

Exopolysacharidy produkované baktériami mliečneho kysnutia

SOŇA JAMRICHOVÁ

SÚHRN. Baktérie mliečneho kysnutia sa vyznačujú rozmanitými funkčnými vlastnosťami, ktoré sa podieľajú na tvorbe optimálnych kvalitatívnych vlastností fermentovaných mliečnych výrobkov a riadení technologických procesov. Jednou z nich je produkcia exopolysacharidov. Článok sumarizuje súčasné dáta o klasifikácii, chemickom zložení a štruktúre exopolysacharidov, metodológii izolácie a kvantifikácie, produkcii exopolysacharidov niektorými baktériami mliečneho kysnutia a funkčnými a technologickými vlastnosťami exopolysacharidov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: baktérie mliečneho kysnutia; exopolysacharidy; štruktúra; izolácia; produkcia

Kvalitu fermentovaných mliečnych výrobkov, vrátane jogurtov, determinujú mnohé technologické faktory. Medzi najdôležitejšie technologické faktory patria mikroorganizmy tvoriace štartovacie kultúry. Pri výrobe fermentovaných mliečnych výrobkov sa väčšinou aplikujú mezofilné a termofilné baktérie mliečneho kysnutia, ako sú napr. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* a *Lactobacillus casei*. Najdôležitejšie kritériá výberu štartovacích kultúr sú acidifikácia, aróma, chuť, stabilita a textúra. V súčasnosti sa zvyšuje záujem o baktérie produkujúce exopolysacharidy (EPS). Baktérie mliečneho kysnutia syntetizujú mnohé exopolysacharidy rôzneho zloženia, veľkosti a štruktúry vykazujúce zaujímavé funkčné a technologické vlastnosti, ktoré sa môžu využiť pri optimalizácii technologických procesov a vývoji nových potravín so zlepšenými reologickými vlastnosťami. Napriek tomu, že produkcia exopolysacharidov je nízka, často nestabilná a metódy izolácie sú veľmi zložité, vedecké poznatky o mikrobiologických, biochemických a technologických aspektoch heteropolysacharidov baktérií mliečneho kysnutia sú publikované. Cieľom prehľadu je poskytnúť informácie najmä o klasifikácii,

chemickom zložení a štruktúre exopolysacharidov, ich produkcii niektorými druhmi baktérií, metodológii izolácie a kvantifikácie, fermentačných podmienkach, reologických vlastnostiach a nových prístupoch pri skúmaní exopolysacharidov.

1. Klasifikácia, chemické zloženie a štruktúra exopolysacharidov

Baktérie syntetizujú množstvo polysacharidov, ktoré sú definované podľa ich lokalizácie k bunke. Niektoré sú intracelulárne umiestnené v cytosole a využívajú sa ako zdroj energie, iné sú súčasťou stien bunky. Tretia skupina je lokalizovaná na vonkajšej strane bunkových stien a môže vytvárať polysacharidy asociované na povrchu bunky vo forme kapsúl, alebo ich extracelulárne vylučovať vo forme slizu do prostredia mimo bunky. Rozlíšenie týchto dvoch foriem je veľmi zložité. Označenie exopolysacharidy sa používa pre všetky formy bakteriálnych polysacharidov, ktoré sa nachádzajú mimo bakteriálnej bunky [1, 2]. Exopolysacharidy baktérií mliečneho kysnutia môžu byť zložené z jedného druhu sacharidového monoméru (homopolysacharidy) alebo z niekoľkých typov monomérov (heteropolysacharidy). Známym príkladom homopolysacharidov sú dextransy produkované *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Heteropolysacharidy produkujú mezofilné (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei* a iné) a termofilné (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus*) baktérie mliečneho kysnutia [3].

