенки, вторые выполняют функцию «специфичности», определяющую антигенные свойства у каждого вида (Bach, Gutnick, 2005).

При увеличении продукции структурно-метаболических полисахаридов образуется капсула большего или меньшего размеров, а также происходит накопление полимера в культуральной жидкости. В случае накопления полисахарида он причисляется к ряду внеклеточных, к числу которых относятся собственно внеклеточные полисахариды (ВПС). Иной раз ВПС трактуют как следствие повышенной продукции биополимеров клеточной стенкой (Kleerebezem et al., 1999).

Внеклеточные экзополисахариды, также обладают антигенными свойствами, что придает устойчивость бактерий к фагам и действию других микробов, веществ, вирусов. Ранее исследователями Н. Mizuno et al. (2020) была описана способность ЭПС, полученных из *Streptococcus thermophilus*,

модулировать иммунную систему слизистых оболочек. Роль ЭПС в модуляции противовирусного иммунного ответа в клетках P1E была подтверждена сравнительными исследованиями бесклеточных культуральных супернатантов и ферментированного обезжиренного молока, полученного из *S. thermophilus* ΔepsB и ΔepsC. Эти результаты предполагают, что бактериальная культура *S. thermophilus* ST538 может быть использована в качестве иммунобиотического штамма для разработки новых иммунологически функциональных пищевых продуктов, которые могут способствовать повышению устойчивости к вирусным инфекциям.

Определено, что серологическая специфичность большинства микроорганизмов определяется как полисахаридами наружной мембраны, так и капсульными полисахаридами. Это достигается за счет сосредоточения их на поверхности клетки. Отсюда идет формирование механизмов иммунных ответов хозяина. Таким образом, данные полисахариды владеют исключительными фармакологическими и иммунохимическими свойствами (Проскуракова и др., 2015).

Внутриклеточные полисахариды, помимо того, что могут обладать основной запасной функцией, также способны выполнять регуляторную функцию в механизмах, отвечающих за деление и рост клеток (Вудсайд, 1977; Захарова, Косенко, 1982).

Связанные с клеточной поверхностью полисахариды играют важную роль во взаимодействиях между бактериями и их средой. Они выполняют множество функций таких, как поддержание формы и структурной целостности клеток, заряд и катионный гомеостаз, защита от неблагоприятных условий, таких как высыхание, токсичные соединения (соли желчных кислот, гидролизующие ферменты, например, лизоцим, желудочные и панкреатические ферменты, ионы металлов, антибиотики, этанол и т. д.) и антибактериальные стрессы (изменение pH, осмолярность и газовая атмосфера), хищничество простейшими, уклонение от иммунной

системы и атака фагов (Ермольева, Вайберг, 1976; Donot et al., 2012; Patel, Prajapat, 2013; Caggianiello, Kleerebezem, Spano, 2016). Было установлено, что капсульные полисахариды и экзополисахариды играют важную роль во взаимодействиях бактерий и хозяев, а именно в облегчении колонизации благодаря их способности прилипать к поверхностям (например, адгезии к эукариотическим клеткам и слизистой оболочке) и в микробной опосредованной иммуномодуляции (Mazmanian, Kim, 2006; Caggianiello, Kleerebezem, Spano, 2016). Кроме того, ЭПС играют ключевую роль в бактериальных биопленках (Flemming, Wingender, 2010). До настоящего времени полное понимание биологических функций внеклеточных полисахаридов, и особенно ЭПС, не было получено.

Среди непатогенных видов бактерий также распространено капсулообразование, как характерный признак, указывающий на присутствие у капсульных полисахаридов довольно обширного диапазона функций. Капсульная материя у данных микроорганизмов защищает их от влияния ингибирующих веществ, антибиотиков, которые выделяются в среду обитания другими конкурирующими видами. Наряду с этим, капсула выполняет регуляторную роль, обеспечивающую избирательную абсорбцию конкретных веществ из окружающего места обитания и выделение за границы клеточного пространства подлежащих утилизации продуктов жизнедеятельности. Капсульные полисахариды создают клеткам оптимальные окружающие ее условия и препятствуют их взаимному притяжению и контакту, что, в свою очередь, поддерживает сорбционную способность клетки в динамичном статусе (Горин, Свиридов, Бабьева, 1979; Смолькина и др., 2010). Рецепторная функция капсульных полисахаридов реализуется за счет блокирования реакции агглютинации, ингибиции фагоцитоза, а также связывания внешних конструкций клеток с ферментом, бактериофагами и бактериоцинами. Отмечено, что радиорезистентность у капсулированных клеток выше, чем у клеток, не имеющих капсул.

Существенной является трофическая функция экзополисахаридов. Так, некоторые бактерии, могут употреблять в качестве источников питания как собственноличные, так и секретируемые в окружающую среду экзополисахариды других микроорганизмов (Мальцева, 1981; Кочетков, 1994).

Обволакивающая способность полисахаридов для организма является причиной заторможенного движения пищевых элементов по кишечнику, содействующего их лучшему расщеплению и всасыванию а, значит, и лучшему их усвоению.

Выявленная пребиотическая роль состоит в том, что некоторые экзополисахариды являются причинами для роста в организме стрептококков и бифидобактерий. Так, из некоторых материалов следует, что при нахождении экзополисахаридов количество этих бактерий увеличивается в 5-10 раз. Тогда как, обширное освоение кишечника молочнокислыми бактериями создает условия для вытеснения группы патогенных агентов, включая гнилостных. Отсюда следует формирование крепкой иммунной системы. Значительное освоение кишечника молочнокислыми микроорганизмами наряду с влиянием их полисахаридов на становление слизистой структуры, формирующей стенку кишечника, содействует улучшению насыщения организма кальцием. Также отмечено, что полисахариды с числом углеводных частей, равных 15-22, разлагаются в нижних отделах толстого кишечника под влиянием микробиоты до коротких цепочек жирных кислот (ацетата, пропионата, масляной, валериановой и др.). Перечисленные кислоты выполняют особенную функцию в обмене веществ животных и птицы.

Установлено, что ЭПС обладают криопротекторными свойствами (Беседнова и др., 2018). Так экзополисахариды, выделенные из бактерий рода *Pseudoalteromonas spp.* имеют ряд свойств, полезных для кожи. Благодаря им кожный покров становится более устойчивым к холоду, быстрее

возрождается и регенирируется. Есть мнение о том, что раз эти бактерии приспособляются к жизни в негативных условиях пребывания, таких как высушивание, внезапная разность температур, высокое атмосферное давление, то отсюда выявляются предполагаемые уникальные свойства ЭПС, выделенных из них (Poli, Anzelmo, Nicolaus, 2010). В числе последствий биологического синтеза обнаружен также ряд группировок, имеющих иммунокорректирующие, антифлогистические, антивирусные и противобактерийные свойства (Михайлов, 2005).

Создание концепции контролируемой доставки медикаментозных препаратов, а также микро - и наночастиц предоставило новые возможности для применения ЭПС и их вторичных структур. Прикладной аспект обеспечивается вследствие того, что они являются нетоксичными, биоразрушаемыми. В этой связи, они могут являться полноценной сырьевой платформой для промышленного изготовления лекарственных, а также вакцинных препаратов.

По результатам широкого спектра научных изысканий напечатано большое количество работ, подтверждающих высокий антиоксидантный потенциал ЭПС (Priyanka et al., 2015; El Bakash et al., 2016; Wu et al., 2016).

Противоопухолевые свойства были обнаружены у *Bacillus marinus* (El Bakash, El Sayed, El Kaderetal, 2015), *Alteromonas infernus* (Roge et al., 2004; Chopin et al., 2015), *Pseudomonas* sp. (Matsuda, Shigeta, Okutani, 1999), *Bacillus lichineformis* (Arena et al., 2006). С. Gugliandolo et al. (2015) было исследовано ингибирующее действие экзополисахаридов *B.lichiniformis* в отношении вирусов.

Так, А.К. El Essawyetal (2016) были обнаружены антимикробные свойства экзополисахарида, полученного из *Klebsiella* sp.

С позиции физической химии и иммунологии полисахариды микроорганизмов рассматриваются как динамичные соединения, которые без труда вступают во взаимодействие с другими высокомолекулярными, а также

и с низкомолекулярными соединениями в том случае, когда у них находятся легкодоступные места для сцепления с ионными и водородными, либо лиофобными связями. Ввиду маленького суммарного заряда собственных молекул полисахаридов предусматривается, что формирование полимерного комплекса происходит за счет ковалентных связей и сил Ван-дер-Ваальса, различимых по силе – от слабых до сильных.

Экзополисахариды бактерий являются группой очень многообещающих стимуляторов защитных сил организма. Например, при изучении экзополисахаридов бактерий *Paenibacillus polymyxa* было показано, что они имеют противовирусные и противораковые свойства. К тому же они оказывают превентивное действие при моделировании эксперимента в рамках стафилококковой инфекции и продлевают влияние лекарственных соединений, повышая неспецифическую резистентность организма (Егоренкова и др., 2009).

Было показано, что LAB-EPS (ЭПС лактобактерий) и бифидо-EPS (ЭПС бифидобактерий) обладают различными физиологическими функциями, такими как антиоксидантная, противораковая, антибактериальная и иммунологическая активность, среди которых иммунорегуляторная активность в последние годы привлекает множество научных интересов. Как правило, эти функции тесно связаны с химическим составом и конфигурацией ЭПС (Xu et al., 2019). Потому важно их дальнейшее изучение.

### **1.3. Применение экзополисахаридов бактерий**

Благодаря своим многочисленным свойствам бактериальные экзополисахариды нашли применение в ветеринарной практике, медицинской сфере, фармацевтике, пищевой, косметической, нефтедобывающей индустриях, аграрном секторе (Миронов, 2002; Логинов и др., 2009; Atlas, 1995; Poland, Riddle, Zeeb, 2003; Ciofani et al., 2008).

Перечисленные сферы деятельности нуждаются в ЭПС с определенной структурой, моносахаридным составом и свойствами, а также вариациями их применения. Будет ли это порошок, пленка, волокна, растворы различной вязкости. Многообразие продуцентов микробного происхождения делает перспективным для исследователей их дальнейшее применение.

К экзополисахаридам, применяемым в отраслях хозяйствования, можно отнести, например, ксантан, декстран, велан, бактериальную целлюлозу. Также следует назвать антарктицин, Seafill и др.

*Антарктицин* – это экзополисахарид, гликопротеин, имеющий в своем составе пептиды и моносахариды, извлекаемый путем ферментативного брожения клеток бактерии *Pseudoalteromonas antarctica* NF3, живущей в ледниках Антарктиды. Эти микроорганизмы являются классом, относящимся к экстремофилам. Есть мнение, что при использовании на коже экзополисахаридов, полученных из данных микроорганизмов, они передают ей часть своих полезных свойств. К примеру, под их влиянием она становится более холодоустойчивой, и что самое важное, регенерируется, возобновляется.

Благодаря регенерирующему эффекту антарктицин особо рекомендован в качестве ухаживающего средства за чувствительной кожей. Также его следует применять для повышения прочности и восстановления сухой и поврежденной кожи. К тому же он способствует ускоренному затягиванию раневых поверхностей, порезов, последствий угревых воспалений. Всего прочего является действенным предупреждающим средством против морщин и также для ухода за кожей с первыми признаками старения. Его включают в следующие линейки косметической продукции: уходовые кремы, как для чувствительной кожи, так и для зрелой кожи, антивозрастные сыворотки, протективные средства (от холодового стресса, ультрафиолетового излучения и т.д). К тому же он может применяться в форме эмульсий, лосьонов, гелей, сывороток и остальных косметических форматах. Благодаря

омолаживающему, защитному, морозоустойчивому эффектам, антарктицин может быть включен в состав новых ухаживающих средств с максимально возможной концентрацией, разрешенной Регламентом Европейского Союза для этого элемента в готовых косметических продуктах, 12%.

*Экзополисахариды морских бактерий.* Для получения экзополисахаридов из морских бактерий используют морские бактерии родов: *Bacillus*, *Holomonas*, *Planococcus*, *Enterobacter*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Rhodococcus* и др (Беседнова и др., 2018). За прошедший период исследований в данном аспекте лучше изучены виды родов *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* и *Vibrio* (Senni et al., 2011). Экзополисахариды перечисленных бактерий относятся к капсульным полисахаридам в случае образования ковалентной связи с поверхностью микробной клетки. Также могут иметь вид совсем несвязанных или слабосвязанных с клеточной оболочкой слизи. Либо свободно выделяются в окружающую среду (Heissenberger, Leppard, Hernd, 1996; Manivasagan, Kim, 2014). Преимущества экзополисахаридов морских бактерий по отношению полисахаридов других наземных бактерий, растений, водорослей заключаются в том, что для их получения можно создавать заданные и воспроизводимые условия производства с минимальным воздействием на окружающую среду. В результате на выходе получается ЭПС высокого качества (Moscovici, 2015). Такие ЭПС используют в пищевой, бумажной, текстильной, нефтеперерабатывающей отрасли промышленности, сфере экологии и прочих прикладных областях (Finore et al., 2014). За предыдущие десять лет напечатано большое число публикаций, демонстрирующих высокую противокислительную способность ЭПС, выделяемых морскими бактериями (El Bakash et al., 2016). Такая способность показана при изучении экзополисахарида EPS 273, выделенного из концентрированного изолята морской бактерии *Pseudomonas stutzeri* 273, у которого она обеспечивается за счёт супрессии гидроксильных и супероксидных анион-радикалов (Wu et al.,

2016). Полисахарид имел в своем составе глюкозамин (35,4%), рамнозу (28,6%), глюкозу (27,2%) и маннозу (8,7%). Молекулярный вес полимера составлял около 190 кДа. Антиоксидантная активность также была изучена у трёх ЭПС, выделенных из бактерий, объединенных с морскими водорослями и беспозвоночными животными, которые были установлены как *Alteromonas* sp. PRIM-21 (содержал 2% сульфата), *Nitratireductor* sp. PRIM-24 (содержал 2% сульфата) и *Enterobacter* sp. PRIM-26 (несульфатированный полисахарид) (Priyanka et al., 2015). Экзополисахариды этих микроорганизмов имели антиоксидантную активность, наиболее высокую у PRIM-26 в отношении супероксида (IC<sub>50</sub> 0,33 мг/мл-1) и DPPH (IC<sub>50</sub> 0,44 мг/мл-1).

Бактерии *Paenibacillus ehimensis* IB 739 является продуцентом экзополимера, который обладает весомыми реологическими характеристиками и хорошо растворяется в нефтяных водах, а также водах, обогащенных минералами. Водные 0,1% и 0,25% растворы экзополисахаридов обладают кинематической вязкостью, которая составляет 1,90 сСт и 5,45 сСт соответственно.

ЭПС «*Seafill*» – синтезируемый морскими планктонными микроорганизмами с молекулярной массой больше 1.4 миллионов дальтон, состоящий из галактозы, галактуроновой кислоты, глюкозы, глюкуроновой кислоты и маннозы. Он стимулирует синтез коллагена, гиалуроновой кислоты и эластина, синтез белков дермально-эпидермальной связи, обладает антивозрастным эффектом, что применительно в косметологии.

*Велан* – биполимер, получаемый из бактерий рода *Alcaligenes* (торговое название BIOZAN (Merck and Co., Inc.)). Биополимер конструктивно подобен геллану, но вместе с тем имеет боковые добавочные элементы, состоящие из α-L-рамнопиранозила или α-L-маннопиранозила. Полимер неплохо растворяется в воде, создавая густые растворы, но не растворяется в изопропанолем. При добавлении соли к велану вязкость незначительно снижается.

Указанный полисахарид используется в нефти и газодобывающей отраслях. При соединении с этиленгликолем образуется система велан-этиленгликоль, которая используется в производстве хай-тековых изолировочных материй (Budd, 1995).

*Бактериальная целлюлоза* представляет собой полисахарид, образуемый бактериями рода *Acetobacter xylinum*, в состав которого, в основном, входят микрофибриллы целлюлозы – D-гликан, связанный  $\beta$ -(1,4)-связями. Эти микрофибриллы составлены из смежных цепочек молекул полисахарида, создавая первичную структуру. Результаты средних значений молекулярной масс варьируются в диапазоне 350 – 975 кДа, что соизмеримо с длиной цепочки, вмещающей в себя примерно от 2000 до 6000 остатков глюкозы. Кроме того, эти бактерии могут продуцировать иные полисахариды (Moonmangmee et al., 2002). Некоторые из полимеров также содержат  $\beta$  - D-глюкозу. К ним принадлежат  $\beta$  - (1,2)-D-гликаны и гетерополисахариды (Petroni, Ielpi, 1996). Например, ацетан, складывающийся из центральной цепи  $\beta$ -(1,4)-D-гликана с ответвлениями D-глюкозы, D-маннозы, D-глюкуроновой кислоты, и L-рамнозы (Heim, Cubitt, Tsien, 1995). Следует заметить, что *A. xylinum* являлся одной из основополагающих форм при рассмотрении биопроизводства бактериальных полисахаридов (Callaghan, Benziman, 1984). Бактериальная целлюлоза, синтезируемая *A. xylinum*, идентична растительной целлюлозе клеточной оболочки. Установлено, что при выделении целлюлозы из бактериальной биомассы, она сразу же образует микрофибриллы. Чистота этого полисахарида, который не имеет в своем составе лигнин и другие посторонние вещества, делает возможным применение целлюлозы в медицинской практике. На матрице этого полисахарида выпускается препарат "BioFill", который используется для лечения ожогов, хронических язвенных заболеваний кожи, или кожных трансплантатов (Sutherland, 1998). Искусственная кожа на основе бактериальных экзополисахаридов является проницаемой для кислорода

воздуха, что содействует процессу заживания раневых поверхностей при снижении риска проникновения инфекций (Vandamme, 1994).

*Альгинат* является полисахаридом, продуцируемым бактериями родов *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*. Этот биополимер в своем составе имеет остатки D-маннуроновой и L- гулууроновой кислот. Основным свойством альгината считается способность образовывать чрезвычайно плотные коллоидные растворы, устойчивые к действию кислот. Альгинатные растворы устойчивы при термической обработке и удерживают свои свойства при охлаждении, а также заморозке и последующем размораживании. Также альгинат владеет свойством поглощения воды, равным 200–300-кратному ее количеству с формированием вязких прочных гелей, напорч освобожденных от вкуса, цвета и запаха (Хотимченко и др., 2005).

*Гелланом* именуется полимер линейной структуры с молекулярным весом 500 кДа, обладающий правильным устройством из воссоздающихся мономеров с О-ацетильными группами. Продукентом геллана являются *Sphingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas paucimobilis*). Данный полимер может образовывать водные гели за счет содержания в молекуле геллана О-ацетильных групп (Sutherland, 1998). Гели применяются в качестве дополнительного мощного носителя для транспортирования активных компонентов при терапии, используемой в офтальмологии (Meseguer et al., 1996; Carlfors et al., 1998).

*Ксантан* (ксантановая камедь) синтезируется бактериями *Xanthomonas campestris*. Ксантан имеет в своем составе пентасахаридную цепь, похожую на целлюлозу, и ответвления, отходящие от главной цепочки, составленные маннозой, глюкуроновой кислотой, ацетатом и пируватом. Показатель ветвления и ацетилирования данного полисахарида обуславливается штаммом продуцента, посредством чего биополимер принимает разнообразные параметры и свойства. Так, даже в маленьких дозировках,

ксантан создает супервязкие растворы, характеризующиеся псевдопластичностью. У его растворов реологические свойства остаются стабильными при сдвиге температур и показаний pH. Помимо этого, он устойчив в кислой среде (García-Ochoa et al., 2000).

*Курдлан* является собой 1,3-β-глюкан с молекулярной массой около 74 кДа. Экзополисахариды выделяются из бактерий родов *Rhizobium* и *Agrobacterium*. Полученный полисахарид хорошо растворяется в холодной воде и затем плавно переходит в термически необратимый плотный гель при температуре выше 64 °С. Нагревание курдлана выше указанной температуры приводит к гелеобразованию. Стойкость геля не изменяется в пределах температур 60–80 °С и значительно увеличивается при повышении температуры свыше 120 °С, вместе с тем одиночная спираль полисахарида переходит в тройную. Возвратить такой гель в состояние жидкости можно сдвигом показателя pH в щелочное направление. У данного геля могут варьировать специфические свойства от пластичного студня до ломкого агара (Sutherland, 1998).

*Этаполан* является гетерополисахаридом, имеющим молекулярную массу 1500 кДа. Этот полисахарид имеет в своем составе D-глюкозу, D-маннозу, D-галактозу, L-рамнозу, D-глюкуроновую и пировиноградную кислоты в соотношении 3:2:1:1:1:1. Производителем гликана является *Acinetobacter* sp. В-7005. Полимер владеет свойством отнимать воду в большом количестве (Pirog, Korzh, 2008), что становится перспективным в нефтедобывающей промышленности.

