

MAGDALENA OLEKSY, ELŻBIETA KLEWICKA

## SELEKCJA BAKTERII Z RODZAJU *LACTOBACILLUS* WYDAJNYCH W SYNTEZIE EGZOPOLISACHARYDÓW

### Streszczenie

Egzopolisacharydy (EPS) bakterii z rodzaju *Lactobacillus* charakteryzują się korzystnymi właściwościami prozdrowotnymi, dzięki którym mogą być stosowane jako funkcjonalne składniki żywności. Ich wykorzystanie na skalę przemysłową jest jednak utrudnione ze względu na wysoki koszt oraz niską wydajność produkcji. Odpowiedni dobór szczepów wydajnych w syntezie EPS może znacznie zwiększyć szansę ich wykorzystania w technologii żywności. Celem pracy była selekcja szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zdolnych do wydajnej syntezy egzopolisacharydów zarówno w formie śluzu, jak i otoczek polisacharydowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz makro- i mikroskopowych spośród 58 szczepów wytypowano trzy szczepy z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* (ŁOCK 0943, ŁOCK 0935 oraz OM-1) o najkorzystniejszych cechach wpływających na właściwości reologiczne podłoża hodowlanego. W pracy wykazano, że szczepy te mogą stanowić wydajne narzędzie w produkcji bakteryjnych egzopolisacharydów. Badane bakterie syntetyzują EPS w ilości 68 ÷ 137 mg/l w zależności od rodzaju źródła węgla. Zatem skład podłoża hodowlanego jest jednym z czynników determinujących wydajność syntezy EPS przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*.

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus* sp., selekcja, egzopolisacharydy (EPS), otoczki polisacharydowe (CPS), śluz (SPS)

### Wprowadzenie

W ciągu ostatnich lat wśród naukowców wzrosło zainteresowanie egzopolisacharydami (EPS) bakteryjnymi ze względu na ich wszechstronne właściwości fizykochemiczne oraz biologiczne. Egzopolisacharydy są to wielkocząsteczkowe, długołańcuchowe biopolimery, składające się z powtarzających się jednostek sacharydowych połączonych wiązaniami  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozydowymi. Syntetyzowane egzopolisacharydy mogą być fizycznie związane z komórką bakteryjną, tworząc otoczkę polisacharydową

---

*Mgr inż. M. Oleksy, dr hab. inż. E. Klewicka, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wyzd. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Łódź, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź. Kontakt: magdalena.oleksy@dokt.p.lodz.pl*

(CPS – *capsular polysaccharides*) lub mogą być luźno wydzielane do środowiska, tworząc śluz (SPS – *slime polysaccharides*) [7, 8]. Egzopolisacharydy wykorzystywane są jako substancje zagęszczające, stabilizujące i wiążące, dzięki ich nienewtonowskim właściwościom [5].

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* nie należą do wysokowydajnych producentów egzopolisacharydów, jednak mają ogromny potencjał ze względu na to, że są uznawane za bezpieczne dla zdrowia i życia człowieka (GRAS – *generally recognized as a safe*). Jak dotąd zidentyfikowano ok. 30 gatunków bakterii z rodzaju *Lactobacillus* produkujących EPS, jednak do najlepiej poznanych należą: *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* i *Lb. johnsonii* [1, 21]. EPS bakterii *Lactobacillus* sp. odgrywają kluczową rolę w technologii wytwarzania fermentowanych produktów spożywczych, w szczególności fermentowanych produktów mlecznych. Wpływają na poprawę właściwości reologicznych oraz na smak produktów końcowych, takich jak sery czy jogurty. Mimo że EPS nie mają własnego smaku, to jednak zwiększają wrażenia smakowe odczuwane przez konsumentów. Dowiedziono, że oprócz właściwości technologicznych, EPS bakterii z rodzaju *Lactobacillus* charakteryzują się również właściwościami prozdrowotnymi, m.in. immunomodulującymi, przeciwnowotworowymi, prebiotycznymi, obniżającymi stężenie cholesterolu we krwi, obniżającymi ciśnienie krwi i przeciwwrzodowymi [1, 12, 17]. Zdolność danych szczepów *Lactobacillus* sp. do syntezy EPS wpływa także na wzmocnienie ich właściwości probiotycznych [14].