Skúmanie chemického zloženia exopolysacharidov produkovaných baktériami mliečneho kysnutia vyústilo do ustálenia názoru, že exopolysacharidy sú polysacharidy zložené z lineárnych alebo rozvetvených opakujúcich sa jednotiek, obsahujúcich α - a β -väzby [2]. Vzhľadom na možné väzby a konfigurácie existujú exopolysacharidy s rôznou štruktúrou a vlastnosťami. Napriek tomu, že baktérie mliečneho kysnutia vylučujú množstvo rozmanitých typov exopolysacharidov, ich monomérové zloženie je veľmi podobné; takmer vždy sú prítomné D-galaktóza, D-glukóza a L-ramnóza, ale v rôznych pomeroch [2-13]. Okrem týchto monosacharidov sa zistili aj iné rezídua, N-acetyl-glukózoamín, fosfáty, glycerolové a acetylové skupiny. Diferencie v zložení exopolysacharidov vysvetľujú DE VUYST a DEGEEST [3] zložitou izoláciou a purifikáciou, najmä ak sa na fermentáciu použijú zložené médiá, ako aj tým, že jeden kmeň môže vylučovať viac ako jeden polysacharid. Relatívna molekulová hmotnosť exopolysacharidov je jedným

z faktorov, ktorý determinuje ich funkčné vlastnosti a je v rozsahu od $4,0 \cdot 10^4$ do $6,0 \cdot 10^6$ [2, 3, 7, 9, 14, 15].

2. Metodológia izolácie, purifikácie a kvantifikácie exopolysacharidov

Izolácia a následná purifikácia exopolysacharidov je základným predpokladom skúmania exopolysacharidov baktérií mliečného kysnutia. Metóda izolácie a kvantifikácie exopolysacharidov je veľmi zložitá. Exopolysacharidy sa vždy nachádzajú v prostredí mikroorganizmov a rezíduí fermentačného média. Izolácia exopolysacharidov je problematická nielen z koagulovaného mliečného systému, kde sa nachádzajú sacharidy, proteíny alebo peptidy, ale aj zo zložených syntetických médií s prídavkom kvasničného extraktu, kde sú exopolysacharidy vždy kontaminované frakciami s vysokou molekulovou hmotnosťou. Metódy izolácie a kvantifikácie exopolysacharidov sú založené na precipitácii etanolom alebo acetónom a analýze sacharidov [2, 9, 13, 14, 16-25]. Väčšina autorov aplikovala na odstránenie kontaminujúcich proteínov a peptidov metódu popísanú GARCIA-GARIBAY a MARSHALL [26], ktorá je založená na ich precipitácii kyselinou trichlóroctovou a následnej centrifugácii. GANCEL a NOVEL [27] odporúčali zahriať fermentačné médium po ukončení fermentácie vo vriacom vodnom kúpeli, následne enzýmovo hydrolyzovať reziduálne proteíny pronázou a až potom pridať kyselinu trichlóroctovú. Centrifugáciou získali číry supernatant s rozpustnými exopolysacharidmi. Túto metódu ďalej zdokonalili KIMMEL a kol. [19], ktorí získaný supernatant dialyzovali 48 hodín v dialyzačných vreckách (vylučovací limit 6 000 až 8 000) oproti destilovanej vode. LEVANDER a kol. [20] popísali metódu purifikácie exopolysacharidov aplikáciou ultrafiltrácie. Purifikácia sa úspešne dosahuje aj chromatografickými metódami. Polysacharidy sa z číreho supernatantu precipitujú etanolom alebo acetónom, purifikujú opakovaným premývaním a precipitáciou alebo dialýzou. Purifikované exopolysacharidy sa môžu ďalej sušiť alebo lyofilizovať. Množstvo vyprodukovaného exopolysacharidu (výťažnosť) sa vyjadruje ako množstvo polyméru v sušine na liter fermentačného média. Kvantifikácia exopolysacharidov je väčšinou založená na nepriamych metódach stanovenia monosacharidov buď kolorimetrickými technikami, výsledkom ktorých je množstvo exopolysacharidov vyjadrené ako ekvivalent glukózy, prípadne dextranu [28], alebo meraním viskozity. Meranie viskozity tekutých fermentačných médií nie je bezpodmienečne spojené s množstvom vyprodukovaného množstva exopolysacharidov [16].