Постоянно возрастает область использования продуктов метаболизма микроорганизмов экстремофильных бактерий.

*Parococcus zeaxanthinifaciens subsp. payriae* в лабораторных условиях штамм RA19 производит 2 экзополисахариды. В первом водорасворимом экзополисахариде содержатся нейтральные сахара, незначительная концентрация уроновых кислот и большое число сульфатных эфирных групп

(до 29%). Высокая степень сульфатации при наличии ацетатных и сукцинатных групп гарантируют хорошую растворимость полисахарида, его гелеобразную структуру. Второй экзополисахарид является гликопротеином, углеводный компонент которого составляют остатки глюкозы, галактозы, рамнозы и фукозы в равных долях. Образуемый *P. zeaxanthinifaciens subsp. payriae* натуральный пигмент зеаксантин, обладает фотосенсибилизирующим эффектом, что используется в составе косметики. Доказано, что экзополимеры таких микроорганизмов характеризуются биологической активностью и могут являться моделью для изучения механизмов стабилизации биомолекул в экстремальных условиях.

Штамм *Azotobacter chroococcum* 76А производит экзополисахарид на среде, содержащей барду, в максимальной концентрации  $44,6 \pm 0,63$  мг / 50 мл. Полученный ЭПС имеет в своем составе углеводы, уроновые кислоты и белки, гулурановую кислоту.

Экзополисахарид, синтезированный *A. chroococcum* 76А из доступных исходных материалов, делает возможным заменить дорогостоящую переработку сельскохозяйственных и пищевых отходов путем их трансформации в продукты с повышенной добавочной стоимостью (Мадалиев, Косимов, Абролов, 2020).

*Paenibacillus mucilaginosus* продуцирует экзополисахариды. Максимальный выход экзополисахаридов достигал 9,55 г/л в питательной среде с 2% мелассы объемом 50 мл с добавлением 0,1% кукурузного экстракта как индуктора синтеза экзополисахаридов при температуре культивирования  $30 \pm 1$  °С, рН среды  $6,0 \pm 0,2$  с внесением 5% инокулята после 24 ч. инокуляции. Полученные результаты исследований являются перспективными при создании технологии производства микробиологических удобрений (Ха и др., 2020).

Создано лечебно-косметическое средство на гелевой основе, включающее в себя агар-агар с биомассой спор бактерий рода *Bacillus* и продуктов их метаболизма.

Экзополисахариды также представлены и в жидкой форме, так называемые «жидкие полисахариды». Полисахариды, входящие в состав комплекса, выступают с функцией стимуляторов для роста молочнокислых бактерий, стрептококков и бифидобактерий. Для лечения диареи, восстановления самочувствия кишечника, повышения невосприимчивости и выносливости, предложено добавление полисахаридов в рацион поросят и телят. «Полис» принимает участие в защите от стресса. Стресс требует от животного больших затрат энергии.

Обнаружено, что употребление полисахаридов в составе кормов (престартер, стартер) для поросят и телят значительно корригирует статус кишечника, устраняет диарею, быстро повышает иммунитет и выносливость. У откормочных поросят и бройлеров повышаются среднесуточные привесы.

Установлено, что при введении в рацион 50-60 г смеси «Полисахариды жидкие» коровам в сухостойном и дойном периодах по стабильному графику, улучшаются показатели здоровья, в том числе состояние печени, суставов, упрощаются отелы, улучшается осеменяемость, нормализуется деятельность рубца, повышаются надои молока, обеспечивается «удержание» молока. Введение в рацион комплекса «Полисахариды жидкие» устраняет перепады молочной продуктивности при смене силоса, снижает стрессовые состояния.

Включение жидких полисахаридов в рацион свиноматок обуславливает нормализацию функции печени, усиливает молочную продуктивность в период лактации и целостность поголовья, повышает оплодотворяемость и поддерживает продуктивность, укрепляет иммунный статус и устойчивость к стрессам (Буряков, Косолапов, 2013; Буряков и др., 2017).

Имеется информация, что значительное количество ЭПС в окружающей среде образуется грамотрицательными бактериями (Ricciardi, Clementi, 2000), которые являются в подавляющем своем большинстве вирулентными, вследствие чего они не могут применяться в медицинских и пищевых целях.

Молочнокислые бактерии, в свою очередь, наоборот, являются наиболее перспективными для получения внеклеточных полисахаридов. Их широко используют в медицинской сфере, индустриальном и сельскохозяйственном сегментах (De Vuyst et al., 2001; Ruas-Madiedo, delos Reyes-Gavilan, 2005).

К молочнокислым бактериям, способным образовывать экзополисахариды относятся бактерии представленных родов: *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (Abbad-Andaloussi et al., 1995; Roberts et al., 1995; Hosono et al., 1997; Van Geel-Schutten et al., 1998).

Декстран образуется бактериями *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptobacterium dextranicum* В-1254. в виде полимера, состоящего из глюкозы. Его молекулярный вес варьируется в диапазоне  $5 \div 10^4$  кДа. Ему присуща низкая вязкость в растворах. За счет этого он широко используется в медицинской практике (Cerning, Roissart, Luquet, 1994; Ricciardi, Clementi, 2000).

Так, декстран с концентрацией 6% и молекулярной массой 25000-75000 Да, получаемый из *L. mesenteroides* NRRL В-512, имеет реологические и осмотические характеристики, сопоставимые с таковыми в плазме крови человека (Carlin, 1976). Образованные декстраном производные применяются при терапии кожных повреждений. На основе декстрана и дополнительного компонента эпихлоргидрина изготавливают искусственную кожу, представляющую собой высокомолекулярное соединение, нерастворимое в воде. Данный комплекс способствует уменьшению времени заживления раневых поверхностей (Lloyd et al., 1998). Регенерирующее свойство было выявлено и у других экзополисахаридов микробного происхождения,

например, (1→3)-β-D-глюкана (Leibovich, Danon, 1980) и (1→3)-β-D-маннана (De Baets, Vandamme, 2001).

Из лактобацилл, к примеру, бактерии *Lactobacillus helveticus* способны выделять ряд полисахаридов с отличным молекулярным составом, но схожим моносахаридным, представленным галактозой и глюкозой. Эти полисахариды используются в форме пребиотических средств.

По результатам исследований D. Thapa с соавт. (2019) у полисахаридов, полученных из *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium*, была показана защитная активность по отношению к генным мутациям, онкологических новообразований, что нашло применение в отраслях с риском возникновения мутаций – химических производствах, атомных станциях.

Для профилактики или снижения воспалительных процессов, связанных с бактериальной инфекцией, в состав косметических и дерматологических средств использовался препарат, содержащий липотейхоевую кислоту или супернатант бактерий родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Streptococcus*.

Ведутся исследования по отбору высокотехнологичных штаммов бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, характеризующихся кислотообразующими и антагонистическими свойствами по отношению к патогенным и условно-патогенным представителям микрофлоры, что, несомненно, важно для нормализации микробиоценозов кожных и слизистых поверхностей человека. Перспективные культуры *B. longum*, *B. lactis*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, выделенные из микрофлоры здоровых людей, характеризуются стойкостью к внешней среде, на их платформе формируются консорциумы микроорганизмов со специфической активностью и высокой технологичностью.

Экзополисахариды, продуцируемые молочнокислыми бактериями (LAB) и *Bifidobacteria* широко используются в качестве заквасок, чтобы сделать

ферментированную пищу и продукты из-за их технологических преимуществ. Кроме того, было показано, что LAB-EPS и бифидо-EPS обладают различными физиологическими функциями, такими как антиоксидантная, противораковая, антибактериальная, антимуtagenная активность иммунологическая иммунорегуляторная активность, в том числе иммунорегуляторная активность (Sreekumar, Hosono, 1998).

Как правило, эти функции тесно связаны с химическим составом и конфигурацией EPS (Xu et al., 2019).

Таким образом, как показывают литературные данные, необходимость в изучении ЭПС молочнокислых бактерий остается актуальным и востребованным направлением.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Объекты и методы исследований

#### 2.1.1. Объекты исследований

В работе применяли молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* В-1662, предоставленные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пушкино) и *Streptococcus thermophilus*, полученные из ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (г. Москва).

Бактерии рода *Lactococcus* относятся к группе грамположительных неспорообразующих клеток сферической или овальной формы размером 0,5-1,2 x 0,5-1,2 мкм. При выращивании их на питательных средах они располагаются в парах виде коротких цепочек, эндоспор не образуют, капсул не имеют, неподвижные. Эти бактерии принадлежат к группе факультативных анаэробов. По своему питанию лактококки требовательны к полноценным средам, обогащенным комплексными веществами. Обмен веществ у лактококков зимотического типа. Сбраживают углеводы с образованием в основном L (+)-молочной кислоты, но не газа. Каталазо- и оксидазоотрицательные. Оптимальная температура для роста лактококков – 30 °С. Растут при 10 °С, но не при 45 °С; не растут в присутствии 0,5% NaCl. Обычно относятся к серологической группе Lancefield N. Обнаружены в молочных и растительных продуктах. Лактококки не патогенны (Определитель бактерий..., 1997). В окружающей среде молочнокислые бактерии обнаруживаются на растительных поверхностях листьев, фруктов, овощей, зёрен, а также в скисшем молоке; на кожных и слизистых покровах человека, животных, птиц, рыб. Стало быть, не считая своего участия в пищевом и кормовом производствах, молочнокислые бактерии выполняют очень значимую функцию в органическом мире, агропромышленном комплексе и правильном функционировании жизненных циклов человека и животных.

*Lactococcus lactis* – неподвижные клетки кокковой формы, неспорообразующие, хорошо поддаются окраске по Граму и анилиновым красками, на начальной фазе роста имеют форму стрептококка. На мясо-пептонной среде растут в виде точечных круглых колоний, в толщине агара – чечевицеобразных колоний. *L. lactis* ферментирует сахар до двух молекул молочной кислоты без газобразования. Лактококк широко используется в производстве кефира и сыра, но также известен как первый генетически модифицированный организм для лечения заболеваний человека (Braat et al., 2006). *L. lactis* в целом признан безопасным (GRAS). Было показано, что *Lactococcus lactis* является перспективным кандидатом для доставки функциональных белков из-за его неинвазивных и непатогенных свойств (Varma et al., 2013).

Бактерии рода *Streptococcus* (семейство *Streptococcaceae*; от греч. στρεπτός – «цепочка» и греч. κόκκος – «зерно») представляют собой неспорообразующие, грамположительные клетки шаровидной или овоидной формы диаметром 0,5-2,0 мкм. При росте в жидкой среде находятся попарно или в цепочках, неподвижны, не считая штаммы группы D. Формируют капсулу, с легкостью трансформируются в L-форму. Соотношение суммы гуанина и цитозина к общему весу оснований в молекуле ДНК приходится на 33 – 42 %. По типу дыхания факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, нуждаются для роста в богатых питательных средах и иногда в 5 % CO<sub>2</sub>. Метаболизм бродильного типа; образуют лактат, но не газ. Каталазоотрицательные. Обычно лизируют эритроциты, вызывая обесцвечивание и позеленение кровяной среды (α-гемолиз). Диапазон температуры для роста 25 – 45 °С (оптимум 37 °С). Род стрептококков систематизирован по группам на: α-гемолитические стрептококки – приводят к недостаточному разрушению кровяных клеток с образованием гемолитического участка зеленоватого цвета (так именуемые зеленающие стрептококки), β-гемолитические стрептококки – проводят полный гемолиз

(группы А, В, С, G) и негемолитические стрептококки - «гамма-гемолиз» (группа D, другие экземпляры групп В, С, D, H, O ). На твердых питательных средах они растут в виде мелких плоских сероватых колоний, на жидких средах - крошкообразного пристенного и придонного роста, на кровяном агаре – зон альфа - или бета гемолиза. Обнаружены также и негемолитические штаммы. Сбраживают углеводы до образования кислоты, разлагают аминокислоты – аргинин, серин. Типовые представители групп В и D образуют красные и жёлтые пигменты. Стрептококки при росте на питательных средах и в живом организме вне клетки выделяют стрептодорназу, стрептолизины, стрептокиназу, лейкоцидин, бактериоцины. Генетическая конверсия осуществляется за счет трансформации и трансдукции, исключая конъюгацию. По причине наличия у рода стрептококков характерного полисахарида С и внешних белковых антигенов была создана система (Лендсфилд, 1933). По С-полисахариду образуют серогруппы А, В, С, D ... O. Вытяжку С-полисахарида извлекают путем автоклавирования бактериальной культуры при 1,1 атм. 15 мин., а также стратификацией её нагретой соляной, азотной кислотами, формамидом, пепсином, трипсином. Серологическая особенность состоит в тесной связи с аminosахарами. У стрептококков группы А, образующих матовые или слизистые зоны роста, на наружности имеется М-белок, который обуславливает типовую специфичность. По этому основанию в данной группе А указывают 55 варов, уставляемых посредством реакций агглютинации или преципитации с характерными сыворотками. М-белок несет противофагоцитарную активность, проявленную в антигенных свойствах. Второстепенную функцию в разграничении выполняют также находящиеся на поверхности клетки Т- и R-антигены.

*Streptococcus thermophilus*, также называемый *Streptococcus salivarius thermophilus* или *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*) относятся к виду грамположительных факультативно - анаэробных бактерий, имеющих

шаровидную форму клеток, соединенных между собой в длинные цепочки. Он представляет  $\alpha$ -гемолитические стрептококки.

*S. thermophilus* входит в группу молочнокислых бактерий, ферментирующих углеводы с выделением молочной кислоты. За счет данного свойства он обширно применяется в пищевой индустрии при производстве многообразной молочной продукции. Термофильный стрептококк используется также при неусвояемости организмом лактозы, проявляет подквашивающее влияние, создавая биоцидный эффект по отношению патогенных биологических агентов, а также способен образовывать и высвобождать полисахариды (Семенихина и др., 2013; Pachekreparol et al., 2017; Cui Y. et al., 2019). Наличие международного GRAS-статуса (от Generally Regarded as Safe) позволяет использовать *S. thermophilus* в пищевом и фармацевтическом секторах промышленности и применять у детей с грудничкового периода.

Бактерии *S. thermophilus* широко распространены в окружающей среде, входят в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта у птиц и млекопитающих (Мишурнова, Киржаев, 1993).

Исходя из результатов исследований известно, что количественный выход синтезированных экзополисахаридов может изменяться у термофильных молочнокислых стрептококков от 50 до 350 мг/л (Семенихина и др., 2013).

Отмечено, что наличие в заквасках термофильного молочнокислого стрептококка защищает ее от агрессивного воздействия бактериофагов и делает более стабильной в условиях сезонных изменений качества молока.

Благодаря исследованиям, проведенным во Всероссийском научном исследовательском институте молочной промышленности (Семенихина и др., 2013) выбрана методика определения экзополисахаридов, выделяемых молочнокислыми бактериями. Было изучено больше 40 штаммов термофильных молочнокислых стрептококков, у которых одновременно

подтверждали склонность к образованию ЭПС и вязкость сгустков. Обнаружено, что 60–70 % штаммов, формирующих клейкие сгустки, синтезировали большее количество ЭПС. С применением избранных опытным путем штаммов созданы закваски для йогурта.

### 2.1.2. Среды, используемые для культивирования бактерий

Для выращивания бактерий рода *Lactococcus* и *Streptococcus* и извлечения из них ЭПС применяли следующие синтетические среды.

Среда № 1 – лактобакагар состояла из следующих компонентов (из расчета г/л среды): панкреатического гидролизата рыбной муки (20), экстракта пекарских дрожжей (5,0), мясного экстракта (5,0), глюкозы (20,0), калия фосфорнокислого однозамещенного (2,0), уксуснокислого натрия (5,0), твина-80 (1,0 мл/л), аммония лимоннокислого однозамещенного (2,0), сернокислого магния (0,1), хлористого марганца (0,05), агара (13).

Среда № 2 – среда Welman et al., (2003) была представлена такими компонентами (г/л среды) как сахароза (20,0), дрожжевой экстракт (5,0), гидролизат казеина (20,0), калий фосфорнокислый двузамещенный (2,0), сульфат магния (0,1), сульфат марганца (0,05), цитрат аммония (2,0), ацетат натрия (5,0), твин-80 (1,0 мл/л).

### 2.1.2. Выделение и очистка экзополисахаридов

Бактерии выращивали на термостатируемом встряхивателе-инкубаторе при 180 об/мин в колбах Эрленмейера на среде № 2: *L. lactis* В-1662 в течение 48 часов при температуре 27 °С, а *S. thermophilus* – при температуре 38 °С. Получаемые экспериментальными бактериями экзополисахариды выделяли по методу (Cerning et al., 1988) в нашей модификации. Сущность модификации состояла в том, что процесс переосаждения культуральной жидкости этиловым спиртом повторяли три раза, а для получения хроматографически чистых образцов ЭПС, использовали гель-фильтрацию.

В результате выделения и очистки экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на выходе получили вещества, представляющие собой светло-

коричневые порошки, не имеющие запах, без белковых включений и других примесей в составе.

#### **2.1.4. Определение белка**

Для выявления белковых примесей применяли метод М. Bradford (1976). Количественные показатели содержания белка в изучаемых образцах находили согласно калибровочному графику, которую строили в диапазоне концентраций от 6,25 до 100 мкг/мл альбумина (Albumin from bovine serum, «Merck», Германия).

#### **2.1.5. Определение углеводов**

Общее количество углеводов определяли фенол-серным методом (Dubois, Cilles, Hamilton, 1956). Для этого строили калибровочный график по D-глюкозе в промежутке концентраций от 10 до 100 мкг/мл.

#### **2.1.6. Определение нуклеиновых кислот**

Нуклеиновые кислоты в экзополисахаридах определяли по поглощению при 260 нм, используя для этого спектрофотометр «Cary 100 Scan» (Varian, США) (Остерман, 1985).

#### **2.1.7. Определение молекулярной массы экзополисахаридов**

Методом аналитической гель – хроматографии определяли молекулярные массы ЭПС на колонках TSKgel G6000 PwXL и Toyopearl – HW-50F. Для этого строили градуировочный график, где отображали соотношение элюционных объемов и молекулярных масс стандартных образцов. Используя показатели элюционных объемов, на графике находили молекулярные массы выделенных ЭПС.

#### **2.1.8. Определение химической природы экзополисахаридов**

Для определения фракций ЭПС методом ионообменной хроматографии применяли колонки с анионообменниками DEAE- Toyopearl 650M (20x200 мм) и СПС Био ДЕАЕ 70 мкм. Элюирование проводили поэтапно. Сначала, проводили отделение нейтральных фракций буфером 0,04 %  $\text{NaN}_3$ , 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Затем продолжали элюцию раствором хлористого натрия  $\text{NaCl}$  в том

же буфере с вектором концентрации 1М для выявления кислых фракций. Далее, собранные с колонки фракции, тестировали на наличие сахаров фенол-серной пробой.

### **2.1.9. Определение моносахаридного состава экзополисахаридов**

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) ЭПС проводили на пластинах с целлюлозным сорбентом POLIGRAM® GEL 300 (толщина слоя 0,1 мм) и DC - Alufolien Cellulose (толщина слоя 0,1 мм). Подготовленные образцы гидролизовали и высушивали, а затем использовали в ТСХ. За эталоны брали растворенные в спирту моносахариды. Для «подвижной» фазы применяли композицию, состоящую из этилацетата, пиридина, уксусной кислоты и воды в долях 5:5:1:3. Для считывания результата пластину обрабатывали этаноловым раствором анилин-фталата.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на жидкостном хроматографе Smartline 1000 (Knauer, Германия) с детектором Dekade-II (Antec Leiden, Голландия) в режиме пульсамперометрической детекции, на колонке CarboPac 10 (Dionex, США) размером 4x250 мм в 0,0125 М растворе NaOH, скорость потока – 0,7 мл/мин; чувствительность метода – 10-50 нг/мл. Для количественных расчетов использовали метод внешнего стандарта.

### **2.1.10. Определение вязкости растворов экзополисахаридов**

Определение относительной вязкости проводили на капиллярном вискозиметре ВПЖ-2 (Россия). Для этой цели 10 мл раствора исследуемого образца ЭПС с концентрацией 10% вносили в вискозиметр, помещенный в термостат при 25 °С, и измеряли время истечения жидкости. После измерения вязкости у опытных проб определяли время истечения контрольной пробы, а именно дистиллированной воды. Значения относительной вязкости вычисляли по формуле (Рабек, 1983):

$$V = \frac{t_1}{t_2}, \text{ где}$$

$t_1$  – время истечения раствора, с;

$t_2$  – время истечения растворителя, с.