Mimo że egzopolisacharydy bakterii *Lactobacillus* sp. mają wiele korzystnych właściwości technologicznych oraz prozdrowotnych, wykorzystywanych m.in. w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz kosmetycznym, to ich produkcja nadal jest ograniczona [19]. Niska wydajność produkcji, wysoki koszt pozyskiwania oraz metod analizy strukturalnej EPS stanowią motywację do ciągłego poszukiwania szczepów wydajnych w syntezie EPS. Liczne badania wskazują na to, że wydajność syntezy egzopolisacharydów bakteryjnych w znacznym stopniu zależy od warunków prowadzonego procesu oraz składu podłoża hodowlanego. Zatem kolejnym krokiem w badaniach nad EPS jest optymalizacja warunków hodowli w celu uzyskania wydajnej syntezy z uwzględnieniem parametrów ekonomiczno-technicznych [12, 15].

Celem pracy była selekcja szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, spośród 58 kultur zdolnych do wydajnej syntezy egzopolisacharydów, przy użyciu metod makroskopowych (wzrost w pożywce płynnej i stałej) oraz analizy mikroskopowej.

## Material i metody badań

### Material biologiczny

Material biologiczny stanowiło 58 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* przedstawionych w tab. 1. Szczepy do badań hodowano w podłożu płynnym oraz na podłożu stałym MRS (DeMan, Rogosa, & Sharpe, Merck, Niemcy) przez 48 h w temp. 37 lub 30 °C w warunkach anaerobowych.

Tabela 1. Szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* stosowane do badań dotyczących syntezy egzopolisacharydów

Table 1. Strains of *Lactobacillus* sp. used to study synthesis of exopolysaccharides

L.p. No.	Gatunek Genus	Nr / No.	L.p. No.	Gatunek Genus	Nr / No.
1.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0939	30	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0904
2.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0928	31	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0920
3.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0942	32	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0912
4.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0842	33	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0902
5.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0938	34	<i>Lb. rhamnosus</i>	ŁOCK 0908
6.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0934	35	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0907
7.	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0848	36	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0924
8.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0933	37	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0911
9.	<i>Lb. rhamnosus</i>	ŁOCK 0943	38	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0903
10.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0931	39	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0910
11.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0930	40	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0909
12.	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0905	41	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0922
13.	<i>Lb. rhamnosus</i>	ŁOCK 0935	42	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0913
14.	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0914	43	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 1020
15.	<i>Lb. casei</i>	NCDO 206	44	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0919
16.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0927	45	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0906
17.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0936	46	<i>Lb. brevis</i>	ŁOCK 0944
18.	<i>Lb. delbrueckii</i>	ŁOCK 0854	47	<i>Lb. pentosus</i>	ŁOCK 0979
19.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0937	48	<i>Lb. brevis</i>	ŁOCK 0980
20.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0929	49	<i>Lb. plantarum</i>	ŁOCK 0981
21.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0941	50	<i>Lb. plantarum</i>	ŁOCK 0982
22.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0840	51	<i>Lb. brevis</i>	ŁOCK 0983
23.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0932	52	<i>Lb. brevis</i>	ŁOCK 0984
24.	<i>Lb. rhamnosus</i>	OM-1 [13]	53	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0985
25.	<i>Lb. acidophilus</i>	ŁOCK 0926	54	<i>Lb. delbrueckii</i>	ŁOCK 0987
26.	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0921	55	<i>Lb. mucosae</i>	ŁOCK 0988
27.	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0917	56	<i>Lb. plantarum</i>	ŁOCK 0989
28.	<i>Lb. paracasei</i>	ŁOCK 0918	57	<i>Lb. plantarum</i>	ŁOCK 0990
29.	<i>Lb. casei</i>	ŁOCK 0901	58	<i>Lb. pentosus</i>	ŁOCK 0991

Objaśnienia / Explanatory notes:

ŁOCK – Kolekcja Czystych Kultur Przemysłowych ŁOCK 105 (Łódź, Polska) / Collection of Pure Industrial Culture (Łódź, Poland); NCDO – National Collection of Dairy Organisms (Great Britain)