3. Produkcia exopolysacharidov

Biosyntéza exopolysacharidov baktériami mliečného kysnutia nie je ešte celkom objasnená, ale väčšina výskumníkov sa domnieva, že mechanizmus je podobný ako u produkcie exopolysacharidov Gram-negatívnymi baktériami (patogénne baktérie ako sú *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Haemophilus influenzae*), pretože obidva systémy vyžadujú polymerizáciu opakujúcich sa sacharidových jednotiek. Heteropolysacharidy u Gram-negatívnych baktérií vznikajú v cytoplazmatickej membráne z intracelulárnych prekursorov za účasti niekoľkých enzýmov [7]. Podľa BOELS a kol. [29] je jedným z najlepšie preskúmaných kmeňov baktérií mliečného kysnutia kmeň *Lactococcus lactis* NIZO B40 produkujúci polymér s pravidelne sa opakujúcimi jednotkami $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 2)][\alpha\text{-D-Galp-1-PO}_4\text{-3}]\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$, ktorých os tvoria dva prekursor, UDP-glukóza a UDP-galaktóza [30].

Typ a množstvo polyméru vylučovaného baktériami mliečného kysnutia v rôznych fázach rastu závisí od rastových podmienok (teplota, zdroj energie, pomer C : N, pH, a iné). Publikované správy o produkcii exopolysacharidov individuálnymi baktériami mliečného kysnutia sú výsledkom použitia rôznych rastových médií, bakteriálnych kmeňov a metód izolácie a purifikácie [3, 6, 8-10, 16-17, 31-44]. CERNING a kol. [9] zistili, že ak kmene produkujúce sliz *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* rastú v mlieku alebo v ultrafiltráte, produkujú polysacharidy v množstve 30 mg.l⁻¹ až 600 mg.l⁻¹. Toto množstvo bolo o 50–60 % vyššie, ak kmene rástli pri teplote 25 °C namiesto 30 °C; obohatenie mlieka alebo ultrafiltrátu glukózou alebo sacharózou rovnako výrazne zlepšilo produkciu exopolysacharidov. DEGEEST a DE VUYST [10] fermentovali kmeň *Streptococcus thermophilus* v obohatenom mlieku a publikovali prvý model rastu a kinetiky produkcie exopolysacharidov baktériami mliečného kysnutia, predovšetkým *Streptococcus thermophilus*. Pri optimálnych podmienkach fermentácie dosiahli produkciu exopolysacharidov 550 mg.l⁻¹. DE VUYST a kol. [16] skúmali viaceré média na produkciu exopolysacharidov (MRS, M17, čiastočne definované médium obohatené hydrolyzátom laktalbumínu a mliečne médium obohatené peptónom a kvasničným extraktom). Skúmané štyri kmene *Streptococcus thermophilus* produkovali exopolysacharidy len v mliečnych médiách. FRENGOVA a kol. [45] selektovala z kefírových zŕn *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* HP1. Tento kmeň vykazoval vysokú produkciu exopolysacharidov (472,6 mg.l⁻¹), pri fermentácii s ďalšími baktériami mliečného kysnutia (*Streptococcus thermophilus* T15, *Lactococcus lactis* C15, *Lactobacillus helveticus* MP12

a *Saccharomyces cerevisiae* A13) dokonca 824,3 mg.l⁻¹. GROBBEN a kol. [34] skúmali produkciu exopolysacharidov pri fermentácii kmeňa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 v chemicky definovanom médiu s vynechaním niektorých esenciálnych zložiek, pričom zistili menší rast mikroorganizmov, ale vyššiu produkciu exopolysacharidov. HUGENHOLTZ a kol. [35] popísal metabolickú dráhu odbúrania laktózy a produkciu exopolysacharidov u *Lactococcus lactis* a identifikoval enzýmy, ktoré sú zodpovedné za produkciu exopolysacharidov. KIMMEL a kol. [19] optimalizoval podmienky fermentácie kmeňa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR v čiastočne definovanom médiu so zdrojom dusíka vo forme enzýmového kazeínového hydrolyzátu (Bacto-casitone, Difco), pričom v médiu s množstvom 30 g.l⁻¹ Bacto-casitone pri teplote 38 °C a pH 5,0 sa dosiahla produkcia exopolysacharidov v množstve 354 mg.l⁻¹.