### **2.1.11. Моделирование ожога у крыс**

Эксперимент выполняли (в трех повторностях) на самках белых беспородных крыс массой 270-300 г, выдержанных в карантинных условиях в течение 14 суток. Крысы были в виварии в идентичных условиях содержания и кормления. Животные были поделены на 5 групп ( $n=6$ ): 1 группа – без ожога, 2 группа – с ожогом, 3 группа – ожог и коммерческий препарат 5% декспантенол, 4 группа – ожог и 0,6% раствор ЭПС *L. lactis* В-1662, 5 группа – ожог и 0,6% раствор ЭПС *S.thermophilus*. За сутки до начала исследования у самок была выщипана шерсть на участках кожи для моделирования ожога. Ожог имитировали под эфирным наркозом на междулопаточной области крысы дном пробирки, наполненной кипящей водой на 2/3 объема в течение 30 секунд до образования ожога степени IIIa (Пономарь, 2012). Нанесение 5% декспантенола («Пантодерм», АО «АКРИХИН», Россия) и бактериальных ЭПС осуществляли тотчас же после обработки ожога и далее ежедневно (один раз в день) в прошествии 28 суток эксперимента. Тенденцию к заживлению ожога оценивали по размерам ожоговой площади и зарастанию ран на 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 и 28 сутки.

Все исследования в условиях эксперимента делали согласно требованиям Федерального закона от 01.12.1999 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986 г.).

### **2.1.12. Определение живой массы и микробиологических показателей сельскохозяйственной птицы**

Для эксперимента использовали цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15, предоставленных ООО «Возрождение – 1» (с. Идолга, Татищевский район, Саратовская область), которые относятся к мясо-яичному виду бройлерного

кросса и характеризуется высокой выживаемостью и быстрым приростом. Определение массы тела цыплят проводили путем их взвешивания на 22, 25, 28, 31 сутки, 2, 3, 4 и 10 месяц. Показатели общего микробного числа (ОМЧ) и молочнокислых бактерий определяли методом серийных разведений (Лабинская, 1978) в экскрементах птицы в течение четырех месяцев, используя для этого питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА), лактобакагар и MRS-агар Эксперимент проводили в трех повторностях.

### **2.1.13. Статистическая обработка**

Статистическую оценку результатов проводили по стандартным методикам (Воробьев, Елсуков, 1989). Достоверность считали по параметрическому t-критерию Стьюдента, при этом достоверной считали разницу при возможности ошибки  $p < 0,05$ . Расчеты проводили с применением программы StatPlus 2007 Professional 4.9.4.1.

## 2.2. Результаты исследований и их обсуждение

### 2.2.1 Влияние условий культивирования (источник углерода и время) на продукцию экзополисахаридов *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus*

Углерод является необходимым компонентом для снабжения клетки потенциальной энергией для нормального роста и развития и «строительным» материалом для образования ЭПС (Gandhi, Ray, Patel, 1997; Shivakumar, Vijayendra, 2006). В зависимости от вида применяемых моносахаридов, состав и структура получаемых ЭПС может изменяться.

Для получения ЭПС при культивировании молочнокислых бактерий необходимы питательные среды, богатые по своему составу. Ранее исследователями в качестве питательных сред для бактерий родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, было использовано обезжиренное молоко (Cerning et al., 1988; 1992) и молочная сыворотка (Красникова, Маркелова, 2013; Gasse, Schmidt, Frank, 1997). Известно также использование в качестве питательных сред отходов производств, например мелассы и отрубей пшеницы для получения декстрана (Behravan, Bazzaz, Salimi, 2003). Так как в подобных средах культивирования молочнокислых бактерий имеется значительное содержание высокомолекулярных веществ, затрудняющих выделение, очищение и оценку их экзополисахаридов, стали применять синтетические и полусинтетические среды (Kimmel, Roberts, 1998; Dupont, Roy, Lapointe, 2000; Petry et al., 2000; Torino, Sesma, Font de Valdez, 2000).

Выбор источника углерода, несомненно, оказывает большое влияние на производство экзополисахаридов молочнокислыми бактериями. Главными источниками углерода для молочнокислых бактерий считают глюкозу, декстрозу, галактозу, лактозу, маннозу, фруктозу и сахарозу, а также комплекты из этих сахаров (Cerning et al., 1992; Cerning et al., 1994; Gamar-Nourani, Blondeau, Simonet, 1997; Yuksekdog, Aslim, 2008; Munir et al., 2019).

При подборе источников углерода для выращивания бактерий *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* в среде культивирования помимо лактозы использовали сахарозу и глюкозу.

В качестве среды для получения ЭПС из бактерий *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* была использована полусинтетическая среда А. Welman с соавт. (2003) и такие сахара как лактоза, сахароза и глюкоза в концентрации 20 г/л.

Культивирование *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* проводили при 180 об/мин в течение 48 часов на термостатируемой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES-20, «Biosan», Литва) при 27 °С и 38 °С соответственно.

#### **2.2.1.1. Продукция экзополисахарида в зависимости от источника углерода и времени культивирования *L. lactis* В-1662**

В ходе работы было обнаружено, что при выращивании *L. lactis* В-1662 при 27 °С и рН 5,5 на среде А. Welman с соавт. (2003) с лактозой выход ЭПС составлял 467 мг/л. После добавления в питательную среду глюкозы продукция ЭПС увеличивалась и была равной 687 мг/л. При внесении же сахарозы к среде культивирования продукция ЭПС была максимальной и достигала 753 мг/л (Таблица 1).

Таблица 1 – Влияние различных источников углерода на продукцию ЭПС *L. lactis* В-1662

Источник углерода	Продукция ЭПС, мг/л
Лактоза	467,0±4,0
Глюкоза	687,0±5,1
Сахароза	753,0±6,5

Есть основания полагать, что продукция ЭПС у молочнокислых бактерий совпадает с ростом самой культуры (Deveau, Van Calsteren, Moineau, 2002). Для определения времени максимального выхода ЭПС была

построена диаграмма роста бактерий (Рисунок 1). Для этого, на протяжении стационарной фазы развития бактерий *L. lactis* В-1662, используя среду А. Welman с сахарозой, в культуральной жидкости, с промежутком времени 2 часа, проводили измерения оптической плотности на фотоколориметре МКМФ-02 при длине волны 425 нм. Как показано на рисунке 1, бактерии выходили на стационарную фазу роста по прошествии 12 часов с начала выращивания, которая продолжалась в среднем 20 часов. Спустя 48 – 50 часов наступала фаза полного подавления роста бактерий.

В то же время, одновременно с ростом самой культуры в процессе культивирования определяли выход и ЭПС фенол-серным методом. Выделение бактериями ЭПС происходило с 12 часов и достигало своего максимума к 24–26 часам (Рисунок 1).

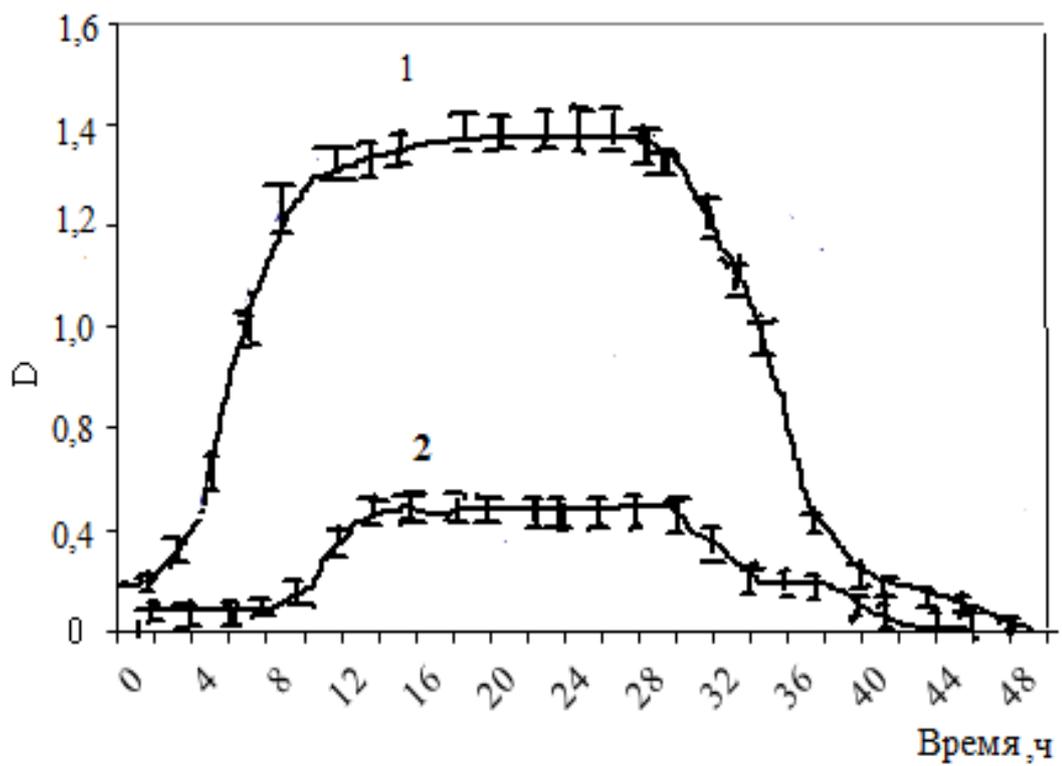


Рисунок 1 – Кривая роста (1) и продукция ЭПС (2) *L. lactis* B-1662

### 2.2.1.2. Продукция ЭПС в зависимости от источника углерода и времени культивирования *S. thermophilus*

При культивировании *S. thermophilus* при 38 °С и рН 5,5 на среде А. Welman с глюкозой выход ЭПС составлял 1,5 г/л. При наличии в среде культивирования лактозы продукция ЭПС оказалась равной 1,7 г/л. При добавлении же сахарозы в среду культивирования продукция ЭПС увеличивалась до 2,3 г/л. Таким образом, наилучшим источником углерода для продукции ЭПС также как и в случае *L. lactis* В-1662 являлась сахароза (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние различных источников углеродов на продукцию ЭПС *S. thermophilus*

Источник углерода	Продукция ЭПС, г/л
Глюкоза	1,5±0,4
Лактоза	1,7±0,2
Сахароза	2,3±0,2

Данные результаты совпадали с показателями некоторых исследователей в том, что лучший выход ЭПС прослеживался на среде с сахарозой (Рысмухамбетова и др., 2008; Карташев, Коев, 2016).

Для исследования влияния времени культивирования на продукцию ЭПС строили кривую роста *S. thermophilus* (Рисунок 2). Бактерии выращивали на среде с сахарозой. Одновременно с ростом данной культуры в процессе культивирования определяли выход ЭПС фенол - серным методом. Было показано, что максимальный рост культуры стрептококка и максимальная продукция ЭПС совпадали со стационарной фазой роста, приходящейся на 16-24 часа, что хорошо коррелирует с данными других исследователей.

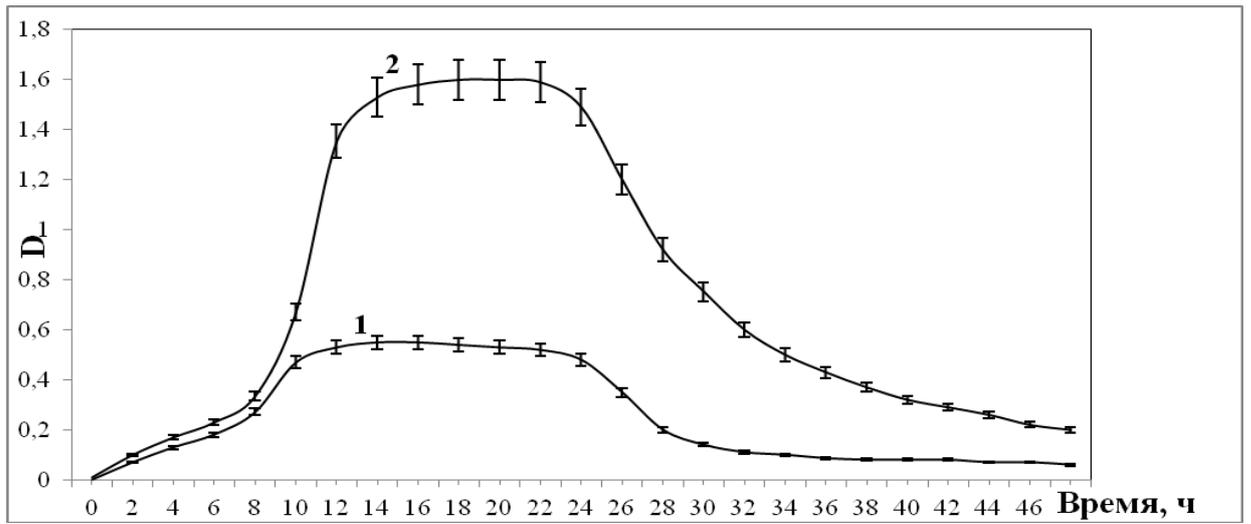


Рисунок 2 – Кривая роста (1) и продукция ЭПС (2)  
*S.thermophilus*

## **2.2.2. Выделение и очистка экзополисахаридов**

### ***L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus***

Процесс выделения ЭПС осуществляли методом J. Cerning et.al. (1988) в нашей модификации. Для извлечения ЭПС, получаемых из *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus*, культуры выращивали на среде A. Welman с соавт. (2003) в течение 48 часов.

Полученные после выделения и очистки экзополисахариды *L.lactis* B-1662 и *S. thermophilus* представляли собой порошки светло-коричневого цвета, без запаха, не имеющие в своем составе белок, нуклеиновые кислоты и клетки бактерий.

#### **2.2.2.1. Выделение и очистка экзополисахарида *L. lactis* B-1662**

Для выделения ЭПС *L. lactis* B-1662 выращивали на среде (Welman, 2003) в течение 48 часов. Затем культуральную жидкость центрифугировали при 3000 g в течение 30 мин и температуре 4 °С, осадок убирали, а свободную от бактериальных клеток культуральную жидкость концентрировали. Образовавшийся концентрат разбавляли двойным объемом этилового спирта с концентрацией 96%. Описанную процедуру переосаждения и центрифугирования воспроизводили 3 раза. Полученный ЭПС освобождали от низкомолекулярных соединений с помощью гель-фильтрации, используя при этом колонку с носителем Sephadex G-10 (Рисунок 3).

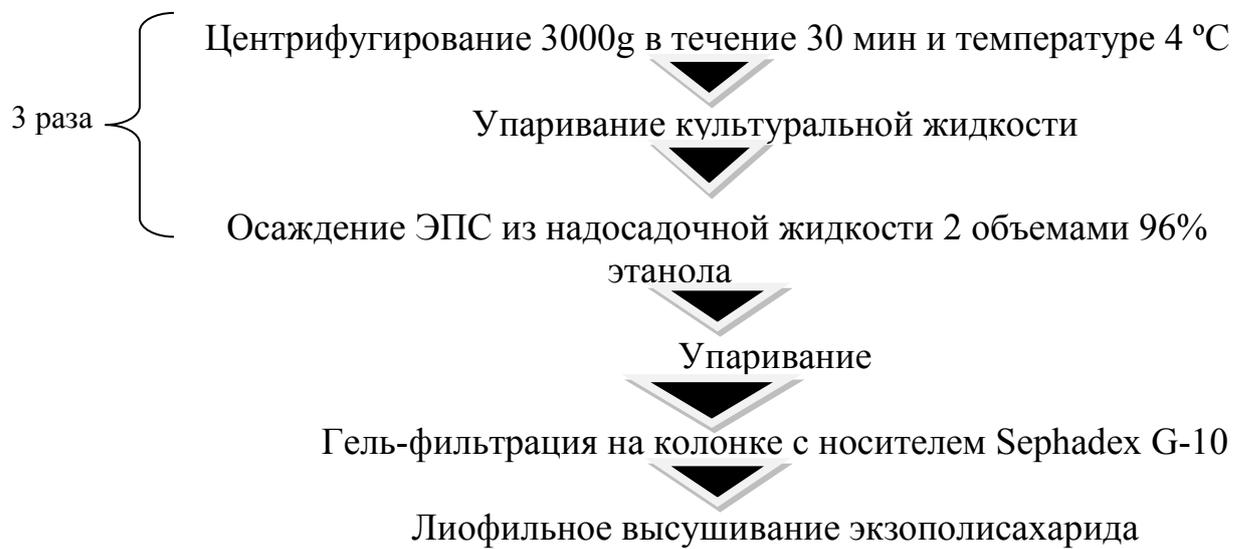


Рисунок 3 – Схема выделения и очистки экзополисахаридов из культуральной жидкости *L. lactis* B-1662

#### 2.2.2.2. Выделение и очистка экзополисахарида *S. thermophilus*

Выделение ЭПС проводили, выращивая *S. thermophilus* на среде А. Welman при 38 °С в течение 48 ч (Рисунок 4). Далее освобождали культуральную жидкость центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин. Получившийся осадок биомассы извлекали, а освобожденную от клеток продуцента культуральную жидкость концентрировали на роторном испарителе N-1100VWD (Япония). Контроль отсутствия бактериальных клеток на этой стадии проводили микроскопированием окрашенных по Граму препаратов (Dussault et al., 1955). После ЭПС осаждали двумя объемами 96%-го этилового спирта. Сконцентрированный, таким образом, надосадок растворяли в малом количестве дистиллированной воды, а затем центрифугировали при 3000 g в течение 30 минут и осаждали двойным объемом 96%-го этилового спирта. Процесс центрифугирования и переосаждения дублировали еще 2 раза. Последующую очистку ЭПС проводили методом гель - фильтрации на колонке, применяя в части носителя Sephadex G-50 (Рисунок 5). В роли элюента использовали 1М раствор уксусной кислоты (CH<sub>3</sub>COOH), pH 5,5. Очищенный от примесей ЭПС высушивали (сушка лиофильная, COOLSAF 55-4 SISTEM, ScanLaf, Дания).



Рисунок 4 – Схема выделения и очистки экзополисахаридов из культуральной жидкости *S. thermophilus*

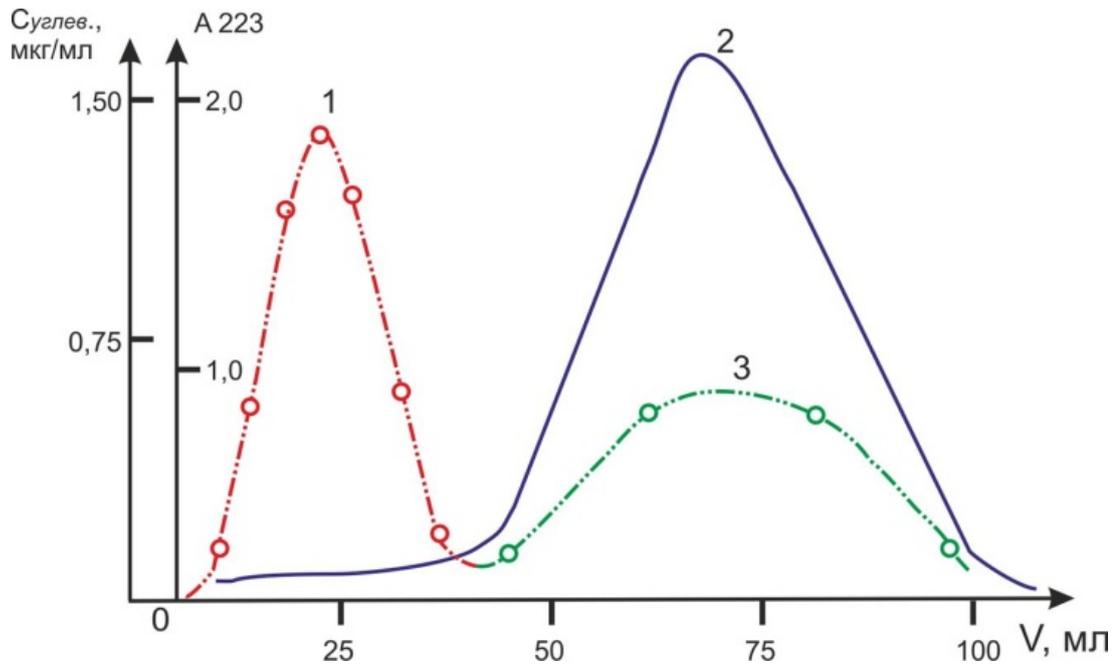


Рисунок 5 – Хроматограммы экзополисахарида *S. thermophilus* (1, 490 нм), пигмента (2), примесей, не дающих реакцию фенол - серным методом при 490 нм (3) на колонке с Sephadex G-50.  $V_0=35$ . Буфер уксуснокислый 1М (рН 5,5). Скорость элюции 1,0 мл/мин

### 2.2.3. Физико-химическая характеристика экзополисахаридов

#### *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*

##### 2.2.3.1. Физико-химическая характеристика ЭПС *L. lactis* В-1662

Молекулярную массу экзополисахарида *L. lactis* В-1662 находили путем гель - хроматографии на колонке TSKgel G6000PWXL (Рисунок 6). Сначала готовили элюирующий раствор (1л.) из 0,15 М хлористого натрия (NaCl) и 0,01% азиды натрия (NaN<sub>3</sub>) и отмывочные растворы из 0,01 М гидроксида натрия (NaOH), 0,1 М уксусной кислоты (CH<sub>3</sub>COOH). Растворы были пропущены через микробный фильтр и разгазированы.