*Produkcja EPS w formie śluzu (SPS)*

Zdolność badanych bakterii do syntezy EPS w formie śluzu poddawano ocenie makroskopowej. W tym celu wykonywano hodowle bakteryjne na podłożu stałym oraz płynnym MRS (de Man, Rogosa, Sharpe, Merc, Niemcy). Hodowle inkubowano przez 48 h w temp. 37 °C w warunkach tlenowych. Po inkubacji poddawano ocenie makroskopowej zdolność bakterii do tworzenia gładkich kolonii o powierzchni śluzowatej i błyszczącej na podłożu stałym oraz zdolność do tworzenia śluzu w podłożu płynnym. Lepkość hodowli ustalano w teście „nitki” poprzez dotknięcie hodowli sterylną eżą.

*Produkcja EPS w formie otoczek (CPS)*

Otoczki polisacharydowe badanych bakterii obserwowano pod mikroskopem świetlnym po zabarwieniu komórek bakteryjnych barwnikiem zasadowym oraz tła barwnikiem kwasowym (barwienie negatywno-pozytywne). W tym celu zastosowano barwienie Manevala [9]. Za pomocą sterylnej eży nanoszono na szkiełko podstawowe kroplę czerwieni Kongo. Następnie mieszano z nią kolonię bakteryjną z hodowli na podłożu stałym lub kroplę płynnej hodowli bakteryjnej w bulionie MRS. Preparat wysuszano w powietrzu i następnie zanurzano rozmaz w roztworze Manevala. Po 5 min barwnik delikatnie wypłukiwano wodą destylowaną. Otrzymany preparat po wysuszeniu na powietrzu oglądano pod obiektywem imersyjnym ( $\times 100$ ).

*Analiza wydajności syntezy EPS*

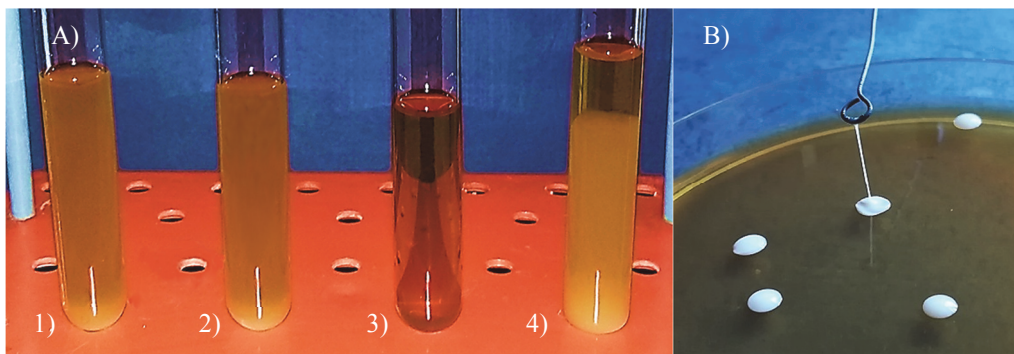
Płynne podłoże MRS zaszczipiano inoculum (10 % v/v). Po 48 h inkubacji próbki podgrzewano w łaźni wodnej (temp. 100 °C, 15 min) w celu inaktywacji enzymów. Następnie komórki bakteryjne oraz skoagulowane białka odwirowywano (15 min, 14 534  $\times$  g, 4 °C), po czym do supernatantu dodawano dwie objętości 96-procentowego etanolu w celu wytrącenia EPS. Próbkę inkubowano przez 24 h w temp. 4 °C. Osad egzopolisacharydów zbierano przez odwirowanie próbek (20 min, 11 772,54  $\times$  g, temp. 4 °C) i rozpuszczano w wodzie destylowanej.

Zawartość egzopolisacharydów w próbce oznaczano zmodyfikowaną metodą kolorymetryczną Dubois z użyciem glukozy jako wzorca [3]. 1 ml próbki badanej mieszano z 0,5 ml 5-procentowego wodnego roztworu fenolu (5g/100 ml wody destylowanej). Następnie dodawano 2,5 ml 95-procentowego kwasu siarkowego(VI). Próbkę inkubowano w temp. 20  $\pm$  2 °C przez 10 min, po czym każdą próbę mieszano przez 30 s. Wymieszane próbki poddawano inkubacji przez 20 min w łaźni wodnej o temp. 25 °C. Po tym czasie dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali  $\lambda = 490$  nm. Próbę kontrolną stanowiła woda destylowana (1 ml). Wszystkie analizy wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną z 3 powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym.