4. Funkčné vlastnosti exopolysacharidov

Heteropolysacharidy mezofilných a termofilných baktérií mliečného kysnutia disponujú rozmanitými funkčnými vlastnosťami. Štrukturálna analýza spojená s reologickými štúdiami ukázala, že mnohé exopolysacharidy majú vhodné technologické vlastnosti pre výrobu fermentovaných mliečnych výrobkov, zvyšujú viskozitu, väzbou vody eliminujú riziko synerézie a zlepšujú textúru [2, 3, 23, 46-55]. Autori uvádzajú, že je zložité hľadať koreláciu medzi reológiou mliečnej kultúry a množstvom vyprodukovaného exopolysacharidu. Je možné predpokladať, že exopolysacharidy sa podieľajú na zvýšení viskozity, ale stupeň zvýšenia viskozity sa líši, pretože existujú rozdiely vo vlastnostiach kultúr, v podmienkach inkubácie, v sušine mliečného média a v metóde merania viskozity. Viskozita je ovplyvňovaná nielen množstvom exopolysacharidov, ale aj ďalšími charakteristikami, ako sú napríklad štruktúra, monosacharidové zloženie a molekulová hmotnosť, ktoré spôsobujú odlišné reologické charakteristiky médií. Okrem toho pôsobia aj interakcie medzi exopolysacharidmi a mliečnymi proteínmi a interakcie exopolysacharidov a baktérií. CERNING a kol. [9] zistili výrazné odlišnosti v správaní baktérií mliečného kysnutia produkujúcich exopolysacharidy. Zatiaľ čo u *Streptococcus cremoris* T5 bola produkcia exopolysacharidov vysoká (600 mg.l⁻¹) a zodpovedajúca viskozita bola extrémne nízka (20 mPa.s⁻¹), množstvo exopolysacharidov produkované *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MLS 96 bolo 220 mg.l⁻¹ a viskozita bola vysoká (800 mPa.s⁻¹). HASSAN a kol. [46-51] skúmali mikroštruktúru a reológiu jogurtu vyrobeného s kultúrami produkujúcimi exopolysacharidy prevažne vo forme kapsúl. Kapsule produkované

baktériami mliečného kysnutia sa pozorovali konfokálnym snímacím laserovým mikroskopom priamo v mlieku. Niektoré kmene *Streptococcus thermophilus* boli obklopené kapsulami o priemere 4–5 μm , niektoré dosahovali priemer len 2 μm . Kmeň *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* vytváral kapsule o veľkosti od 1,5 μm do 3 μm . Veľkosť kapsúl bola väčšia, ak baktérie rástli v mlieku. Bakteriálne kapsule pravdepodobne spôsobujú slabé miesta v gélovej štruktúre mliečného systému, ktoré vedú ku vzniku výrobku s nízkou hodnotou šmykového napätia. Hoci obidva typy polysacharidov (kapsuly včlenené do zreteľnej štruktúry a extracelulárne slizy) ovplyvňujú reologické vlastnosti jogurtu, každý vytvára odlišný efekt. Slizovité polysacharidy na rozdiel od kapsulárnych vytvárajú elasticnú štruktúru, ale obidva polysacharidy zvyšujú viskozitu jogurtu. MARSHALL a RAWSON [23] porovnávali reologické a senzorické vlastnosti jogurtu vyrobeného s kultúrami produkujúcimi sliz a kultúrami, ktoré túto charakteristiku nevykazovali. Autori zistili, že typ kmeňa produkujúceho exopolysacharidy a interakcie polyméru s mliečnymi proteínmi a bakteriálnymi bunkami v priebehu fermentácie významne ovplyvňujú reologické vlastnosti jogurtu, množstvo vyprodukovaného exopolysacharidu tieto vlastnosti neovplyvňuje. Rovnako ako MOREIRA a kol. [53] skúmali synergický efekt zmesných kultúr baktérií mliečného kysnutia na technologické vlastnosti fermentovaného mlieka.

Exopolysacharidy produkované baktériami mliečného kysnutia môžu podľa niektorých autorov [7, 18, 29, 56, 57] priaznivo pôsobiť na zdravie tých ľudí, ktorí konzumujú fermentované mliečne výrobky. Modelové štúdie s myšami preukázali, že exopolysacharidy môžu stimulovať imunitný systém, vykazovať protinádorovú aktivitu a ovplyvňovať cholesterolovú aktivitu. ODA a kol. [57] informovali, že *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti* produkuje exopolysacharidy s protinádorovými účinkami. Protinádorová aktivita exopolysacharidov sa testovala voči sarkómu-180 brušnej vodnatieľky. Myšiam sa intraperitoneálne podávala injekcia preparátu exopolysacharidov počas deviatich dní (dávka 20 mg.kg^{-1}). Život myší sa u tejto skupiny predĺžil o 144 %. Život myší predĺžený o viac ako 233 % zodpovedal dávke preparátu exopolysacharidov 40 mg.kg^{-1} alebo 80 mg.kg^{-1} .