Колонку градуировали эталонными образцами сахаров с установленными молекулярными массами, такими как: глюкоза 6 тыс Да, Dextran 10 тыс Да, Dextran 110 тыс Да, Dextran 2 млн Да («Fluca», Швейцария, «Мерск» Германия). Экзополисахарид *L. lactis* В-1662 различали на автоматическом анализаторе 2690 Alliance Waters. Молекулярная масса ЭПС *L. lactis* В-1662 была равна 10 кДа (Таблица 3).

Таблица 3 – Определение молекулярной массы ЭПС *L. lactis* В-1662 на колонке TSK gel тип G 6000 PWXL

Образец	Время выхода максимального пика, мин	Молекулярная масса, кДа
Декстран	21,73	2000
Декстран	23,20	110
Декстран	24,60	10
Глюкоза	25,76	6
ЭПС	25,51	10

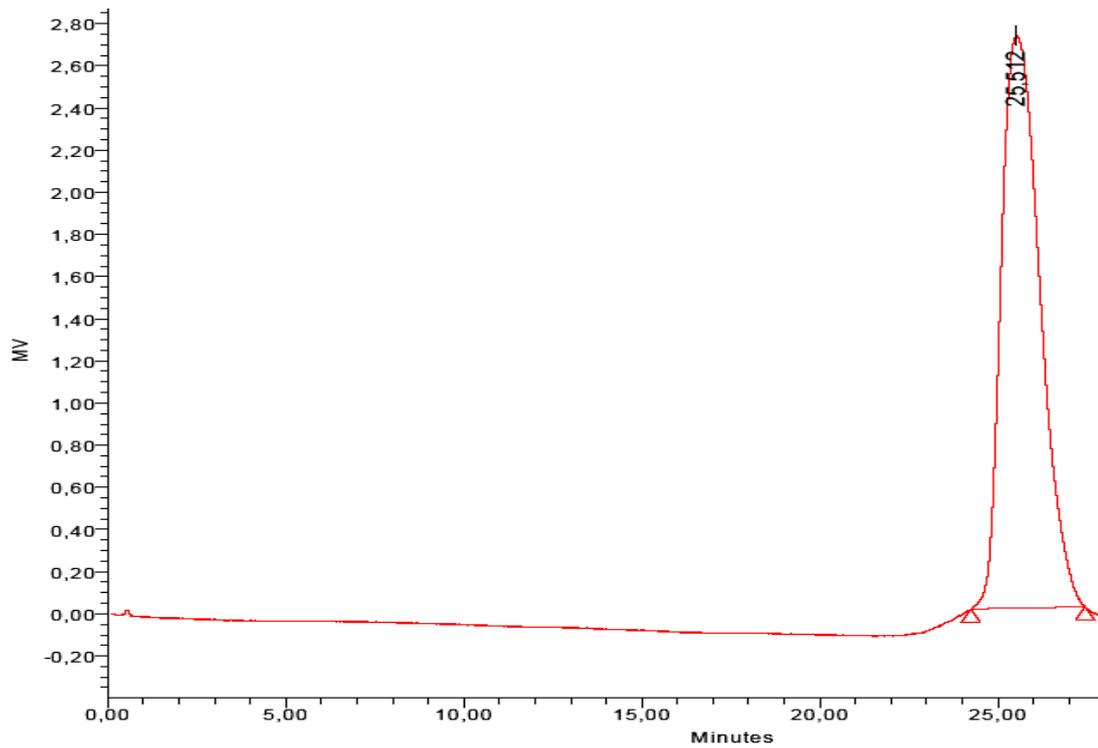


Рисунок 6 – Хроматограмма определения молекулярной массы ЭПС, полученного из *L. lactis* В-1662 на сахарозе, на колонке с TSK gel G6000 PWXL

Для определения химической природы ЭПС лактококка применяли метод ионообменной хроматографии на колонке (20x200 мм) с анионообменником DEAE-C Toyopearl 650M («Tosoh Bioscience», Япония). На первой стадии проводили извлечение нейтральных фракций буферным раствором, состоящим из 0,02 М азида натрия ( $\text{NaN}_3$ ) и 0,05% натрия фосфорнокислого однозамещенного ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Затем, на второй стадии, совершали вымывание кислых фракций раствором хлористого натрия ( $\text{NaCl}$ ) в том же буфере с градиентом концентрации 0,1 н. Фракции собирали в пробирки с помощью распределителя, а затем проверяли на наличие углеводов фенол-серным методом (Dubois, 1956). Из хроматограммы следует, что опытный образец ЭПС выходил одной фракцией, соответствующей нейтральным веществам (Рисунок 7).

Наличие одной нейтральной фракции было характерно и для некоторых ЭПС таких молочнокислых бактерий как *Lactobacillus delbrueckii* *ubsp. delbrueckii* В-1596, *L. delbrueckii* В-1936 и *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (Полукаров и др., 2009). Хотя в литературе имеются данные о гетерогенности ЭПС некоторых штаммов лактококка (Рожкова, 2006).

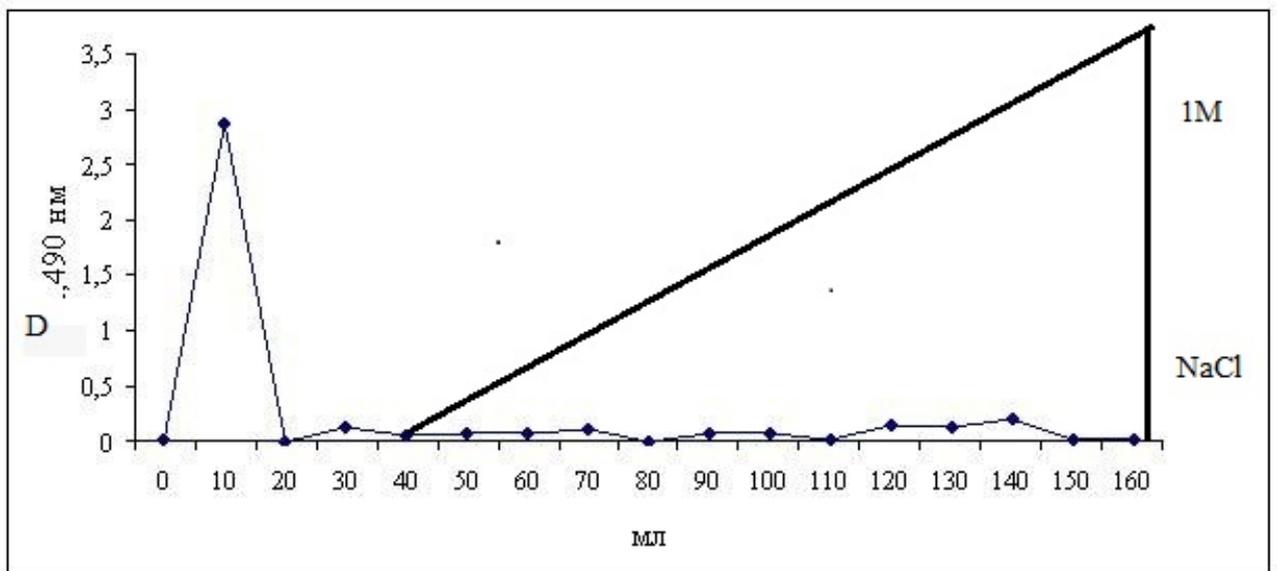


Рисунок 7 – Профиль элюции ЭПС *L. lactis* B-1662 при ионообменной (детекция по углеводам) хроматографии на колонке DEAE-C Toyopearl 650M

Моносахаридный состав ЭПС лактококка находили посредством тонкослойной хроматографии на целлюлозных пластинах POLIGRAM® GEL 300 с толщиной слоя 0,1мм. Гидролиз образца осуществляли 2 н раствором трифтороуксусной кислоты ( $C_2HF_3O_2$ ) при температуре 110 °С на протяжении 3 часов. После разложения ЭПС, гидролизат подсушивали, а потом еще 5-6 раз осушали в разбавленном дистиллированной водой виде для устранения следов кислоты. После чего подготовленный образец использовали для проведения ТСХ в хроматографической камере. В роли маркеров применяли моносахариды (Fluca) в спиртовых растворах, такие как: D-глюкоза, D-галактоза, L-манноза, D-рамноза, D-глюкоуроновая кислота, D-ксилоза. Элюентом послужила суспензия из этилацетата, пиридина, уксусной кислоты и воды в пропорции 5:5:1:3. Для демонстрации «моносахаридных пятен» пластину сбрызгивали 1% кислым анилин-фталатом на спирту (Варбанец, Здоровенко, Книрель, 2006; Остерман, 1985).

Таким образом, исходя из результатов тонкослойной хроматографии, было показано, что моносахаридный состав ЭПС *L. lactis* В-1662 представлен ксилозой и глюкозой. Данные показатели согласуются с литературными данными о том, что глюкоза и ксилоза, наравне с маннозой, рамнозой, галактозой могут являться составными частями ЭПС (Новик, 2002; De Vuyst, Degeest, 1999).

Для уточнения моносахаридного состава методом ВЭЖХ проводили кислотный гидролиз образцов 2-3мг в 1,5 мл 2М трифтороуксусной кислоты, 3 часа 100 °С. После гидролиза образцы высушивали в токе азота и растворяли в буфере для образцов (0,0125 М раствор NaOH). Было показано, что исследуемый ЭПС *L. lactis* В-1662 был представлен глюкозой и ксилозой в соотношении 1:1, а также следовым количеством рамнозы (5,8 %) (Рисунок 8).

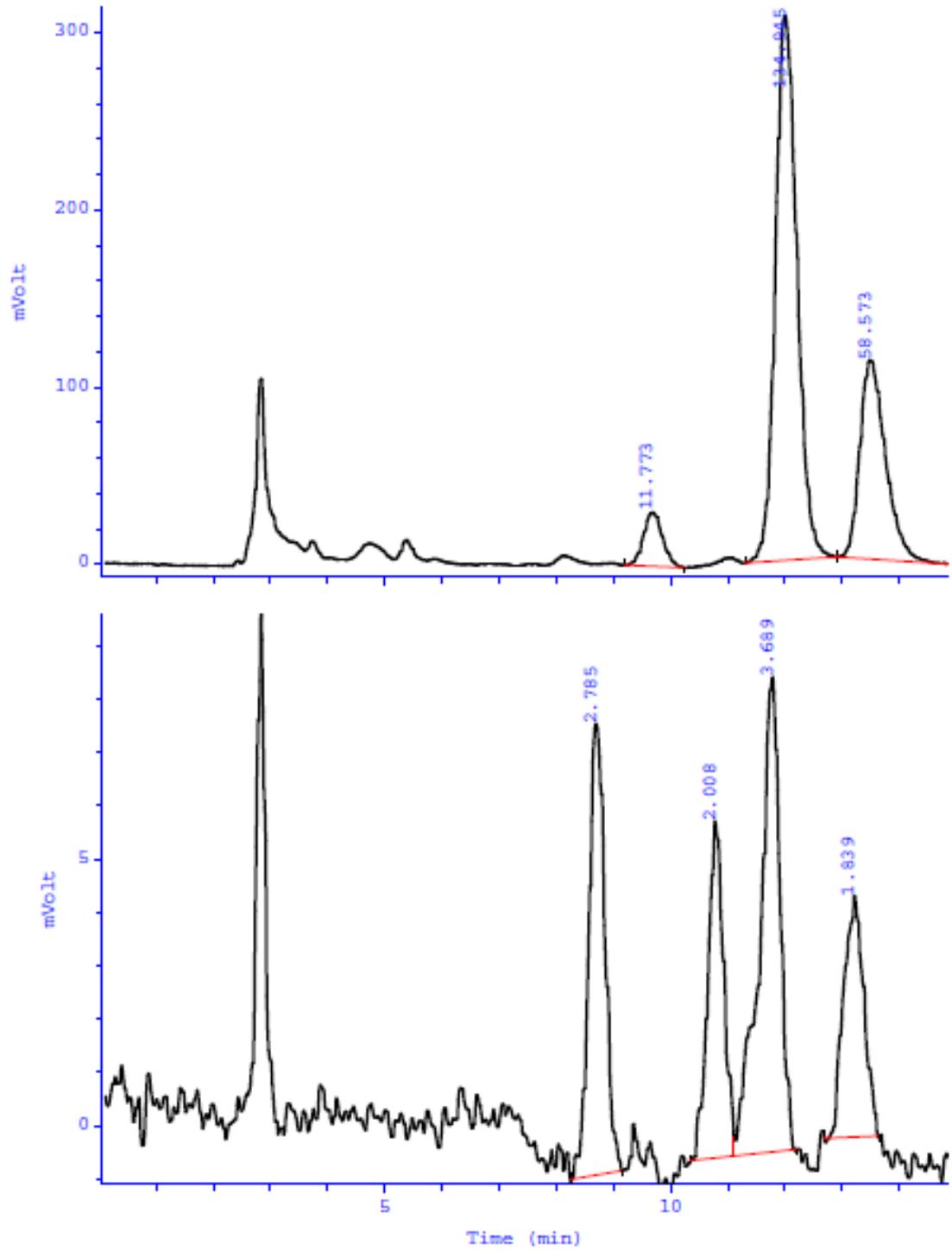


Рисунок 8 – Высокоэффективная жидкостная хроматография ЭПС *L. lactis* В-1662

В процессе исследований с помощью капиллярного вискозиметра была установлена относительная вязкость ЭПС *L. lactis* В-1662, которая равнялась 1,3 мм<sup>2</sup>/с. Величина относительной вязкости была сравнима с показателем вязкости ЭПС других молочнокислых бактерий, таких как лактобациллы (Полукаров и др., 2009).

#### **2.2.3.2. Физико-химическая характеристика ЭПС *S. thermophilus***

Для определения молекулярной массы ЭПС *S. thermophilus* использовали аналитическую колонку с носителем Toyopearl – HW –50F. В качестве элюирующего раствора применяли буфер 1 М уксусную кислоту (Н<sub>3</sub>СООН). Скорость элюции составляла 1 мл/мин, температура внутри колонки сохранялась на показателе 30 °С. В процессе гель – хроматографии полисахарид идентифицировали с помощью проточного спектрофотометра LKB Bromma 2238 UVICORD SII. Калибровку аналитической колонки проводили с общеизвестными декстранами («Fluka» Швейцария, «Merck» Германия) со следующими молекулярными массами (6000, 20000, 180, Да). Для градуировки строили графическую зависимость элюционных объемов от молекулярных масс декстранов и глюкозы. Пользуясь данными элюционных объемов и выделенного ЭПС, согласно градуировочному графику находили молекулярную массу экзополисахарида (Рисунок 9).

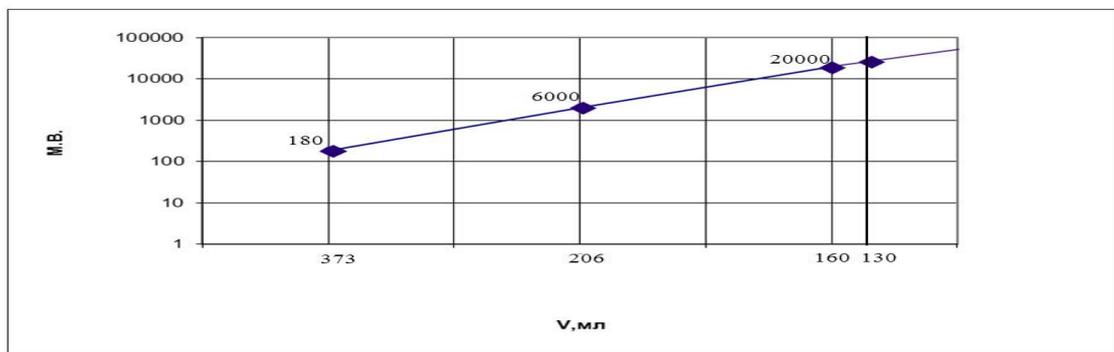


Рисунок 9 – Хроматограмма определения молекулярной массы ЭПС, полученного из *S. thermophilus* на колонке Toyopearl – HW-50F

Для определения химической природы выделенного ЭПС *S. thermophilus* применяли способ ионообменной хроматографии на колонке с анионообменником СПС Био ДЕАЕ 70 мкм. Элюирование проводили поэтапно. Сначала фракции отделяли буферным раствором, состоящим из 0,04 % азиды натрия ( $\text{NaN}_3$ ), 0,05 М фосфата калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). После этого проводили извлечение кислых фракций за счет элюции раствором хлористого натрия ( $\text{NaCl}$ ) в том же буфере с градиентом концентрации 1М. Фракции с колонки через распределительный канал собирали в пробирки. После проведения процесса хроматографии определяли наличие углеводов в собранных фракциях фенол-серным методом (Dubois et al., 1956). В результате, было определено, что ЭПС *S. thermophilus* состоял из нейтральной фракции (Рисунок 10).

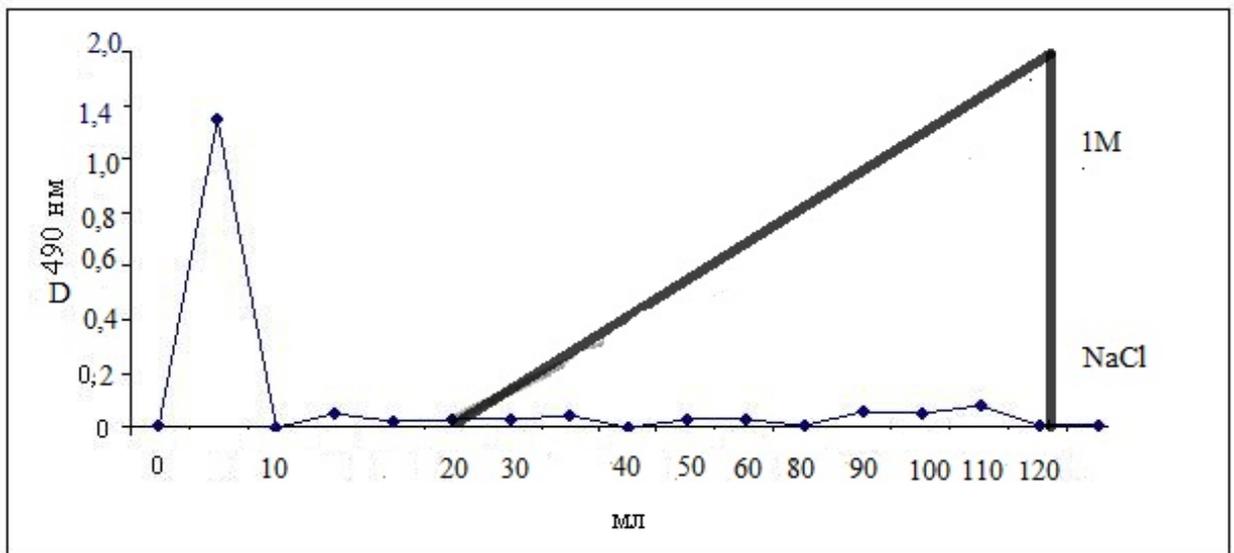


Рисунок 10 – Профиль элюции ЭПС *S. thermophilus* при ионообменной (детекция по углеводам) хроматографии на колонке СПС Био ДЕАЕ 70

Определение моносахаридного состава ЭПС *S. thermophilus* проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластине с целлюлозным наполнителем DC- Alufolien Cellulose, имеющим толщину слоя, равного 0,1мм. В качестве эталонов сравнения применяли моносахариды (Fluca) в спиртовых растворах таких как: D-глюкоза, D-арабиноза, L-манноза, D-рамноза, маннит. Гидролизовали ЭПС 4 н. раствором трифторуксусной кислоты при 98 °С на протяжении 4 часов на водяной бане с обратным холодильником («мягкий гидролиз»). Гидролизат ЭПС наносили на пластину вместе со стандартами сахаров. Затем элюирующим раствором, состоящим из этилацетата, пиридина, уксусной кислоты, воды в соотношении 5:5:1:3 осуществляли процесс тонкослойной хроматографии в камере. По окончании процесса пластину проявляли, для чего использовали раствор анилина фталата (Варбанец, Здоровенко, Книрель, 2006; Остерман, 1985). Согласно проведенному исследованию ЭПС *S. thermophilus* был представлен такими моносахарами как рамноза и глюкоза.

Для уточнения моносахаридного состава методом ВЭЖХ проводили кислотный гидролиз образцов 2-3 мг в 1,5 мл 2М трифторуксусной кислоте 3 часа 100 °С. После гидролиза, образцы высушивали в токе азота и растворяли в буфере для образцов (0,0125 М раствор NaOH).