W celu określenia czy różnice pomiędzy wynikami badań są statystycznie istotne wykonano test istotności różnic ANOVA ( $p = 0,05$ ) za pomocą programu Origin Pro 2017.

### Wyniki i dyskusja

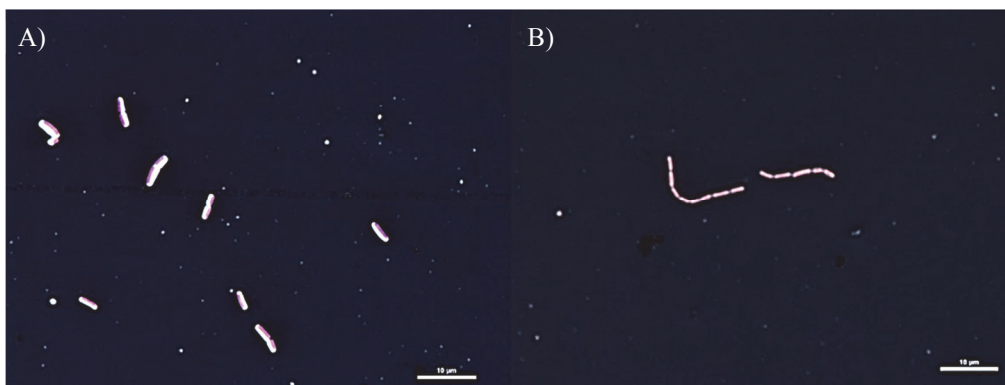
W pierwszym etapie badań wykazano, że fenotyp 60 % badanych szczepów można opisać jako śluzowaciejący. Te właściwości fenotypowe mogą być związane ze zdolnością badanych szczepów do syntezy EPS [6]. Ocena makroskopowa hodowli bakteryjnych jest jedną z najprostszych metod wykorzystywanych w selekcji bakterii syntetyzujących EPS. Jest to jednak metoda mało czuła, ponieważ nie jest możliwe zidentyfikowanie za jej pomocą szczepów, które produkują niewielkie ilości tych biopolimerów [18]. Obserwacji poddano produkcję EPS do podłoża w postaci gęstej, lepkiej zawiesiny (fot. 1A: 1, 2, 4). Przy takich hodowlach napotymano znaczną trudność w dokładnym wymieszaniu prób. Największą lepkością charakteryzowały się hodowle trzech szczepów: *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0935 oraz *Lb. rhamnosus* OM-1. Z kolei na podstawie badań makroskopowych stwierdzono, że aż 16 szczepów nie wykazywało zdolności do syntezy EPS w formie śluzu lub produkowało je w bardzo niewielkiej ilości (fot. 1A: 3). Należały do nich szczepy: *Lb. acidophilus* ŁOCK 0933, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0931, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0930, *Lb. casei* ŁOCK 0905, *Lb. casei* NCDO 206, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0937, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0941, *Lb. casei* ŁOCK 0902, *Lb. casei* ŁOCK 0907, *Lb. paracasei* ŁOCK 0924, *Lb. paracasei* ŁOCK 0922, *Lb. paracasei* ŁOCK 0913, *Lb. casei* ŁOCK 1020, *Lb. pentosus* ŁOCK 0979, *Lb. brevis* ŁOCK 0980, *Lb. plantarum* ŁOCK 0989.