Na objasnenie protinádorovej aktivity sa skúmal vplyv exopolysacharidov alebo buniek produkujúcich exopolysacharidy na imunitný systém. Exopolysacharidy produkované kmeňom *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M sa in vitro testovali na bunkách sleziny myší kmeňov C57B1/6 a BALB/c, na makrofágoch podobnej bunkovej línie (myši RAW264.7) a na mononukleároch ľudskej periférnej krvi od 14 zdravých darcov. Získané výsledky poukazujú na možnosť posilnenia imunitného systému prostredníctvom exopolysacharidov produkovaných baktériami mliečného kysnutia [18].

KITAZAWA a kol. [56] testovali in vivo a in vitro vplyv *Lactococcus* subsp. *cremoris* KVS20 na funkciu makrofágov. Pri injekčnom podaní *Lactococcus* subsp. *cremoris* KVS20 v množstve 10 mg.kg⁻¹ až 50 mg.kg⁻¹ intraperitoneálne sa prítomnosť Fcγ-receptoru zistila u 21 % až 34 % peritoneálnych makrofágov. Peritoneálny makrofág bol vystavovaný cytotoxickej aktivite buniek sarkómu-180.

Fyziologickú úlohu exopolysacharidov sumárne opísali BROADBENT a kol. [7]. Uvádzajú, že exopolysacharidy plnia rôzne funkcie, chránia organizmus voči toxickým látkam, ich význam spočíva aj v zachytávaní esenciálnych kationov, kolonizácii a priľnutí mikroorganizmov. Výborne viažu vodu, môžu chrániť baktérie v prostredí s nízkou vlhkosťou a kapsulárne exopolysacharidy môžu inhibovať fagocytózu. Virulentné bakteriofágy sú v mliekarenskom priemysle najvýznamnejšou príčinou neúspešnej fermentácie. Exopolysacharidy chránia bunky pred škodlivými účinkami vonkajšieho prostredia a enkapsulované exopolysacharidy sa ukazujú byť ochranou baktérií pred fágovou infekciou [58]. Veľký význam majú adhezívne vlastnosti exopolysacharidov, pretože majú kľúčovú úlohu pri tvorbe biofilmu. Tvorba bakteriálneho biofilmu počas výrobných operácií môže spôsobiť vážne problémy [59].

Záver

Prezentované poznatky sú potvrdením zvýšeného záujmu o skúmanie exopolysacharidov baktérií mliečného kysnutia, biochémie, biosyntézy a funkčné vlastnosti. Skúmanie štruktúry exopolysacharidov a ich funkcie v mliečnych výrobkoch môže prispieť k rozšíreniu aplikácie kultúr baktérií mliečného kysnutia produkujúcich exopolysacharidy a inovácii mliečnych výrobkov.

Táto práca bola podporovaná podprogramom výskumu a vývoja „Potraviny - kvalita a bezpečnosť“ č. 2003SP270280E01.

Literatúra

1. SUTHERLAND, I. W.: Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 8, 1972, s. 143-213.
2. CERNING, J.: Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75, 1995, s. 463-472.