Экзополисахарид *S. thermophilus* представлен рамнозой, галактозой и маннозой в соотношении 1:2:1, а также имеет следовые количества глюкозы – 4, 4% (Рисунок 11).

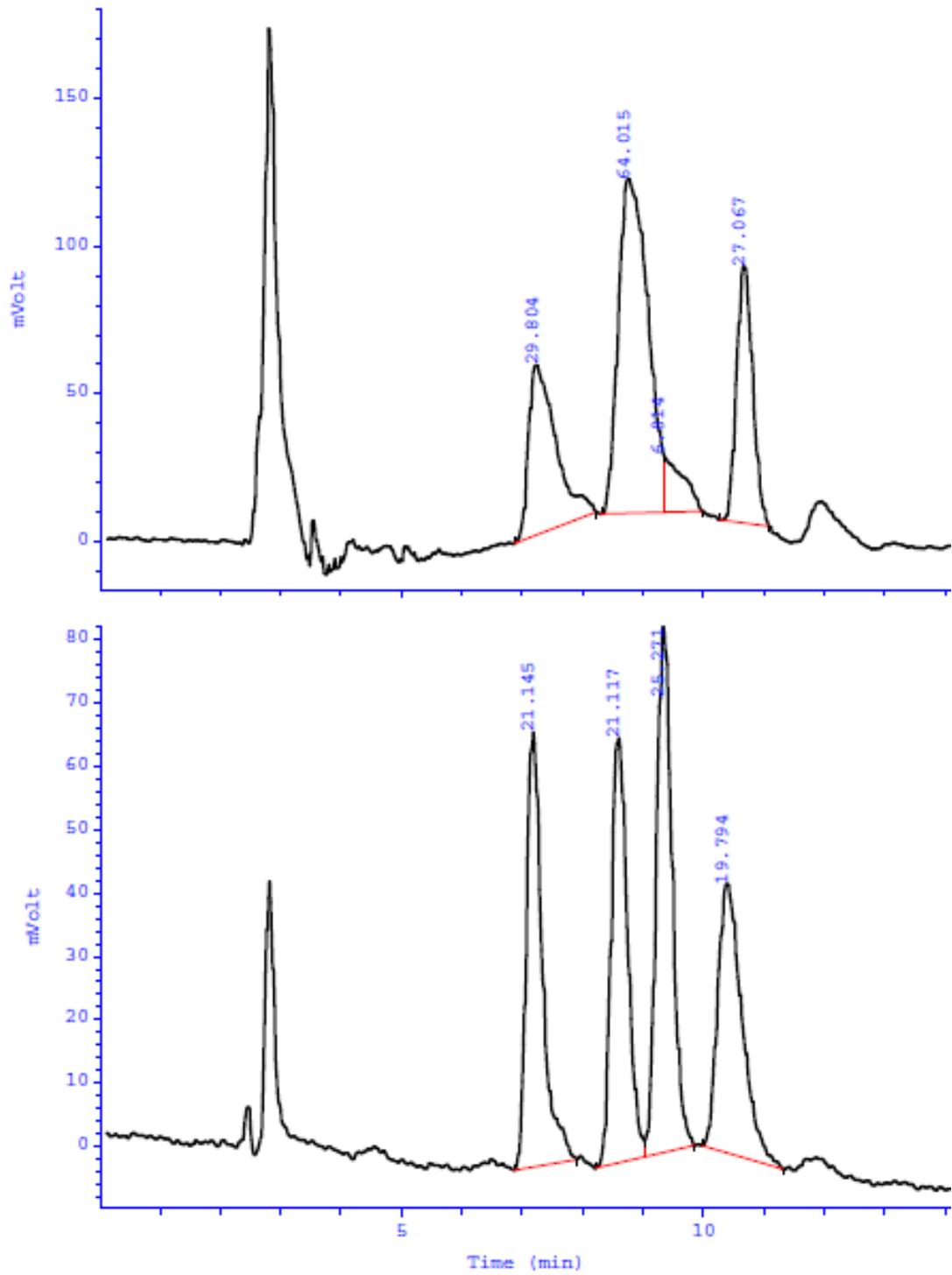


Рисунок 11 – Высокоэффективная жидкостная хроматография  
ЭПС *S. thermophilus*

В процессе исследований было установлено, что ЭПС стрептококка обладал низкой вязкостью, и это не позволяло определить динамическую вязкость. Относительная вязкость была определена с помощью капиллярного вискозиметра и составила 1,23 мм<sup>2</sup>/с.

#### **2.2.4. Изучение влияния экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ран при моделировании ожогов у крыс**

Для исследования действия ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на заживление ожогов были сформированы 5 групп (n=6) крыс: 1 группа – животные без ожога, 2 группа – животные, у которых вызывали ожог, 3 группа – животные, у которых вызывали ожог и после ожога наносили коммерческий препарат 5% декспантенол, 4 группа – животные, которым после ожога наносили 0,6% раствор ЭПС *L. lactis* В-1662, 5 группа – животные, которым после ожога наносили 0,6 % раствор ЭПС *S. thermophilus*. В процессе исследования было показано, что заживление в группах лабораторных животных происходило по-разному.

У крыс 2 группы, с контрольным ожогом, через 1 сутки формировалась небольшая сухая корка темно-красного цвета с ровными краями. Корка (струп) имела тот же цвет и форму корки в течение всего опыта, отслаивания струпа не происходило. На 7 сутки наблюдали прорастание шерстки на месте ожога. Через 10 суток отмечали уменьшение площади корки. Полное заживление ожога и восстановление шерстного покрова у крыс этой группы происходило через 28 суток (Таблица 4, Рисунок 12).

Таблица 4 – Влияние экзополисахаридов *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на ожоги у крыс

Время, сутки	Группы животных			
	2	3	4	5
	контроль	опыт		
	ожог	ожог +5 % декспантенол	ожог + ЭПС <i>L. lactis</i> В-1662	ожог + ЭПС <i>S. thermophilus</i>
	Площадь ожога, см <sup>2</sup>			
1	2,80±0,10	2,40±0,20	2,20±0,10*	1,50±0,20*
3	3,00±0,30	3,00±0,20	1,50±0,22*	1,50±0,20*
5	2,40±0,20	2,60±0,30	1,50±0,20*	1,20±0,30*
7	2,10±0,22	2,50±0,21	1,25±0,08*	1,10±0,30*
10	0,50±0,12	2,00±0,14*	1,20±0,13*	1,10±0,12*
14	0,40±0,12	0,20±0,08	0,20±0,05	0,20±0,014
21	0,10±0,05	0,08±0,002	0,02±0,005	0,02±0,005
23	0,10±0,05	0,10±0,05	-	-
25	0,10±0,05	-	-	-
28	-	-	-	-

Примечание:  $P \leq 0,05$  \*относительно 2 группы.

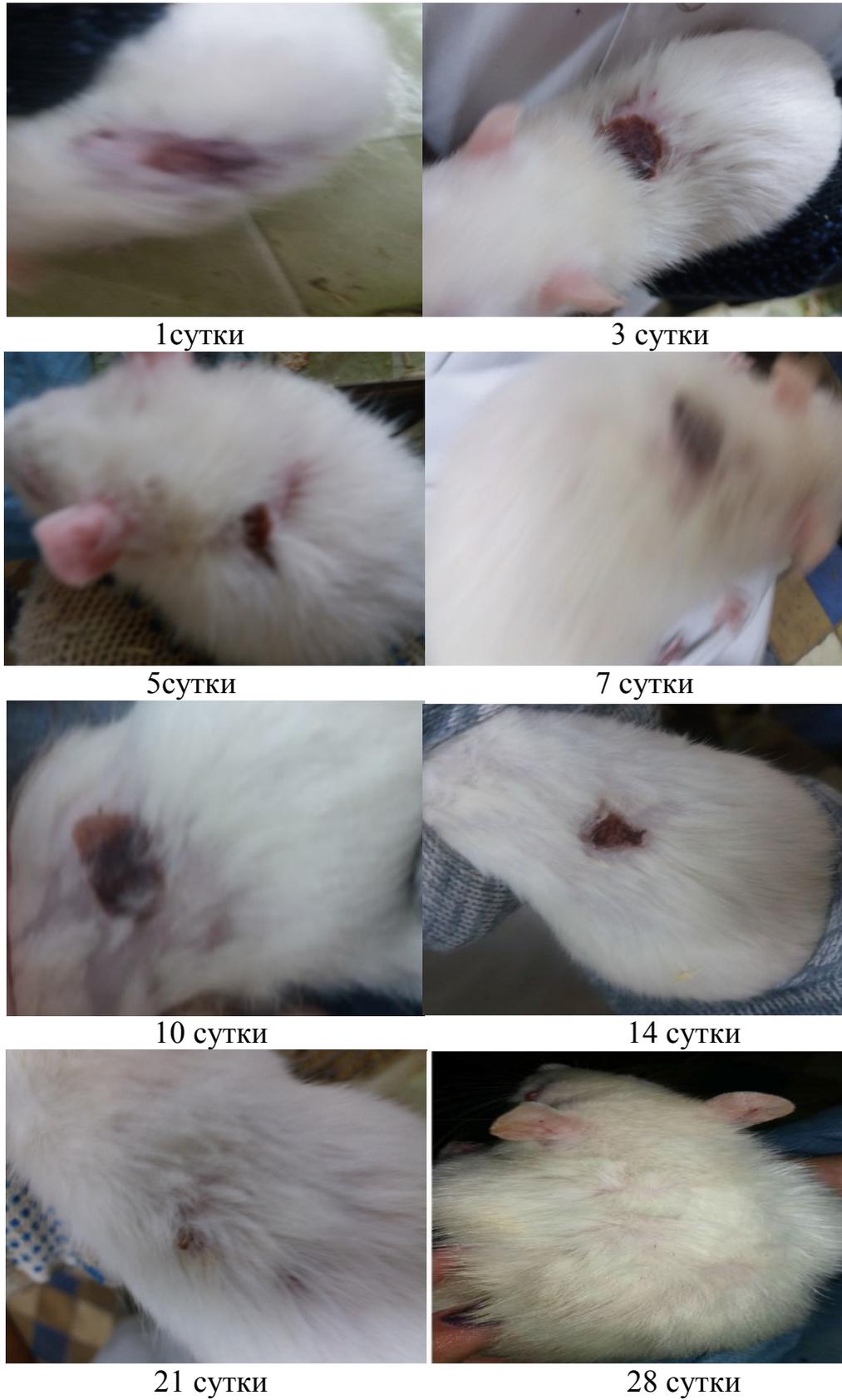


Рисунок 12 – Процесс заживления ожоговой раны контрольной группы (2)

При обработке 5% декспантенолом у животных 3 группы фиксировали похожую картину, как у крыс в 2 группе. Аналогично, через сутки образовывалась корка темно-красного цвета с ровными краями, площадь которой начинала сокращаться с 14 суток. Отшелушивания корки в процессе всего эксперимента не происходило. Прорастание шерстки также отмечали на 7 сутки. Заживление раны происходило к 25 суткам, как видно из таблицы 5, а шерстный покров полностью восстанавливался к 28 суткам эксперимента (Рисунок 13). При нанесении на ожоговую рану крысам в 4 группе ЭПС *L. lactis* В-1662 через 1 сутки также наблюдали формирование корки красного цвета с ровными краями. Начиная уже с 1 суток, происходило уменьшение площади ожога (см. Таблица 4). На 5 сутки было замечено прорастание шерсти на поверхности ожога. На 7 сутки наблюдали отшелушивание корки, а на 10 сутки и её отслоение. На 23 сутки наблюдали полное заживление и зарастание шерстью ожоговых ран (Рисунок 14). При нанесении ЭПС *S. thermophilus* животным 5 группы также через сутки наблюдали сокращение площади ожоговой раны (см. Таблица 4, Рисунок 15). Однако, как видно из таблицы 5, площадь раны у крыс была гораздо меньше, чем у животных 4 группы, раны которых обрабатывали ЭПС *L. lactis* В-1662. На 5 сутки начиналось более интенсивное прорастание шерсти у крыс по сравнению с животными 4 группы. Слущивание и отслоение корки наблюдали в то же время, что и у животных 4 группы - на 7 сутки. Заживление раны и полное восстановление шерстного покрова наблюдали также на 23 сутки, как и в случае обработки ран у крыс ЭПС *L. lactis* В-1662 (4 группа). Однако было замечено, что в случае обработки ран у крыс ЭПС *S. thermophilus* шерстный покров визуально был более густой и равномерный, и площадь струпа через сутки была меньше, чем у крыс, раны которых обрабатывали ЭПС *L. lactis* В-1662. Выявленный заживляющий эффект у ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* при обработке ожоговых ран у крыс открывает перспективы использования их в качестве противоожоговых средств.

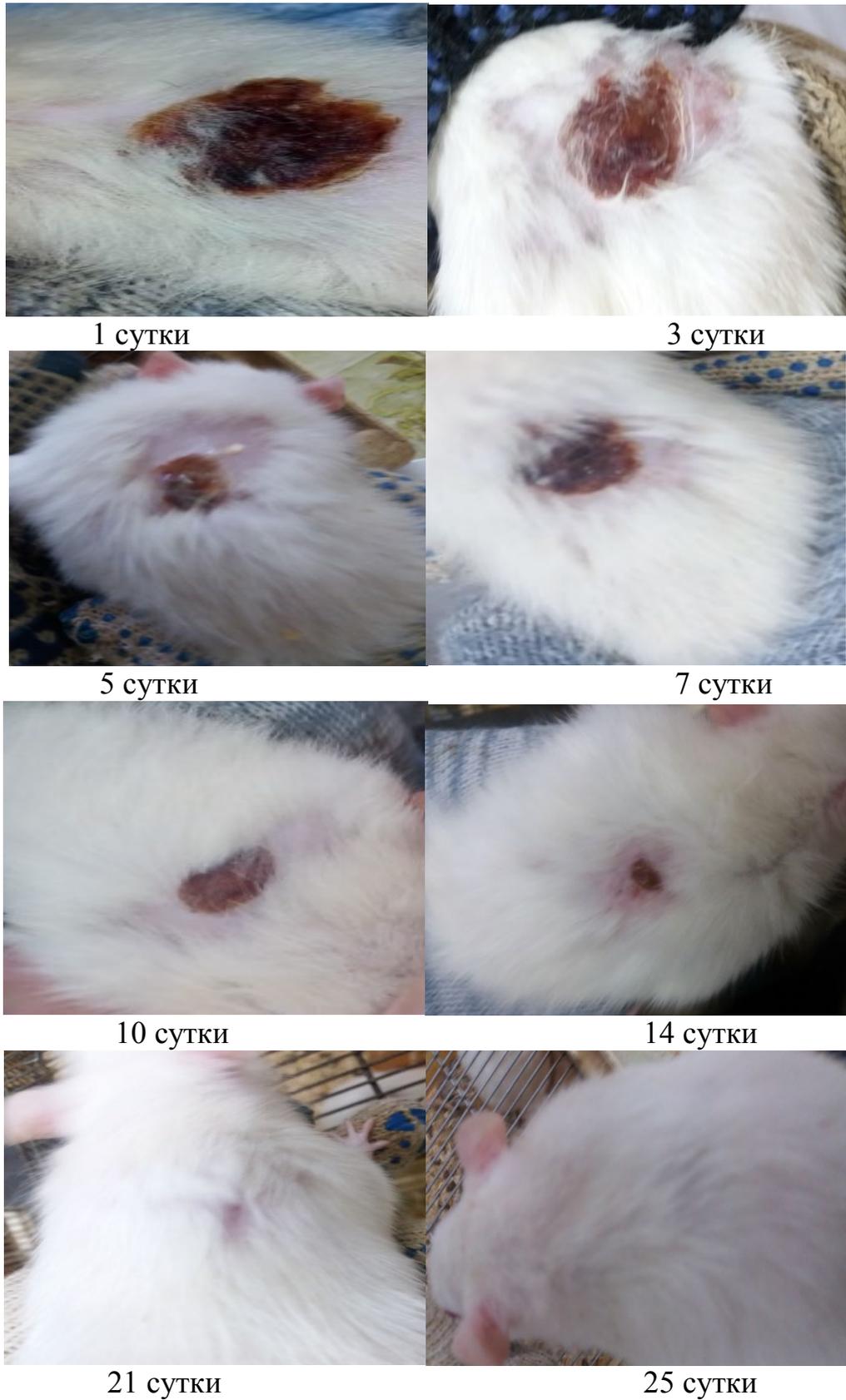


Рисунок 13 – Влияние 5 % декспантенола на процесс заживления ожоговых ран группы (3)

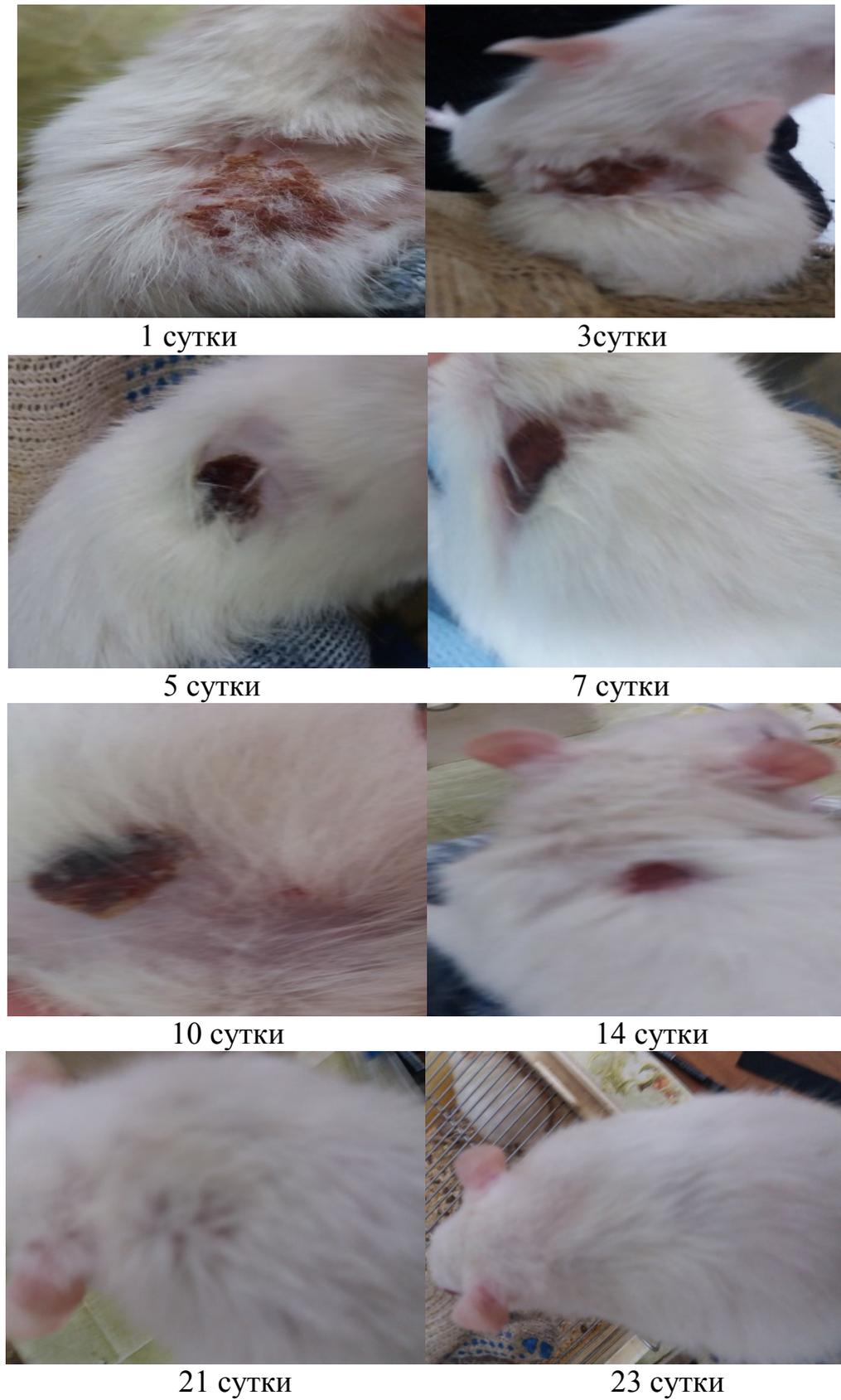


Рисунок 14 – Влияние ЭПС *L. lactis* В-1662 на заживление ожоговых ран группы (4)



Рисунок 15 – Влияние ЭПС *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран группы (5)

### 2.2.5. Изучение влияния экзополисахарида *S. thermophilus* на организм сельскохозяйственной птицы

Исследования проводили в период с июля 2014 г. по июнь 2015 г. Исследуемые цыплята кросса Хаббард ИЗА Ф-15 яичного направления были распределены на контрольную и опытную группы по десять голов в каждой. Цыплята контрольной группы получали общепринятый в хозяйстве рацион кормления (Таблица 5).