Fot. 1. Wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* A) w podłożu płynnym: 1) *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943, 2) *Lb. paracasei* ŁOCK 0914, 3) *Lb. paracasei* ŁOCK 0924, 4) *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0935; B) na podłożu stałym – makroskopowy wygląd śluzowaciejącego szczepu *Lb. rhamnosus* OM-1  
 Photo 1. *Lactobacillus* sp. A) growing in liquid medium: 1) *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943, 2) *Lb. paracasei* ŁOCK 0914, 3) *Lb. paracasei* ŁOCK 0924, 4) *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0935; B) on agar medium: macroscopic image of strand formed by the cellular mass of EPS-producing *Lb. rhamnosus* OM-1 strain

Kolejny etap badań selekcyjnych obejmował ocenę makroskopową kolonii bakteryjnych na podłożu stałym MRS. Spośród 58 badanych szczepów jedynie 7 – *Lb. acidophilus* ŁOCK 0942, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0934, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0935, *Lb. paracasei* ŁOCK 0914, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0936, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943, *Lb. rhamnosus* OM-1 – tworzyło na podłożu agarowym gładkie kolonie o powierzchni śluzowatej i błyszczącej, które po dotknięciu sterylną eżą tworzyły charakterystyczną lepką nić (fot. 1B).

Kolejny etap badań stanowiła ocena zdolności badanych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do syntezy egzopolisacharydów w formie otoczek (CPS). Otoczki polisacharydowe obserwowano pod mikroskopem po wybarwieniu preparatów mikroskopowych metodą Manevala. Jest to barwienie negatywno-pozytywne, podczas którego komórki bakteryjne wybarwiają się na różowo, a otoczki polisacharydowe pozostają przezroczyste (białe) na granatowym tle (fot. 2). Otoczek polisacharydowych nie zaobserwowano u 12 szczepów spośród 58 badanych. Były to szczepy: *Lb. acidophilus* ŁOCK 0933, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0931, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0927, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0929, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0941, *Lb. paracasei* ŁOCK 0912, *Lb. paracasei* ŁOCK 0922, *Lb. casei* ŁOCK 1020, *Lb. casei* ŁOCK 0906, *Lb. plantarum* ŁOCK 0981, *Lb. paracasei* ŁOCK 0985, *Lb. plantarum* ŁOCK 0991. Z kolei najlepszymi producentami CPS okazały się szczepy: *Lb. acidophilus* ŁOCK 0942, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0935, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0936 oraz *Lb. rhamnosus* OM-1.



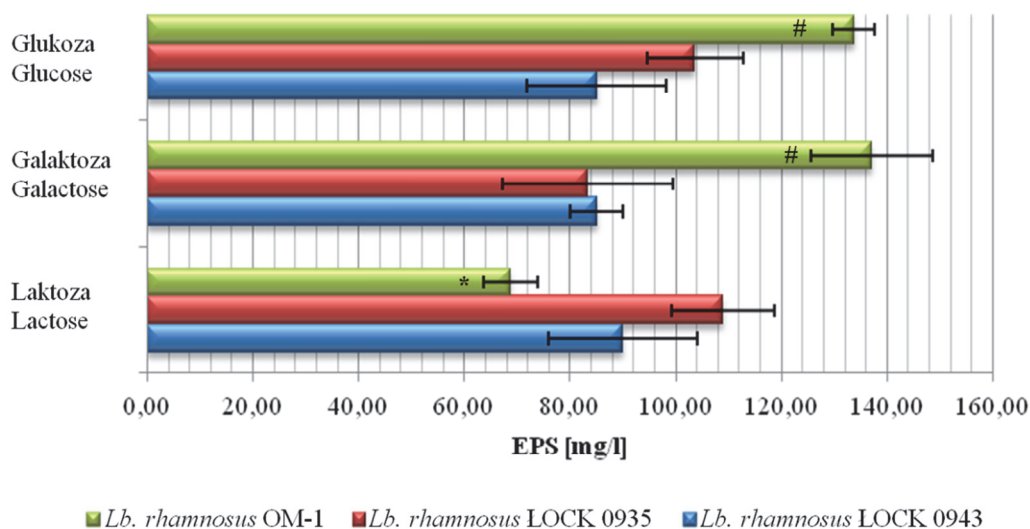
Fot. 2. A) Mikroskopowy obraz otoczek polisacharydowych *Lb. acidophilus* ŁOCK 0937; B) mikroskopowy obraz komórek bakteryjnych *Lb. paracasei* ŁOCK 0922 nieprodukcujących otoczek polisacharydowych (komórka bakteryjna jest wybarwiona na różowo, tło na ciemny granat, otoczka pozostaje przezroczysta)

Photo 2. A) Photomicrograph of the polysaccharide capsules of *Lb. acidophilus* ŁOCK 0937; B) Photomicrograph of *Lb. paracasei* ŁOCK 0922 strain which is not capable of producing CPS (bacterial cell is pink stained; background is dark grenade; CPS remains transparent)

W ostatnim etapie badań skринingowych porównano zdolność badanych szczepów bakterii *Lactobacillus* sp. do syntezy egzopolisacharydów zarówno w formie CPS, jak i SPS. Wykazano, że wśród badanych szczepów jedynie 5 nie wykazywało zdolności do syntezy EPS. Były to szczepy: *Lb. acidophilus* ŁOCK 0933, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0931, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0941, *Lb. paracasei* ŁOCK 0922, oraz *Lb. casei* ŁOCK 1020. Wykazano, że zdolność do syntezy egzopolisacharydów w formie CPS nie determinuje zdolności do produkcji SPS i na odwrót. M.in. w hodowli szczepów: *Lb. acidophilus* ŁOCK 0930, *Lb. casei* ŁOCK 0905, *Lb. casei* ŁOCK 0905, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0937, *Lb. casei* ŁOCK 0902, *Lb. casei* ŁOCK 0907, *Lb. paracasei* ŁOCK 0924, *Lb. paracasei* ŁOCK 0913, *Lb. pentosus* ŁOCK 0979, *Lb. brevis* ŁOCK 0980, *Lb. plantarum* ŁOCK 0989 nie zaobserwowano syntezy SPS, natomiast w preparatach mikroskopowych zaobserwowano zdolność do syntezy otoczek polisacharydowych. Z kolei szczepy: *Lb. acidophilus* ŁOCK 0927, *Lb. acidophilus* ŁOCK 0929, *Lb. paracasei* ŁOCK 0912, *Lb. casei* ŁOCK 0906, *Lb. plantarum* ŁOCK 0981, *Lb. paracasei* ŁOCK 0985, *Lb. plantarum* ŁOCK 0991 charakteryzowały się zdolnością do syntezy egzopolisacharydów jedynie w formie CPS.

Na podstawie przeprowadzonych badań selekcyjnych wytypowano 3 szczepy do dalszych badań nad EPS, które charakteryzowały się najkorzystniejszymi cechami wpływającymi na właściwości reologiczne podłoża hodowlanego: *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943, ŁOCK 0935 oraz OM-1. W przeprowadzonej ocenie makroskopowej dowiedziono, że szczepy te charakteryzowały się najwyższą wydajnością w syntezie egzopolisacharydów (SPS oraz CPS) wśród 58 badanych szczepów. Zatem zdolność do syntezy EPS jest cechą indywidualną szczepu. Jak podają Badel i wsp. [1], *Lb. rhamnosus* typuje się jako najwydajniejszego producenta wśród *Lactobacillus* sp. Macedo i wsp. [11] dowiedli, że szczep *Lb. rhamnosus* 9595 wykazuje zdolność do syntezy EPS w ilości nawet 2,7 g/l podłoża hodowlanego, na podłożu z białkiem serwatkowym. Aby potwierdzić zdolność badanych bakterii do wydajnej syntezy egzopolisacharydów oznaczono ilość EPS w podłożu hodowlanym. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* należą do bakterii fermentacji mlekowej, które jako jedne z niewielu mają zdolność fermentacji laktozy. Z tego względu do dalszych badań wykorzystano podłoża z dodatkiem laktozy oraz jej monomerów: glukozy oraz galaktozy w ilości 20 g/l. Po ekstrakcji badanych polimerów z podłoża za pomocą 96-procentowego etanolu ich ilość mierzono metodą Dubois, przy użyciu glukozy jako wzorca. Wykazano, że *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943 syntetyzował ok.  $85 \div 95$  mg/l EPS, zarówno w podłożu z dodatkiem laktozy, glukozy, jak i galaktozy (rys. 1). Z kolei w przypadku *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0935 zaobserwowano większą wydajność syntezy EPS w podłożu z glukozą i laktozą ( $103 \div 109$  mg/l) niż w próbie z galaktozą (83 mg/l). Nie stwierdzono jednak różnic statystycznie istotnych pomiędzy wynikami otrzymanymi w przypadku szczepów *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943 oraz *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0935. Odn-

towano je jedynie pomiędzy wynikami efektywności syntezy EPS przez *Lb. rhamnosus* OM-1 (rys. 1). Najniższą wydajność syntezy EPS przez ten szczep odnotowano w hodowli z dodatkiem laktozy (69 mg/l). Z kolei w hodowli z sacharydami: glukozą lub galaktozą zaobserwowano wydajność na poziomie ok. 135 mg/l.