Таблица 5 – Рецептúra полнорационного комбикорма № ПК-ИЗА-15-8 для цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15

Состав	Расход по норме, %	Количество, кг	Количество с потерями, кг
Пшеница	61,664	616,640	622,806
Отруби пшеничные	13,000	130,000	131,300
Шрот подсолнечный СП 35%, СК 17%	9,724	97,240	98,212
Овес	8,000	80,000	80,800
Соя полножирная экструдированная СП	2,000	20,000	20,200
Премикс для молодого поголовья ДСМ	1,100	11,000	11,110
Мел кормовой	1,000	10,000	10,100
Монокальцийфосфат	0,844	8,440	8,524
Масло подсолнечное	0,700	7,000	7,070
Известняк	0,700	7,000	7,070
Монохлоргидрат лизина 98%	0,300	3,000	3,030
Сульфат натрия	0,269	2,690	2,717
Элитокс	0,150	1,500	1,515
Соль поваренная	0,140	1,400	1,414
DL- метионин 98,5 %	0,140	1,400	1,400
Асид лак	0,100	1,000	1,010
L- треонин 98%	0,069	0,690	0,697
Овокрак	0,050	0,500	0,505
Альбак	0,030	0,300	0,303
Калий углекислый безводный	0,020	0,200	0,202

В опытной группе, вдобавок к основному рациону, цыплята получали перорально по 10 мл раствора ЭПС *S. thermophilus* (0,06 г/кг массы птицы) два раза в неделю в течение первого месяца жизни. Для формирования групп подбирали здоровых цыплят, выровненных по живой массе и развитию, характерному для суточного возраста. Условия содержания, показатели микроклимата, кучность посадки во всех группах были одинаковыми. Содержание цыплят было напольным, на глубокой подстилке из древесной стружки. Во время эксперимента антибиотики не применялись.

При проведении исследований у цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15 была изучена в динамике живая масса. Живую массу цыплят изучали путем индивидуального взвешивания в одно и то же время, до утреннего кормления. Живая масса является ведущим (основным) хозяйственно-полезным признаком мясной продуктивности птицы, которая отражает ее рост и развитие в зависимости от возраста, технологии содержания, характера кормления и других факторов. Динамика живой массы подопытных цыплят представлена в таблице 6. При выводе цыплят их живая масса составила 40 г. Следующий прирост живой массы в обеих группах (контрольной и опытной) проходил практически равномерно и составлял через 1 сутки – 55-56 г, через 21 сутки – 539-545 г. Расхождение в массе птицы контрольной и опытной групп начинало происходить через 22 суток. Как видно из таблицы 6, в опытной группе цыплят, где в корм был добавлен ЭПС *S. thermophilus*, масса тела птицы составила 625,2 г, что на 10,9 % уже превышало массу тела цыплят в контрольной группе. Разность в массе птицы опытной и контрольной групп отмечалась на протяжении 2 месяцев. К концу 2 месяца (60 дней) в опытной группе цыплят масса тела была равна 1041г, что было выше контроля на 8,2% (Таблица 6). В последующие месяцы разницы в массе цыплят опытных и контрольной групп не наблюдалось.

Таблица 6 – Влияние ЭПС *S. thermophilus* на прирост живой массы сельскохозяйственной птицы кросса Хаббард ИЗА  
Ф-15 (M±m), грамм

Группа	Сутки				Месяцы			
	22	25	28	31	2	3	4	10
Опытная	625,2 ± 11,17*	706,0 ± 11,47*	689,0 ± 10,80*	700,0 ± 6,8*	1041,0 ± 30,12*	1508,0 ± 28,8	1735,0 ± 50,12	3442,0 ± 50,0
Контрольная	564,0 ± 18,04	649,0 ± 15,2	636,0 ± 14,19	645,0 ± 9,08	962,0 ± 21,07	1462,0 ± 36,0	1664,0 ± 44,0	3328,0 ± 100,3

Примечание: P ≤ 0,05 \*относительно контрольной группы.

При определении микробиологических показателей было показано (Таблица 7), что на второй месяц жизнедеятельности в возрасте двух месяцев у цыплят опытной группы общее микробное число снижалось на 50 % ( $P \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой, а количество молочнокислых бактерий увеличилось на 33,3 % ( $P \leq 0,05$ ). В возрасте трех месяцев отмечено идентичное снижение ОМЧ, а количество молочнокислых бактерий было больше на 75,0 % ( $P \leq 0,05$ ). В возрасте 4-х месяцев по показателю ОМЧ различий не наблюдалось.

Таким образом, в опытной группе цыплят количество молочнокислых бактерий превышало их количество в контрольной группе, начиная с месячного возраста в 1,4 раза, и оставалось высоким на протяжении всего эксперимента. В 4-х месячном возрасте количество молочнокислых бактерий в опытной группе цыплят было выше в 4,2 раза контрольной группы цыплят.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение в рацион цыплятам кросса Хаббард ИЗА Ф-15 ЭПС *S. thermophilus* способствует достоверному увеличению их живой массы на протяжении двух месяцев по сравнению с контролем, на общем фоне увеличения количества молочнокислых бактерий, и снижения ОМЧ.

Таблица 7 – Влияние ЭПС *S. thermophilus* на микрофлору сельскохозяйственной птицы, КОЕ/г

Группа	Количество бактерий							
	Время, месяц							
	1		2		3		4	
	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий	ОМЧ	Количество молочнокислых бактерий
Опытная	$1,0 \times 10^{10} \pm 0,9^*$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,4^*$	$1,0 \times 10^9 \pm 0,2^*$	$4,0 \times 10^9 \pm 0,2^*$	$1,0 \times 10^{11} \pm 0,2^*$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,5^*$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,01$	$3,0 \times 10^7 \pm 0,4^*$
Контрольная	$5,0 \times 10^9 \pm 0,9$	$5,0 \times 10^8 \pm 0,4$	$2,0 \times 10^9 \pm 0,2$	$3,0 \times 10^9 \pm 0,2$	$2,0 \times 10^{11} \pm 0,2$	$4,0 \times 10^8 \pm 0,5$	$7,0 \times 10^8 \pm 0,01$	$7,0 \times 10^6 \pm 0,4$

Примечание:  $P \leq 0,05$  \*относительно контрольной группы.

## Заключение

В связи с возрастающей потребностью в биополимерах многих отраслей промышленности, сельского хозяйства, медицины, экологического звена, значительно выросли поиск и апробация новых источников экзополисахаридов с широким прикладным диапазоном применения. Поэтому получение ЭПС из бактерий, в том числе из молочнокислых бактерий, изучение их физико-химических и биологических свойств, является актуальной задачей.

Начальным этапом нашего исследования стал подбор условий культивирования культур *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* для максимального продуцирования ЭПС.

Было обнаружено, что продукция ЭПС *L. lactis* В – 1662 достигала своего максимума к 24–26 ч. Было определено, что при культивировании лактококка на среде (Welman, Maddox, Archer, 2003) с сахарозой выход ЭПС был максимальным и составлял 687 мг/л.

У *S. thermophilus* выход ЭПС приходился на стационарную фазу роста (16-24 часа). Показано, что при выращивании стрептококка на среде A. Welman (2003) с глюкозой выход ЭПС составлял 1,5 г/л. При внесении в среду культивирования лактозы продукция ЭПС была равна 1,7 г/л. При добавлении же сахарозы в среду культивирования продукция ЭПС увеличивалась до 2,3 г/л.

Оптимальными условиями для выделения ЭПС явилось культивирование *L. lactis* В – 1662 температуре 27 °С, *S. thermophilus* – 38 °С в течение 48 ч при 180 об/мин. на термостатируемой качалке на питательной среде (Welman, Maddox, Archer, 2003), рН 5,5. Нами усовершенствована методика выделения ЭПС, за основу которой взят метод J. Cerning.

Далее были определены физико-химические показатели экзополисахаридов, используя для этого методы ионнообменной, гель-хроматографии. Было показано, что экзополисахарид *L. lactis* В – 1662 состоит из одной нейтральной фракции. Молекулярная масса нейтральной

фракции ЭПС составила 10 кДа. Нейтральная фракция была представлена глюкозой и ксилозой в соотношении 1:1 и следовыми количествами рамнозы (5,8%). Вязкость 10% раствора ЭПС *L. lactis* В – 1662 составляет 1,3 мм<sup>2</sup>/с. ЭПС *S. thermophilus* была представлена также одной нейтральной фракцией, молекулярной массой 20 кДа. ЭПС состоял из рамнозы галактозы, маннозы в соотношении 1:2:1 с присутствием следов глюкозы (4,4%). Вязкость 10% раствора ЭПС *S. thermophilus* была равна 1,23 мм<sup>2</sup>/с.

Следующим этапом исследований явилось изучение влияния ЭПС *L. lactis* и *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран у лабораторных крыс. Для этого использовали ЭПС *L. lactis* и *S. thermophilus*, а для сравнения – коммерческий препарат 5% декспантенол. В группе животных (2) у которых вызывали ожог, через 1 сутки образовывалась небольшая сухая корка темно-красного цвета с ровными краями. Цвет и форма корки (струпа) оставались неизменными в течение всего эксперимента, отслоения струпа не происходило. На 7 сутки отмечали прорастание шерстки на месте ожога. Через 10 суток наблюдали сокращение площади корки. Полное заживление ожога и восстановление шерстного покрова у крыс этой группы происходило через 28 суток.

При нанесении 5% декспантенола животным (группа 3) наблюдали идентичную картину, как у животных в группе 2. Также через сутки образовывалась корка темно-красного цвета с ровными краями, площадь которой начинала уменьшаться с 14 суток. Отшелушивания корки на протяжении всего эксперимента не происходило. Прорастание шерстки также наблюдали на 7 сутки. Заживление раны происходило к 25 суткам, а шерстный покров полностью восстанавливался к 28 суткам эксперимента.

При нанесении на ожоговую рану животным ЭПС *L. lactis* В-1662 (группа 4) через 1 сутки также наблюдали образование корки красного цвета с ровными краями. Начиная уже с 1 суток, происходило уменьшение площади ожога. На 5 сутки было замечено прорастание шерсти на

поверхности ожога. На 7 сутки наблюдали отшелушивание корки, а на 10 сутки и её отслоение. На 23 сутки наблюдали полное заживление и зарастание шерстью ожоговых ран.

При нанесении ЭПС *S. thermophilus* животным (группа 5) также через сутки наблюдали уменьшение площади раны. Однако, площадь раны у крыс была значительно меньше, чем у животных 4 группы, раны которых обрабатывали ЭПС *L. lactis* В-1662. На 5 сутки начиналось более интенсивное прорастание шерсти у крыс по сравнению с животными 4 группы. Слушивание и отслоение корки наблюдали в то же время, что и у животных 4 группы - на 7 сутки. Заживление раны и полное восстановление шерстного покрова наблюдали также на 23 сутки, как и в случае обработки ран у крыс ЭПС *L. lactis* В - 1662 (4 группа). Кроме того, было замечено, что в случае обработки ран у крыс ЭПС *S. thermophilus* шерстный покров визуально был более густой и равномерный, чем у крыс, раны которых обрабатывали ЭПС *L. lactis* В-1662.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствовали о том, что ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* способствуют заживлению ожогов степени IIIa у крыс с полным восстановлением кожно-шерстного покрова. Преимущество ЭПС *S. thermophilus* в заживлении ожоговых ран заключалось в формировании более густого и равномерного шерстного покрова.

Дальнейшим этапом явилось изучение влияния ЭПС на организм сельскохозяйственной птицы. Разница в массе птицы опытной и контрольной групп наблюдали на протяжении 2 месяцев. К концу 2 месяца (60 дней) в опытной группе цыплят масса тела была равна 1041г, что было выше контроля на 8,2%. В последующие месяцы разницы в массе цыплят опытных и контрольной групп не наблюдалось. При определении микробиологических показателей в опытной группе цыплят количество молочнокислых бактерий превышало их количеств в контрольной группе, начиная с 1 месяца, в 1,4

раза и оставалось выше на протяжении всего эксперимента. Через 4 месяца количество молочнокислых бактерий в опытной группе цыплят было выше в 4,2 раза контрольной группы цыплят.

Таким образом, было установлено, что выделенные нами ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* обладают широким спектром полезных свойств, применимых в сельском хозяйстве.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Положительное влияние ЭПС молочнокислых бактерий *L. lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* на заживление ожоговых ран животных и организм сельскохозяйственной птицы, установленное в настоящей работе, может являться основой в перспективе для их применения в сельском хозяйстве.

## Выводы

1. Подобраны оптимальные условия для максимального выхода ЭПС из клеток *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* культивирования: среда A.Welman с соавт. (2003) в нашей модификации, рН 5,5, время культивирования 48 ч, температура 27 °С и 38 °С соответственно.

2. Впервые выделены экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus*, представленные нейтральной фракцией с молекулярными массами 10 кДа и 20 кДа соответственно. ЭПС *L. lactis* В-1662, состоит из глюкозы, ксилозы в соотношении 1:1 и следовых количеств рамнозы (5,8%); обладает вязкостью 1,3 мм<sup>2</sup>/с. ЭПС *S. thermophilus*, состоит из рамнозы, галактозы, маннозы в соотношении 1:2:1 с присутствием следов глюкозы (4,4%); обладает вязкостью 1,23 мм<sup>2</sup>/с.

3. Показано, что ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* способствуют заживлению ожогов степени IIIа у крыс с полным восстановлением кожно-шерстного покрова. Наилучший регенерирующий эффект выявлен в отношении ЭПС *S. thermophilus*.

4. Установлено, что введение в корм цыплят кросса Хаббард ИЗА Ф-15 ЭПС *S. thermophilus* способствует увеличению их живой массы до 2-х месячного возраста.

5. Обнаружено, что введение в рацион цыплят ЭПС *S. thermophilus* повышает количество молочнокислых бактерий через 1 месяц в 1,4 раза, а через 4 месяца – в 4,2 раза по сравнению с контролем.

### **Список сокращений и условных обозначений**

КПС – капсульный полисахарид

КЖ – культуральная жидкость

ЛПС – липосахарид

МПА – мясо-пептонный агар

ПС – полисахариды

ЭПС – экзополисахариды

LAB-EPS и бифидо -EPS – экзополисахариды лактобацилл и бифидобактерий

MRS –агар– питательный агар для лактобактерий

## Список литературы

1. Абрамова, А.А. «Подбор штаммов термофильного стрептококка по продуцированию ЭПС для улучшения качества йогурта» / А.А. Абрамова, В.Ф. Семенихина // Живые системы и биологическая безопасность населения. – 2008. – С. 171 – 173.
2. Артюхова, С.И. Об актуальности использования при производстве биопродуктов для функционального питания молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды / С.И. Артюхова, Е.В. Моторная // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 5 (часть 1). – С. 76 – 76.
3. Артюхова, С.И. Изучение синтеза экзополисахаридов молочнокислыми палочками при различных температурах культивирования / С.И. Артюхова, Е.В. Моторная // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 6. – С. 80 – 80.
4. Артюхова, С.И. Об актуальности использования молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды при производстве кисломолочного напитка «ТАН» / С.И. Артюхова, С.А. Меньших // Международный журнал экспериментального образования. – 2016. – № 12 (часть 1). – С. 11 – 11.
5. Беседнова, Н.Н. Экзополисахариды морских бактерий перспективы применения в медицине / Н.Н. Беседнова, Т.П. Смолина, Б.Г. Андрюков [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2018. – № 7 – 8. – С. 67 – 78.
6. Бухарова, Е.Н. Пищевые пленочные покрытия / Е.Н. Бухарова, Г.Е. Рысмухамбетова, Ю.В. Кулешова [и др.] // Биотехнология: перспективы, состояние, развитие: Материалы 5 Международного конгресса, 16-20 марта 2009. – М.: ООО «Экспоконсалтинг», 2009. – С. 55.

7. Буряков, Н.П. Жидкие полисахариды в кормлении высокопродуктивных коров / Н.П. Буряков, А.В. Косолапов // Российский ветеринарный журнал. – 2013. – № 3. – С. 34 – 36.
8. Буряков, Н.П. Полисахариды в кормлении молочного скота / Н.П. Буряков А.В. Косолапов, М.А. Малков [и др.] // Сыроделие и маслоделие. – 2017. – № 6. – С. 51 – 54.
9. Ботвинко, И.В. Экзополисахариды бактерий / И.В. Ботвинко // Успехи микробиологии. – 1985. – Т. 20. – С. 79 – 122.
10. Ботвинникова, В.В. Влияние акустического воздействия ультразвука на бисинтез экзополисахаридов и реологические свойства кисломолочных продуктов, полученных на основе кефирного грибка / В.В. Ботвинникова И.В. Калинина, И.Ю. Потороко [и др.] // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2016. – Т. 4, № 4. – С.14 – 25.
11. Богатырева, А.О. Получение бактериальных экзополисахаридов на средах с отходами биотехнологических производств /А.О. Богатырева, Н.Б. Сапунова, М.В. Щанкин // Вестник технологического университета. – 2016. – Т.19, №24. – С. 142 – 145.
12. Барейко, А.А. Промышленно ценные свойства лактококков и самоквасных молочных продуктов / А.А. Барейко, А.В. Сидоренко, Г.И. Новик // «Научные стремления – 2011»: Сборник материалов II Международной научно-практической конференции молодых ученых, 14-18 ноября 2011 года. – Минск.: Белорусская наука, 2011. – Т. 1 – С. 144.
13. Ботина, С.Г. Использование штаммов молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды, в производстве кисломолочных продуктов питания / С.Г. Ботина, И.В. Рожкова, В.Ф. Семенихина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – № 1. – С. 38 – 40.
14. Блинов, Н.П. Химия микробных полисахаридов / Н.П. Блинов. – М.: Высшая школа, 1984. – 286 с.

15. Варбанец, Л.Д. Методы исследования эндотоксинов / Л.Д. Варбанец, Г.М. Здоровенко, Ю.А. Книрель. – Киев: Наукова Думка, 2006. – 234 с.
16. Вазина, И.Р. Шок и сепсис как причины смерти обожженных / И.Р. Вазина, В.А. Вазина, Т.И. Зудина // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 1988. – Т. 140, № 6. – С. 58 – 62.
17. Воробьев, А.В. Микробиология. / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков [и др.]. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.
18. Вудсайд, Е. Полисахариды микроорганизмов / Е. Вудсайд, Е. Кваринский. – М.: Высшая школа, 1977. – 26 с.
19. Ганина, В.И. Анализ зарубежных исследований в области молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды / В.И. Ганина, Т.В. Рожкова // Известия вузов. Пищевые технологии. – 2005. – № 5 – 6. – С. 65 – 66.
20. Ганина, В.И. Плазмидный профиль штаммов молочнокислых бактерий, продуцирующих экзополисахариды / В.И. Ганина, Т.В. Рожкова, М.А. Тренина [и др.] // Известия Вузов. Пищевая технология. – 2005. – № 4. – С. 37 – 39.
21. Горин, С.Е. Перспективы изучения внеклеточных полисахаридов дрожжей / С.Е. Горин, А.Ф. Свиридов, И.П. Бабьева // Микробные метаболиты. – М.: Наука, 1979. – 347 с.
22. Гвоздяк, Р.И. Микробный полисахарид ксантан / Р.И. Гвоздяк, М.С. Матышевская. – Киев: Наукова думка, 1989. – 212 с.
23. Глоба, Л.И. Биологическая деноксация химических патогенов в водной среде / Л.И. Глоба, П.И. Гвоздяк // Гигиена и санитария. – 2015. – № 1. – С. 48 – 52.
24. Дацева, Т.А. Экзополисахариды молочнокислых бактерий / Т.А. Дацева, Н.А. Коваленко // СГУ.: Ставрополь. Internet. – 3 с.

25. Дерябин, В.В. Выделение экзополисахаридов микроорганизмов / В.В. Дерябин, Л.А. Старухина, Е.Ф. Григорьев // Биотехнология. – 1984. – Т. 4, № 6. – С. 735 – 743.
26. Дробот, В.И. Влияние микробных экзополисахаридов на структурно-механические свойства теста / В.И. Дробот, Т.А. Гринберг // Тезисы докладов 3-го симпозиума соцстран по биотехнологии. – Братислава, 1983. – С. 5 – 6.
27. Елинов, Н.П. Химия микробных полисахаридов / Н.П. Елинов. – М.: Высшая школа, 1984. – 254 с.
28. Елинов, Н.П. Некоторые микробные полисахариды и их практическое применение / Н.П. Елинов // Успехи микробиологии. – М.: Наука, 1982. – С. 158 – 177.
29. Елинов, Н.П. Биосинтез гетерополисахаридов некоторыми криптококками / Н.П. Елинов, Г.Л. Витовская, Е.П. Ананьева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 1982. – Т. 18, № 5. – С. 636 – 639.
30. Ермольева, З.В. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды / З.В. Ермольева, Г.Е. Вайсберг. – М.: Медицина, 1976. – 184 с.
31. Еникеев, Р.Р. Описание, биосинтез и биологическое действие полисахарида кефирных грибков – кефирана / Р.Р. Еникеев // Биофармацевтический журнал. – 2011. – Т. 3, № 3. – С. 11 – 18.
32. Егоренкова, И.В. Состав и иммунохимическая характеристика экзополисахаридов ризобактерий *Paenibacillus polymyxa* 1465 / И.В. Егоренкова, К.В. Трегубова, Л.Ю. Матора [и др.] // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 5. – С. 623 – 629.
33. Залашко, М.В. Влияние источников углерода на биосинтетическую активность дрожжей – продуцентов экзополисахаридов / М.В. Залашко, Г.А. Салохина, Т.В. Шамгина [и др.] // Микробиология. – 1990. – Т. 59. – С. 1010 – 1014.

34. Захарова, И.Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко. – Киев: Наукова думка, 1982. – 192 с.
35. Ибрагимова, С.А. Использование микробных полисахаридов для обработки семян [Электронный ресурс] / С.А. Ибрагимова, М.М. Фомкина // Огарев-online. – 2016. – № 24. – Режим доступа: <http://journal.mrsu.ru/arts/ispolzovanie-mikrobnyx-polisaxaridov-dlya-obrabotki-semyan>.
36. Ибрахим, И.М. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) / И. М. Ибрахим, С. А. Коннова, Е. Н. Сигида [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия Серия Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, Вып. 3. – С. 345 – 353.
37. Иркитова, А.Н. Подбор штаммов микроорганизмов в комбинированную закваску для пробиотического кисломолочного напитка / А. Н. Иркитова, И.А. Функ, Р.В. Дорофеев // Молочная промышленность. – 2017. – № 1. – С. 46 – 47.
38. Кадырова, Р.Г. Тонкослойная хроматография. Идентификация и разделение углеводов, витаминов и токсичных соединений / Р.Г. Кадырова. – Казань: Казанский гос. энергетический ун-т, 2010. – 95 с.
39. Карташев, А.А. Влияние условий культивирования на биосинтез экзополисахарида штаммом *Streptococcus thermophilus* LB-50 / А.А. Карташев, Г.В. Коев // III Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов: сборник тезисов, 2016. – Новосибирск: ИПЦ НГУ. – С. 41– 45.
40. Кебекбаева, К.М. Способность молочнокислых бактерий, входящих в консорциум, синтезировать экзополисахариды / К.М. Кебекбаева, А.Е. Молжигитова, Г.Т Джакибаева // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия биологическая и медицинская. – 2017. – Т.4. – С. 89 – 94.

41. Кичемазова, Н.В. Получение, свойства и сферы возможного применения экзополисахаридов бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter* / Н.В. Кичемазова, Е.Н. Бухарова, Н.Ю. Селиванов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т 53, № 3. – С. 285 – 290.
42. Костина, Е.Г. Влияние концентрации глюкозы в питательной среде на накопление альгината культурой *Azotobacter vinelandii* Д-05 / Е.Г. Костина, В.В. Ревин // Сборник научных трудов SWORLD. – 2012. – Т. 45, № 4. – С. 93 – 94.
43. Колешко, О. И., Микробиология с основами вирусологии / О.И. Колешко, Т.В. Завезенова. – Иркутск: ИГУ, 1999. – 452 с.
44. Кочетков, Н.К. Синтез полисахаридов / Н.К. Кочетков. – М.: Наука, 1994. – 217 с.
45. Кочетков, Н.К. Химия углеводов / Н.К. Кочетков, А.Ф. Бочков, Б.А. Дмитриев [и др.]. – М.: Химия, 1967. – 672 с.
46. Ксенофонтов, Б.С. Особенности получения экзополисахаридов биотехнологическим способом / Б.С. Ксенофонтов // *Universum: Химия и биология* : электрон. научн. журн. Ксенофонтов Б.С. [и др.]. – 2015. – № 5 (13). – URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2126>.
47. Ксенофонтов, Б.С. Использование микроорганизмов в качестве флокулянтов для очистки сточных вод и осветления тонкодисперсных суспензий / Б.С. Ксенофонтов, Е.Е. Гончаренко, Петрова Е.В. // *Сантехника*. – 2014. – № 3. – С. 50 – 53.
48. Ксенофонтов, Б.С. Особенности получения экзополисахаридов биотехнологическим способом / Б.С. Ксенофонтов, А.С. Козодаев, Р.А. Таранов [и др.] // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн*. – 2015. – №5 (13). – URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2126>.
49. Красникова, Л.В. Синтез экзополисахаридов штаммами *L. acidophilus* в молочной сыворотке / Л.В. Красникова, В.В. Маркелова // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. – 2013. – № 4 (334). – С. 26 – 28.

50. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
51. Лахтин, М.В. Экзополимеры пробиотических лактобацилл и бифидобактерий (новые подходы и свойства) / М. В. Лахтин, В.М. Лахтин, А.В. Алешкин // Бюллетень Восточно – Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 8, № 5. – С. 257 – 261.
52. Лавина, А.М. Анализ влияния ризобияльных экзополисахаридов на семена и проростки клевера красного (*Trifolium pratense*) / А.М Лавина, Л.Р. Нигматуллина, З.Р. Вершинина [и др.] // Вестник защиты растений. – 2016. – 3(89). – С. 91 – 93.
53. Логинов, Я.О. Экзополисахариды бактерий родов *Azotobacter*, *Pseudomonas* и *Bacillus* для создания биофунгицидов пролонгированного действия / Я.О. Логинов, Г.Г. Худайгулов, С.П. Четвериков [и др.] // Аграрная Россия. – 2009. – Специальный выпуск. – С. 125 – 126.
54. Мизина, П.Г. Фитопленки в фармации и медицине / П.Г. Мизина // Фармация. – 2000. – № 5 – 6. – С. 38 – 40.
55. Миронов, О.Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря / О.Г. Миронов // Морской экологический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 56 – 66.
56. Макарова, С.Г. Кишечная микробиота и использование пробиотиков в практике педиатра / С.Г. Макарова, Л.С. Намазова-Баранова // Педиатрическая фармакология. – 2015. – 12 (1). – С. 38 – 45.
57. Мальцева, Н.Н. Экзополисахариды олигонитрофильных бактерий как фактор, обуславливающий образование микробных сообществ почвы / Н.Н. Мальцева. – Киев: Наукова думка, 1981. – 242 с.
58. Мадалиев, Т.А. Биоразведка бактерий-продуцентов экзополисахаридов из различных природных экосистем для синтеза биополимеров из барды / Т.А. Мадалиев, М.Г. Косимов, А.А. Абролов // Universum: химия и биология:

электрон. научн. журн. – 2020. – № 12(78). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/10996> (дата обращения: 24.06.2021).

59. Михайлов, В.В. Морская микробиология в ТИБОХ ДВО РАН. / В.В. Михайлов // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2005. – № 4. – С. 145 – 151.

60. Мишурнова, Н.В. Современное представление о роли нормальной микрофлоры пищеварительного тракта / Н.В. Мишурнова, Ф.С. Киржаев // Ветеринария. – 1993. – № 6. – С. 30 – 33.

61. Новик, Г.И. Характеристика полисахаридов, секретируемых *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ / Г.И. Новик, Н.И. Астапович, Й. Кюблер [и др.] // Микробиология. – 2002. – Том 7, № 2. – С. 205 – 210.

62. Няникова, Г.Г. Иммобилизация на хитине *Bacillus mucilaginosus* – продуцента экзополисахаридов / Г.Г. Няникова, Е.Э. Куприна, О.В. Пестова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – № 3. – С. 300 – 304.

63. Николаев, Ю.А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – № 2. – С. 149 – 163.

64. Определитель бактерий Берджи. Т. 1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – М.: Мир, 1997.– 432 с.

65. Определитель бактерий Берджи. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – М.: Мир, 1997.– 368 с.

66. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Наука. – 1985. – 536 с.

67. Онищенко, Г.Г. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев [и др.]. – М.: ГОУ ВУНМЦ Минздрава РФ, 2002. – 608 с.

68. Онищенко, Г.Г. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Г.Г. Онищенко, В.А. Алёшкин, С.С. Афанасьев [и др.]. – М.: ГОУ ВУНМЦ Минздрава РФ, 2002. – 608 с.
69. Орлова, Т. Н. Мезофильные лактококки в составе бактериальных заквасок для сыров / Т. Н. Орлова, А. Н. Иркитова // Сыроделие и маслоделие. – 2014. – № 4. – С. 28–30.
70. Петровская, В.Г. Микрофлора человека в норме и патологии / В.Г. Петровская, О.П. Марко. – М.: Медицина, 1976. – 221 с.
71. Пархоменко, А.Н. Скриннинг микроорганизмов - декструкторов нефтяных углеводородов / А.Н. Пархоменко // Экобиотех. – 2019. – Т. 2, № 3. – С. 330 – 338.
72. Пономарь, Н.С. Влияние препарата ионизированного серебра на репаративную регенерацию кожи и подлежащих тканей при моделировании термических и химических ожогов у крыс / Н.С. Пономарь // Биомедицина. – 2012. – № 1. – С. 143 –148.
73. Полукаров, Е.В. Влияние экзополисахаридов *Lactobacillus delbrueckii spp.bulgaricus* на цитокиновый статус лабораторных мышей / Е.В. Полукаров, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2009. – № 4 – 5. – С. 309 – 310.
74. Правдивцева, М.И. Влияние лаксаранов на процесс заживления ран у животных / М.И. Правдивцева, Л.В Карпунина, Е.Н. Бухарова // Аграрная наука в XXI веке; проблемы и перспективы: сборник науч. статей VI Всероссийской науч. - практ. конф. Саратов. – 2012. – Ч.П. – С. 82 – 84.
75. Проскурякова, М.В. Влияние бактериальных экзополисахаридов на кислотную резистентность эритроцитов белых мышей / М.В. Проскурякова, М.Д. Сметанина, Е.Н. Бухарова [и др.] // Научное обозрение. – 2015 – № 5. – С. 24 – 29.

76. Перепелкин, К.Е. Полимерные материалы будущего на основе возобновляемых растительных ресурсов и биотехнологий: волокна, пленки, пластики / К.Е. Перепелкин // Химические волокна. – 2005. – № 6. – С. 5–16.
77. Рабек, Я. Р. Экспериментальные методы в химии полимеров / Я.Р. Рабек. – М.: Мир. – 1983. – 253с.
78. Ревин, В.В. Разработка перспективных функциональных и конструкционных биоконпозиционных материалов на основе микробных полисахаридов / В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, Н.А. Атыкян [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы международного форума, 23 – 25 мая 2018. – М.: ООО « Русские Экспо Дни Групп», 2018. – С. 737 – 739.
79. Рожкова, Т.В. Биотехнология стартовых культур на основе молочнокислых бактерий, синтезирующих полисахариды: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.07 /Татьяна Вячеславовна Рожкова. – Москва, 2006. – 159 с.
80. Рысмухамбетова, Г.Е. Выделение и очистка экзополисахаридов из ксантомонад / Г.Е. Рысмухамбетова, Л.В. Карпунина, Е.А. Бухарова [и др.] // Вестник Саратовского госагроуниверситета имени Н.И. Вавилова. – 2008. – № 4. – С. 42–45.
81. Семенихина, В.Ф. Разработка заквасок для кисломолочных продуктов / В.Ф. Семенихина, И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная [и др.] // Молочная промышленность. – 2013. – № 11. – С. 30 – 31.
82. Сопрунова, О.Б. Перспективы использования слизиобразующих бактерий в нефтяной отрасли / О. Б. Сопрунова, Нгуен Виет Тиен // Юг России: экология, развитие. – 2010. –№ 4. – С. 91 – 93.
83. Смолькина, О.Н. Капсульный полисахарид бактерии *Azospirillum lipoferum* Sp59b. Структура и антигенная специфичность / О.Н. Смолькина, В.В. Качала, Ю.П. Федоненко [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 5. – С. 707 – 716.

84. Стоянова, Л.Г. Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование: дис. д-ра биол. наук: 03.00.07 / Лидия Григорьевна Стоянова. – Москва, 2008. – 356 с.
85. Сироткин, А.С. Микробные экзополимеры в природных и техногенных процессах / А.С. Сироткин // Юбилейная научная школа-конференция «Кирпичниковские чтения по химии и технологии высокомолекулярных соединений: сборник материалов, 2013. – Казань.: КНИТУ. – С. 56 – 58.
86. Сеник, Е.В. Особенности получения экзополисахаридов биотехнологическим способом / Е.В. Сеник, М.С. Виноградов, А.А. Воропаева [и др.] // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн.* – 2015. – № 5 (13). – URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2126> (дата обращения: 22.01.2020).
87. Хавкин, А.И. Микроэкология кишечника: методы неспецифической коррекции / А.И. Хавкин, С.В. Бельмер // *Русский медицинский журнал.* – 2003. – № 13. – 772.
88. Хотимченко, Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк [и др.] // *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук.* – 2005. – № 1. – С. 72 – 82.
89. Хотимченко, Ю.С. Физико-химические свойства, физиологическая активность и применение альгинатов: полисахаридов бурых водорослей / Ю.С. Хотимченко, В.В. Ковалев, О.В. Савченко [и др.] // *Биология моря.* – 2001. – Т. 27, № 3. – С. 151 – 162.
90. Худайгулов, Г.Г. Экзополисахарид альгинатного типа *Paenibacillus ehimensis* 739 II / Г.Г. Худайгулов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2011. – № 5. – С. 214 – 217.

91. Хохлачева, А.А. Кефирные грибки как ассоциативная культура микроорганизмов: дис. ... канд. биол. Наук: 03.01.06 / Александра Алексеевна Хохлачева. – Москва, 2015. – 167 с.
92. Хусаинов, И.А. Современные представления о биосинтезе бактериальных экзополисахаридов / И.А. Хусаинов // Вестник технологического университета. – 2014. – Т. 17, № 5. – С.167 – 172.
93. Хусаинов, И.А. Тенденции развития производства бактериальных полисахаридов / И.А. Хусаинов, З.А. Канарская // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – № 6. – С. 208 – 212.
94. Хазагаева, С.Н. Оптимизация условий биосинтеза полисахаридов культурами пробиотических бактерий / С.Н. Хазагаева, С.И. Болдоева // Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков. – 2015. – № 9. – С.62 – 67.
95. Ханхалаева, И.А. Применение стартовых культур в производстве сырокопченых колбас / И.А. Ханхалаева, Н.В. Митыпова // Мясная индустрия. – 2014. – № 7. – С. 19 – 20.
96. Хамагаева, И.С. Влияние условий автоселекции на биосинтез экзополисахаридов и адгезивную активность микробного консорциума/ И.С. Хамагаева, Т.Н. Занданова, Н.А. Замбалова // Вестник Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления. – 2013. – № 2. – С. 57 – 62.
97. Ха, Т.З. Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Raenibacillus mucilaginosus* на питательной среде с мелассой / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2020. – № 10(4). – С.708 – 718.
98. Четвериков, С.П. Экзополисахариды бактерий *Azotobacter* и *Pseudomonas* – основа биополимеров для увеличения нефтеотдачи / С.П. Четвериков, Я.О. Логинов, Г.Г. Худайгулов [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 10. – С. 509 – 511.

99. Широбоков, В.П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. – Винница: Нова Книга, 2015. – 896 с.
100. Atlas, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation / R.M. Atlas // *Marine Pollution Bulletin*. –1995. – V. 31, N 4-12. – P. 178 – 182.
101. Arena, A. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopoly saccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* / A. Arena, T.L. Maugeri, B. Pavone [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2006. – V. 6 (1). – 813.
102. Abbad Andaloussi, S. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* / S. Abbad-Andaloussi, H. Talbaoui, R. Marczak [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1995. – V. 43. – P. 995 – 1000.
103. Al Muhammadi, R. Widespread induration of the subcutaneous tissue/ R. Al Muhammadi, J. Niesmann, M. Stücker [et al.] // *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. – 2008. – V. 6. – P. 885 – 886.
104. Bach, H. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy met-als / H. Bach, D.L. Gutnick // *Handbook of carbohydrate engineering*. – N.W.: Taylor&Francis Group LLC. – 2005. – P. 507 – 534.
105. Boyd, A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide / A. Boyd, A.M. Chakrabarty // *Journal Industrial Microbiology*. – 1995. – V.15. – P. 162 – 168.
106. Boels, I. C. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis / I. C. Boels, A. Ramos, M. Kleerebezem [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67. – P. 3033 – 3040.
107. Bouzar, F. Exopolysaccharide Production and Texture-Promoting Abilities of Mixed-Strain Starter Cultures in Yogurt Production / F. Bouzar, J. Cerning, M. Desmazeaud // *Journal of Dairy Science*. – 1997. – V. 80, N. 10. – P. 2310 – 2317.

108. Beasley, S.S. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk / S.S Beasley, P.E. Saris // *Applied Environmental Microbiology* – 2004. – V.70, N. 8. – P. 50 – 5051 – 5053.
109. Bishop, P.L. Biofilm structure and kinetics / P.L. Bishop // *Water Sci Technol, Biofilm Systems III Selected Proceeding softhe IAWQ 3rd International Specialised Conference on Biofilm Systems.* – 1997. – V. 36. – P. 287 – 294.
110. Behravan, J. Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen / J. Behravan, BS. Bazzaz, Z. Salimi // *Biotechnology and Applied Biochemistry.* – 2003. – V. 38, N. 3. – P. 267 – 269.
111. Burchard, W. Light scattering from polysaccharides / W. Burchard // *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility.* – New York.: Marcel Dekker, 2005. – P. 189 – 236.
112. Budd, P. M. Preliminary ultracentrifuge studies of the polyelectrolyte behaviour of Welan gum / P.M. Budd // *Progress in Colloid and Polymer Science.* – 1995. – V. 99. – P. 39 – 44.
113. Bradford, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.A. Bradford // *Analitical Biochemistry.* – 1976. – V. 72, N. 1. – P. 248 – 254.
114. Braat, H. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease / H. Braat, P. Rottiers, DW. Hommes [et al.] // *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* – 2006. – V. 4, N. (6). – P. 754 – 759.
115. Chihara, G. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumour activity, especially Lentinan from *Lentinus edodes* (Bark) sing, an edible mushroom / G. Chihara, J. Hamuro, Y. Maeda, [et al.] // *Cancer Research.* – 1970. – V. 30. – P. 2776 – 2781.
116. Carlfors, J. Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use / J. Carlfors, K. Edsman, R. Petersson, K. Jörnving // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 1998. – V.6 (2). – P.113 – 119.

117. Cuadros, J. Clay minerals interaction with microorganisms: a review / J. Cuadros // *Clay Minerals*. – 2017. – V. 52, N. 2. – P. 235 – 262.
118. Carlin, G. Influences on the formation and structure of fibrin / G. Carlin, K. O. Wik, K.E. Arfors [et al.] // *Thrombosis Research*. – 1976. – V. 9. – P. 623 – 636.
119. Casillo, A. Structural characterization of an all-aminosugar-containing capsular polysaccharide from *Colwellia psychrerythraea* 34H / A. Casillo, J. Ståhle, E. Parrilli [et al.] // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2017. – V. 110, N. 11. – P. 1377 – 1387.
120. Ciofani, G. Cytocompatibility, interactions and absorption of boron nitride nanotubes with a polyethylene coating by living cells: confirmation of their potential for biomedical applications / G. Ciofani, V. Raffa, A. Menciassi [et al.] // *Biotechnology Bioengineering*. – 2008. – V. 101 (4). – P. 850 – 858.
121. Cerning, J. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* / J. Cerning, C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud // *Biotechnology Letters*. – 1988. – V. 10. – P. 255 – 260.
122. Cerning, J. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria Bouillanne / J. Cerning, M.J. Desmazeaud, C. Bouillanne [et al.] // *Journal Dairy Science*. – 1992. – V. 75. – P. 692 – 699.
123. Cerning, J. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques / J. Cerning, I.H. Roissart, F.M. Luquet // *Bactéries Lactiques*, Grenoble, France. – 1994. – P. 309 – 329.
124. Cerning, J. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer / J. Cerning, C.M.G.C. Renard, J.F. Thibault [et al.] // *Applied Environmental Microbiology*. – 1994. – V. 60. – P. 3914 – 3919.
125. Costa, O.Y. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation / O.Y. Costa, J.M. Raaijmakers, E.E. Kuramae // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1 – 14.