Objaśnienia: Explanatory notes:

\*, # – różnice statystycznie istotne między średnimi wartościami wyprodukowanych egzopolisacharydów przez te same szczepy *Lb. rhamnosus*, hodowane na różnych źródłach węgla ( $p \leq 0,05$ ) / the statistically significant differences between mean values of amounts of exopolysaccharides produced by the same *Lb. rhamnosus* strains but cultured on different carbon source.

Rys. 1. Wpływ źródła węgla na produkcję egzopolisacharydów przez *Lb. rhamnosus* LOCK 0935, LOCK 0934 oraz OM-1

Fig. 1. Effect of carbon source on production of exopolysaccharides by *Lb. rhamnosus* LOCK 0935, LOCK 0934 and OM-1

Wyniki własne są zbliżone do wyników, które otrzymali Landersjö i wsp. [10]. *Lb. rhamnosus* GG rosnący w mleku, badany przez ten zespół, wytwarzał jedynie 80 g/l EPS. Z kolei Polak-Berecka i wsp. [16] uzyskali nieznacznie wyższe wyniki wydajności EPS. Badany przez nich szczep *Lb. rhamnosus* E/N syntetyzował EPS w podłożu z glukozą w ilości 185 mg/l, z laktozą – 153 mg/l, a w podłożu z galaktozą – 165 mg/l. Z kolei Dupont i wsp. [4] osiągnęli wydajność 10-krotnie większą – 1000 mg/l EPS wytworzonych przez *Lb. rhamnosus* 9595 M na podłożu BMM (Basal Minimal Medium).

Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnie można wskazać, że wydajność syntezy EPS w znacznej mierze zależy od składu podłoża hodowlanego. Do takich



wniosków doszli również van den Berg i wsp. [20] oraz Deepak i wsp. [2], którzy badali wpływ warunków hodowli na syntezę egzopolisacharydów przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* (*Lb. sake* 0-1 oraz *Lb. acidophilus*). Kolejnym etapem badań będzie optymalizacja warunków hodowli bakterii *Lb. rhamnosus* ŁOCK 0943, ŁOCK 0935 oraz OM-1 w celu zwiększenia wydajności syntezy egzopolisacharydów.

### Wnioski

1. Ocena makroskopowa hodowli szczepów bakteryjnych stanowi prostą, tanią i efektywną metodę wstępnej selekcji bakterii wydajnie syntetyzujących egzopolisacharydy.
2. Zdolność do syntezy egzopolisacharydów w formie otoczek (CPS) nie determinuje zdolności do produkcji EPS w formie śluzu (SPS) i na odwrót.
3. Na podstawie przeprowadzonych badań selekcyjnych wytypowano 3 szczepy *Lb. rhamnosus* (ŁOCK 0943, ŁOCK 0935 oraz OM-1) charakteryzujące się najwyższą wydajnością syntezy egzopolisacharydów (SPS oraz CPS), zatem zdolność do syntezy EPS jest cechą indywidualną szczepu.
4. Wydajność syntezy egzopolisacharydów badanych szczepów *Lb. rhamnosus* zależy od źródła węgla w podłożu hodowlanym.