126. Chapot-Chartier, M.P. Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages / M.P. Chapot-Chartier // *Front Microbiology*. – 2014. – N. 5. – P. 236.
127. Cottrell, I.W. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides / I.W. Cottrell // *Industrial and Engineering Chemistry Product Research Development*. – 1983. – V. 28. – P. 456 – 460.
128. Caggianiello, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms / G. Caggianiello, M. Kleerebezem, G. Spano // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 100. – P. 3877 – 3886.
129. Cui, Y. New advances in exopolysaccharides production of *Streptococcus thermophilus* / Y. Cui, X. Jiang, M. Hao [et al.] // *Archives of Microbiology*. – 2017. – V. 199, N. 6. – P. 799 – 809.
130. Chopin, N. A Direct Sulfation Process of a Marine Polysaccharide in Ionic Liquid / N. Chopin, C. Siquin, J. Ratiskol [et al.] // *Biomed Research International*. – 2015. – V. 2015 – P. 508 – 656.
131. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 1956. – V. 28, N. 3. – P. 350 – 356.
132. Dupont, I. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk / I. Dupont, D. Roy, G. Lapointe // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2000. – V. 24. – P. 251 – 255.
133. Dussault, H.P. An improved technique for staining red halophilic bacteria / H.P. Dussault // *Journal of bacteriology*. – 1955. – V. 70, N. 4. – P. 484 – 485.
134. Dufour, D. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance / D. Dufour, V. Leung, C. M. Lévesque // *Endodontic Topics*. – 2010. – V. 22(1). – P. 2 – 16.

135. Decho, AW. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes / AW. Decho // *Oceanography and Marine Biology - An Annual Review*. – 1990. – V.28. – 73 – 153.
136. Decho, A.W. Microbial activities and the transformation of organic matter within mucilaginous material / A.W. Decho, G.J. Herndl // *Science of the Total Environment*. – 1995. – V. 165, N. 1–3. – P. 33 – 42.
137. Decho, A.W. Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems / A.W. Decho, T. Gutierrez // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – V. 8, N. 922. – P.1 – 18.
138. De Vuyst, L. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria / L. De Vuyst, B. Degeest // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1999. – V. 23. – P. 153 – 177.
139. De Baets, S. Extracellular Tremella polysaccharide: structure, properties and applications / S. De Baets, E. Vandamme // *Biotechnology Letters*. – 2001. – V. 23. – P. 1361 – 1366.
140. Deveau, H. Effect of Exopolysaccharides on Phage-Host Interactions in *L.lactis* / H. Deveau, M. Van Calsteren, S. Moineau // *Journal Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68. – P. 4364 – 4369.
141. Donot, F. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction // F. Donot, A. Fontana, J.C. Baccou [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – V. 87. – P. 951 – 962.
142. El Essawy, A.K. Antimicrobial, anticoagulation, fibrinolytic and prebiotic activities of exopolysaccharide produced by marine *Klebsiella* spp. Egypt. / A.K. El Essawy, H.M. Abu Shady, A.M. Abu El Kher [et al.] // *Journal of Experimental Biology (Botany)*. – 2016. – V.12, N. 2. – P. 267 – 274.
143. El Bakash, O.H. Isolation, characterization and biological activities of exopolysaccharide produced by *Bacillus marinus* / O.H. El Bakash, O.H. El Sayed., A. El Kader [et al.] // *Der Pharma Chemica*. – 2015. – V.7, N. 2. – P. 200 – 208.

144. El Bakash, O. H. Evaluation of the patterns of injuries in road traffic accidents in great cairo, Egypt / O. H. El Bakash, A. E. M. M Kabbash, M. S. Gohary [et al.]// Egyptian Journal of Forensic Sciences. Applied Toxicology. – 2016. – V. 16. – P. 79 – 95.
145. Finore, I. Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production / I. Finore, P. Di Donato, V. Mastascusa [et al.] // Marine Drugs. – 2014. – V. 12, N. 5. – P. 3005 – 3024.
146. Flemming, H.C. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS) – part I: structural and ecological aspects / H.C. Flemming, J. Wingender // Water Science and Technology. – 2001. – V. 43, N. 6. – P. 1 – 8.
147. Flemming, H.C. The EPS matrix: the "house of biofilm cells"/ H. C. Flemming, T. R. Neu, D. J Wozniak // Journal of Bacteriology. – 2007. – V. 189 (22). – P. 7945 – 7947.
148. Flemming, H.C The Biofilm Matrix. / H.C Flemming, J. Wingender // Nature Reviews Microbiology. – 2010. – V. 8. – P. 623 – 633.
149. Gugliandolo, C. Role of bacteria exopolysaccharides as agents in counteracting immune disorders induced by herpes virus / C. Gugliandolo, A. Spano, T.L. Maugeri [et al.] // Microorganisms. – 2015. – V.3, N. 3. – P. 464 – 483.
150. Garcia-Ochoa, F. Xanthan gum: production, recovery and properties / F. Garcia-Ochoa // Biotechnology Advance. – 2000. – V. 18. – P. 549 – 579.
151. Callaghan, T. High rates of in vitro synthesis of 1,4-D-glucan in cell-free preparations from Phaseolus aureus / T. Callaghan, M. Benziman // Nature. – 1984. – V. 311. – P. 165 – 167.
152. Gassem, M.A. Exopolysaccharide production in different media by lactic acid bacteria // M.A. Gassem, K.A. Schmidt, J.F. Frank / Cultured Dairy Products Journal. – 1995. – V. 30. – P. 18 – 21.

153. Gandhi, H.P. Exopolymer production by *Bacillus species* / H.P. Gandhi, R.M. Ray, R.M. Patel // Carbohydrate Polymers. – 1997. – V. 34, N. 4. – P. 323 – 327.
154. Girald, M. Gelation and resistance to shearing of fermented milk: Role of exopolysaccharides / M.Girald, C.Schaffer-Lequart // International Dairy Journal. – 2007. – V.17, N. 6. – P. 666 – 673.
155. Heim, R. Improved green fluorescence / R. Heim, A. Cubitt, R.Tsien // Nature. –1995. – V. 373. – P. 663 – 664.
156. Heissenberger, A. Relationship between the intra cellular integrity and the m Morphology of the capsular Envelope in Attachedand Free-Living Marine bacteria / A. Heissenberger, G.G. Leppard, G.J. Hernd // Applied Environmental Microbiology. – 1996. – V. 62. – P. 4521 – 4528.
157. Hosono, A. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4 / A. Hosono, J. Lee, A. Ametani, [et al.] // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1997. – V. 61. – P. 312 – 316.
158. Jansson, P.E. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type V / P.E. Jansson, B. Lindberg, U. Lindquist // Carbohydrate Research. – 1985. – V. 140, N. 2. – P. 101 – 110.
159. Kanekar, N. Massive, Absorption-selected Galaxies at Intermediate Redshifts / N. Kanekar, J.X. Prochaska, L. Christensen // The Astrophysical Journal Letters. – 2018. – V. 856, N. 23. – P. 1 – 6.
160. Kleerebezem, M. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? / M. Kleerebezem, R. van Kranenburg, R. Tuinier [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 1999. – V. 76. – P. 357 – 365.
161. Kitazawa, H. Induction of IFN-gamma and IL-1alpha production in macrophages stimulates with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus*

- lactis ssp. cremoris* / H. Kitazawa // International Journal of Food Microbiology. – 1996. – V. 31. – P. 99 – 106.
162. Kimmel, S.A. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* RR / S.A. Kimmel, R.F. Roberts // International Journal of Food Microbiology. – 1998. – V. 40. – P. 87 – 92.
163. Kang, K.S. Some novel bacterial polysaccharides of recent development / K.S. Kang, G.T. Veeder, I.W. Cottrell // Progress in Industrial Microbiology. – 1983. – N. 18. – P. 231 – 253.
164. Kenne, L. Bacterial polysaccharides In: The Polysaccharides (Aspinall, GO, Ed.) / L. Kenne, B. Lindberg // New York: Academic Press. – 1983. – V. 2. – P. 287 – 363.
165. Laws, A. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria / A. Laws, Y. Gu, V. Marshall // Biotechnology Advances. – 2001. – V. 19. – P. 597 – 625.
166. Li, W. Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1 / W. Li, J. Juan, C. Xiaohong [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2014. – V. 102. – P. 351 – 359.
167. Leibovich, S.J. Promotion of wound repair in mice by application of glucan / S.J. Leibovich, D. Danon // Journal Reticuloendothelial Society. – 1980. – V. 1. – P. 1 – 11.
168. Lal, S. Production of exopolysaccharide by bifidobacteria and its viscometric analysis / S. Lal, N. A. Kanhar, P. Kumar [et al.] // International Journal of Biosciences. – 2019. – V.14, N. 5. – P. 315 – 323.
169. Li, D The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium / D. Li, J. Li, F. Zhao [et al.] // Food Chemistry. – 2016. – 197(Pt A) – P. 367 – 372.

170. Li, W. Characterization of a novel polysaccharide with anti-colon cancer activity from *Lactobacillus helveticus* MB2-1 // W. Li, W. Tang, J. Ji [et al.] // Carbohydrate Research. – 2015. – V. 411. – P. 6 – 14.
171. Lloyd, L.L Carbohydrate polymers as wound management aids / L. L. Lloyd, J.F. Kennedy, P. Methacanon [et al.] // Carbohydrate Polymer. – 1998. – V. 37. – P. 315 – 322.
172. Looijesteijn, PJ. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* By the sugar source / PJ. Looijesteijn, IC. Boels, M. Kleerebezem [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65(11). P. 5003 – 5008.
173. Mack, D. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis / D Mack, W Fischer, A Krokotsch [et al.] // Journal of Bacteriology. – 1996. – V. 178(1). – P. 175 – 183.
174. Manivasagan, P. Extracellular polysaccharides produced by marine bacteria / P. Manivasagan, S.K. Kim // Advances in Food and Nutrition Research. – 2014. – V. 72. – P.79 – 94.
175. Mistou, MY. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Grampositive bacteria. Sutcliffe IC / MY. Mistou, NM van Sorge // FEMS Microbiology Reviews. – 2016. – V. 40. – P. 464 – 79.
176. Munir, F. Production and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(f) fermentation / F. Munir, Y. Saleem, N. Munir [et al.] M. Shaheen Iqbal, S. Sattar // Life Sciences Journal Pakistan. – 2019. – V.1 (01). – P. 19 – 23.
177. Muharumadi Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by indigenous soil bacterium *Bacillus* strain CMG1403 / Muharumadi, N. Ahmed // Iranian Polymer Journal 2008. – V. 17 (5). – P. 315 – 323.

178. Moscovici, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides / M. Moscovici // *Front Microbiology*. – 2015. – V. 6. – P. 1012 – 1022.
179. Moonmangmee, S. Purification and Characterization of a Novel Polysaccharide Involved in the Pellicle Produced by a Thermotolerant *Acetobacter* Strain / S. Moonmangmee, H. Toyama, O. Adachi [et al.] // *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*. – 2002. – V. 66, N. 4. – P. 777 – 783.
180. Mosharaf, M. Metal-adapted bacteria isolated from wastewaters produce biofilms by expressing Proteinaceous Curli Fimbriae and cellulose nanofibers / M. Mosharaf, M. Tanvir, M. Haque M. Haque [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9, N. 1334. – P. 1 – 17.
181. Mazmanian, S.K. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system / S.K. Mazmanian, D.L. Kasper // *Nature Reviews Immunology*. – 2006. – V. 6. – P. 849 – 858.
182. Matsuda, M. Activities of Marine *Pseudomonas* Polysaccharides and Their Oversulfated Derivatives Antiviral / M. Matsuda, S. Shigeta, K. Okutani // *Marine Biotechnology (NY)*. – 1999. – V. 1. – P. 68 – 73.
183. Mende, S. Exopolysaccharide production by three different strains of *Streptococcus thermophilus* and its effect on physical properties of acidified milk / S. Mende, C. Mentner, S. Thomas [et al.] // *Engineering in Life Sciences*. – 2012. – V. 12, N. 4. – P. 466 – 474.
184. Meseguer, G. Gamma scintigraphic comparison of eyedrops containing pilocarpine in healthy volunteers / G. Meseguer, P. Buri, B. Plazonnet [et al.] // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 1996. – V.12 (4). – P.481 – 488.
185. Mizuno, H. Exopolysaccharides From *Streptococcus thermophilus* ST538 Modulate the Antiviral Innate Immune Response in Porcine Intestinal Epitheliocytes / H. Mizuno, K. Tomotsune, MA. Islam [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 1 – 14.

186. Nachtigall, C. Shear induced molecular changes of exopolysaccharides from lactic acid bacteria / C. Nachtigall, C. Berger, T. Kovanović D. [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – V. 97. – P. 105 – 181.
187. Nwodo, U. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects / U. Nwodo, E. Green, A. Okoh // *International journal of molecular sciences*. – 2012. – V. 13, N. 11. – P. 14002 – 14015.
188. Pachekrepapol, U. Characterization of the chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various *Streptococcus thermophilus* strains / U. Pachekrepapol, J.A. Lucey, Y. Gong [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2017. – V. 100, I. 5. – P. 3424 – 3435.
189. Paulo, E. M. Método alternativo de triagem de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos com confirmação rápida / E. M. Paulo, M. P. Vasconcelos, I. S. Oliveira // *Ciência e Tecnologia de Alimentos [online]*. – 2012. – V. 32, N. 4. – P. 710 – 714.
190. Patel, A. Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. / A. Patel, B. Prajapati // *Advances in Dairy Research*. 2013. – P. 1 – 8.
191. Pirog, T.P. Improvement of biotechnology of microbial exopolysaccharide ethapolan on ethanol / T.P. Pirog, Ju.V. Korzh // *Journal of Biotechnology*. – 2008. – V. 3, N. 3. – P. 47 – 55.
192. Poli, A. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. / A. Poli, G. Anzelmo, B. Nicolaus // *Marine Drugs*. – 2010. – V. 8, N. 6. – P. 1779 – 1802.
193. Poland, J.S. Contaminants in the Arctic and the Antarctic: a comparison of sources, impacts, and remediation options / J.S. Poland, M.J. Riddle, B.A. Zeeb // *Polar Record*. – 2003. – V. 39, N. 4. – P. 369 – 383.
194. Petry, S Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* grown in a chemically defined

- medium / S. Petry, S. Furlan, MJ Crepeau [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66. – P. 3427 – 3431.
195. Petroni, A. Isolation and Nucleotide Sequence of the GDP-Mannose: Cellobiosyl-Diphosphopolyrenol  $\alpha$ -Mannosyltransferase Gene from *Acetobacter xylinum* / A. Petroni, L. Ielpi // *Journal of Bacteriology*. – 1996. – V. 178, N. 16. – P. 4814 – 4821.
196. Priyanka, P. Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium sp.* PRIM-18 / P. Priyanka, A.B. Arun, P. Ashwini [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 126. – P. 215 – 221.
197. Rodney, M. Donlan Biofilms: Microbial Life on Surfaces / M. Rodney // *Emerging Infectious Diseases*. – 2002. – V.8, N. 9. – P. 881 – 890.
198. Ruas-Madiedo, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria / P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon // *International Dairy Journal*. – 2002. – V. 12. – P. 163 – 171.
199. Ruas-Madiedo, P. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria / P. Ruas-Madiedo, C.G. de los Reyes-Gavilán // *Journal of Dairy Science*. – 2005. – V. 88(3). – P. 843 – 856.
200. Roge, O. Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus* / O. Roge, N. Kervarec, J. Ratiskol [et al.] // *Carbohydrate Research*. – 2004. – V. 339, N. 14. – P. 2371 – 2380.
201. Roberts, C.M. Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79 / C.M. Roberts, W. Fett, F. Osman [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 1995. – V. 78. – P. 463 – 468.
202. Ricciardi, A. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications / A. Ricciardi, F. Clementi // *Italian Journal of Food Science*. – 2000. – V. 12. – P. 22 – 45.

203. Sutherland, I.W. Biosynthesis of microbial polysaccharides / I. W. Sutherland // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1982. – V. 23. – P. 79 – 150.
204. Sutherland, I.W. Microbial exopolysaccharides – structural subtleties and their consequences / I.W. Sutherland // *Pure and Applied Chemistry*. – 1997. – V. 69. – P. 1911 – 1917.
205. Sutherland, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides / I.W. Sutherland // *Trends Biotechnology*. – 1998. – V. 16. – P. 41 – 46.
206. Sanchez, J. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* / J. B. Sanchez, Martínez, R. Guillén [et al.] // *Rodríguez Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72. – P. 7495 – 7502.
207. Surber, G. Shear and extensional rheology of acid milk gel suspensions with varying ropiness / G. Surber, D. Jaros, H. Rohm // *Journal Texture Studies*. – 2020. – V. 51. – P. 111 – 119.
208. Schmid, J. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies / J. Schmid, V. Sieber, B. Rehm // *Front Microbiology*. – 2015. – N. 6. – P. 496.
209. Sikkema, J. Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria / J. Sikkema, T. Oba // *Snow Brand R&D Reports*. – 1998. – V. 107. – P. 1 – 31.
210. Shivakumar, S. Production of exopolysaccharides by *Agrobacterium sp.* CFR24 using coconut water—a byproduct of food industry / Shivakumar, S.V.N. Vijayendra // *Letters in applied microbiology*. – 2006. – V. 42, N. 5. – P. 477 – 482.
211. Senni, K. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering / K. Senni, J. Pereira, F. Gueniche [et al.] // *Marine Drugs*. – 2011. – V.9. – P. 1664 – 1681.

212. Sreekumar, O. The antimutagenic of properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines / O. Sreekumar, A. Hosono // Canadian Journal of Microbiology – 1998. – V. 44. – P. 1029 – 1036.
213. Savadogo, A. Traoré Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples / A. Savadogo, A.T. Cheik, P.W. Ouattara [et al.] // African Journal of Biotechnology. – 2004. – V. 3, N. 3. – P. 189 – 194.
214. Shady, H.M., Molecular characterization of a marine klebsiella isolate by 16s ribosomal rna gene sequence and optimization of its exopolysaccharide production / H.M. Shady, A.M. Abu El Kher [et al.] // The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany). – 2015. – V.11, N. 2. – P. 227 – 236.
215. Thapa, D. *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharide reduces mutagenic potential of genotoxins / D. Thapa, H. Zhang // International Journal of Probiotics and Prebiotics. – 2009. – V. 4(2). – P. 79 – 82.
216. Tytgat, HL The sweet tooth of bacteria: common themes in bacterial glycoconjugates / HL. Tytgat, S. Lebeer // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2014. – N. 78. – P. 372 – 417.
217. Tuinier, R. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* / R. Tuinier, WH. van Casteren, P.J. Looijesteijn [et al.] // Biopolymers. – 2001. – V. 59. – P. 160 – 166.
218. Torino, M.I. Semi-defined media for the exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 and evaluation of the components interfering with the EPS quantification / M.I. Torino, F. Sesma, G. Font de Valdez // Milchwissen. – 2000. – V. 35. – P. 314 – 316.
219. Varma, NR. Display of the viral epitopes on *Lactococcus lactis*: a model for food grade vaccine against EV71 / NR. Varma, H. Toosa, HL. Foo [et al.] // Biotechnology Research International. – 2013. – N. 11. – P. 4032 – 4036.

220. Vandamme, E.J. The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals / E.J. Vandamme // *Journal of Biotechnology*. – 1994. – V. 37. – P. 89 – 108.
221. Van Geel-Schutten, G. H. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides / G. H. van Geel-Schutten, F. Flesch, B. ten Brink [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 1998. – V. 50. – P. 697 – 703.
222. Vaningelgem, F. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics / F. Vaningelgem, M. Zamfir, F. Mozzi [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – V. 70(2). – P. 900 – 912.
223. Welman, A.D. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* / A.D. Welman, I. S. Maddox, R. H. Archer // *Journal of Applied Microbiology*. – 2003. – V. 95. – P. 1200 – 1206.
224. Wu, S. Antibiofilm and anti-Infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa* / S. Wu, G. Liu, W. Jin, P. Xiu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*, 2016. – V. 7. – P. 126.
225. Xu, Y. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry / Y. Xu, Y. Cui, F. Yue, L. Liu [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – V. 94. – P. 475 – 499.
226. Yuksekdag, Z.N. Influence of Different Carbon Sources on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22) / Z.N. Yuksekdag, B. Aslim // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2008. – V. 51, N. 3. – P. 581 – 585.

227. Zannini, E. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides / E. Zannini, DM. Waters, A, Coffey [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 100(3). – 1121 – 1135.
228. Zeidan, A. A., Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications / A. A. Zeidan, P. V. Kuzina, T. Janzen [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2017. – V. 41, (Supp\_1). – P. 168 – 200.
229. Zhang, X. Q. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers / X.Q. Zhang, P.L. Bishop, M.J. Kupferle // *Water Science and Technology*. – 1998. – V. 37. – P. 345 – 348.
230. Zhang, Z. Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection / Z. Zhang, N. M. Khan, K.M. Nunez [et al.] // *Analytical chemistry*. – 2012. – V. 84, N. 9. – P. 4104 – 4110.