### Literatura

- [1] Badel S., Bernardi T., Michaud P.: New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.*, 2011, 29, 54-66.
- [2] Deepak V., Ram Kumar Pandian S., Sivasubramaniam S. D., Nellaiah H., Sundar K.: Optimization of anticancer exopolysaccharide production from probiotic *Lactobacillus acidophilus* by response surface methodology. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2016, 46 (3), 288-297.
- [3] DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A.T., Smith F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1956, 28, 350-356.
- [4] Dupont I., Roy D., Lapointe G.: Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 24, 251-255.
- [5] Freitas F., Alves V.D., Reis M.M.A.: Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.*, 2011, 29 (8), 388-396.
- [6] Gomez J.: Characterization of exopolysaccharides produced by shalofilos microorganism belonging to the genera *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, and *Palleronia salipiger*. PhD dissertation, University of Granada, Granada 2006.
- [7] Górska S., Grycko P., Rybka J., Gamian A.: Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego – biosynteza i struktura. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2007, 61, 805-818.
- [8] Kšonžeková P., Bystrický P., Vlčková S., Pätoprstý V., Pulzová L., Mudroňová D., Kubašková T., Csank T., Tkáčiková L.: Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response. *Carbohydr. Polym.*, 2016, 141, 10-19.
- [9] Kuzhiyil A., Lee Y., Shim A., Xiong A.: Osmotic stress induces kanamycin resistance in *Escherichia coli* B23 through increased capsule formation. *J. Exp. Microbiol. Immunol.*, 2012, 16, 5-10.
- [10] Landersjö C., Yang Z., Huttunen E., Widmalm G.: Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules*, 2002, 3, 880-884.

- [11] Macedo M.G., Lacroix C., Gardner N.J., Champagne C.P.: Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595 M in whey permeate. *Int. Dairy J.*, 2002, 12, 419-26.
- [12] Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I.: Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, 13, 14002-14015.
- [13] Oleksy M., Klewicka E. *Lactobacillus rhamnosus* strain OM-1, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession number KY576903. GenBank National Center for Biotechnology Information database, 2016.
- [14] Oleksy M., Klewicka E.: Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. – biosynthesis and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2016, DOI: 10.1080/10408398.2016.1187112.
- [15] Patel A., Prajapati J.B.: Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Adv. Dairy Res.*, 2013, 1, 1-7.
- [16] Polak-Berecka M., Waško A., Kubik-Komar A.: Optimization of culture conditions for exopolysaccharide production by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Pol. J. Microbiol.*, 2014, 63 (2), 253-257.
- [17] Polak-Berecka M., Waško A., Szwajgier D., Choma A.: Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. *Pol. J. Microbiol.*, 2013, 62 (2), 181-189.
- [18] Smitinont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M., Cescutti P.: Exopolysaccharide – producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: Isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, 51, 105-111.
- [19] Trabelsi I., Slima B.S., Chaabane H., Riadh S.B.: Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, 74, 541-546.
- [20] Van der Berg D.J.C., Smits A., Pot B., Ledebouer A.M., Kersters K., Verbakel J.M.A., Verrips C.T.: Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnol.*, 1993, 7, 189-205.
- [21] Widayastuti Y., Rohmatussolihat, Febrisiantosa A.: The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *J. Food Nutr. Sci.*, 2014, 5, 425-434.

#### SCREENING OF EFFICIENT EXOPOLYSACCHARIDE-PRODUCING STRAINS OF *LACTOBACILLUS* SP.

##### Summary

Exopolysaccharides (EPS) produced by bacteria of the *Lactobacillus* genus are characterized by beneficial health-promoting properties owing to which EPS can be used as functional food ingredients. However, their utilization on an industrial scale is made difficult by high costs of their production and low productivity. A way to increase the prospect of utilizing EPS in food technology is to properly select strains that are efficient in the synthesis thereof. The objective of the research study was to select *Lactobacillus* strains capable of efficiently synthesizing EPS both in the form of slime and capsular polysaccharides. Based on the macro- and microscopic analyses, three *Lactobacillus rhamnosus* strains (LOCK 0943, LOCK 0935, and OM-1) were selected from among 58 lactobacilli strains; they had the most beneficial properties to impact the rheology of the culture medium. The study showed that those strains could be an effective tool in the production of bacterial exopolysaccharides. The tested bacteria synthesized 68 to 137 mg/L of EPS depending on the type of carbon source. Thus, the composition of the culture medium is one of the factors to determine the efficiency of EPS synthesis by *Lactobacillus* bacteria.

**Key words:** *Lactobacillus* sp., screening, exopolysaccharides (EPS), capsular polysaccharides (CPS), slime (SPS) 