3. DE VUYST, L. - DEGEEST, B.: Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews, 23, 1999, s. 153-177.
4. ALMIRÓN-ROIG, E.- MULHOLLAND, F.- GASSON, M. J.- GRIFFIN, A. M.: The complete *cps* gene cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide. Microbiology, 146, 2000, s. 2793-2802.
5. BOUZAR, F. - CERNING, J. - DESMAZEAUD, M.: Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yoghurt production. Journal of Dairy Science, 80, 1997, s. 2310-2317.
6. BRICZINSKI, E. - ROBERTS, R. F.: Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. Journal of Dairy Science, 85, 2002, s. 3189-3197.
7. BROADBENT, J. R. - MC MAHON, J. - WELKER, D. L. - OBERG, C. J. - MOINEAU, S.: Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. Journal of Dairy Science, 86, 2003, s. 407-423.
8. CERNING, J. - RENARD, C. M. G. C. - THIBAUT, J. F. - BOUILLANNE, C. - LANDON, M. - DESMAZEAUD, M. - TOPISIROVIC, L.: Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Applied and Environmental Microbiology, 60, 1994, s. 3914-3919.
9. CERNING, J. - BOUILLANNE, CH. - LANDON, M.: Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science, 72, 1992, s. 692-699.
10. DEGEEST, B.- DE VUYST, L.: Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1999, s. 2863-2870.
11. RICARDI, A. - CLEMENTI, F.: Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications. Italian Journal of Food Science, 12, 2000, s. 23-45.
12. UEMURA, J. - ITOH, T. - KANEKO, T. - NODA, K.: Chemical characterization of exocellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Milchwissenschaft, 53, 1998, s. 443-446.
13. YANG, Z. - HUTTUNEN, E. - STAAF, M. - WIDMALM, G.- TENHU, H.: Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. International Dairy Journal, 9, 1999, s. 631-638.
14. VAN DEN BERG, D. J. C. - ROBIJN, G. W. - JANSSEN, A. C. - GIUSEPPIN, M. L. F. - VREEKER, R. - KAMERLING, J. - Vliegenthart, J. F. G.-- LEDEBOER, A. M. - VERRIPS, C. T.: Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1995, s. 2840-2844.
15. NAKAJIMA, H. - TOYODA, S. - TOBA, T. - ITOH, T. - MUKAI, T. - KITAZAWA H. - ADACHI, S.: A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. Journal of Dairy Science, 73, 1990, s. 1472-1477.
16. DE VUYST, L. - VANDERVEKEN, S. - VAN DE VEN, S. - DEGEEST, B.: Production by and isolation of exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. Journal of Applied Microbiology, 84, 1998, s. 1059-1068.
17. GANCEL, F. - NOVEL, G.: Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. Journal of Dairy Science, 77, 1994, s. 685-688.
18. CHABOT, S. - YU, H. L. - DE LESELEUC, L. - CLOUTIER, D. - VAN CALSTEREN, M. R.

- LESSARD, M. - ROY, D. - LACROIX, M. - OTH, D.: Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Lait*, 81, 2001, s. 683-697.
19. KIMMEL, S. A. - ROBERTS, R. F.- ZIEGLER, G. R.: Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1998, s. 659-664.
20. LEVANDER, F. - SVENSSON, M. - RADSTRÖM, P.: Small-scale analysis of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a semi-defined medium. *Biomedcentral Microbiology*, 1, 2001. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/23>.
21. LEVANDER, F. - SVENSSON, M. - RADSTRÖM, P.: Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2002, s. 784-790.
22. MACUARA, D. - TOWNSLEY, M.: Scandinavian ropy milk - identification and characterization of endogenous ropy lactic *Streptococci* and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science*, 67, 1984, s. 735-744.
23. MARSHALL, V. M. - RAWSON, H. L.: Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 34, 1999, s. 137-143.
24. PARY, S. - FURLAN, S. - CREPEAU, M. J. - CERNING, J. - DESMAZEAUD, M.: Factor affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2000, s. 3427-3431.
25. PHAM, L. - DUPONT, I. - ROY, D. - LAPOINTE, G. - CERNING, J.: Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2000, s. 2302-2310.
26. GARCIA-GARIBA, Y. M. - MARSHALL, V. M. E.: Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 1991, s. 325-328.
27. GANCEL, F. - NOVEL, G.: Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. *Journal of Dairy Science*, 77, 1994, s. 689-695.
28. DUBOIS, M. - GILLES, K. A. - HAMILTON, J. K. - ROBERTS, A. - SMITH, F.: Colorimetric determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 1956, s. 350-356.
29. BOELS, I. C. - RAMOS, A. - KLEEREBEZEM, M. - DE VOS, W. M.: Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2001, s. 3033-3040.
30. VAN KRANENBURG, G. R. - VAN SWAM, I. I. - MARUGG, J. D. - KLEEREBEZEM, M. - DE VOS, V. M.: Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *Journal of Bacteriology*, 181, 1999, s. 338-340.
31. DEGEEST, B. - DE VUYST, L.: Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucosyltransferase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2000, s. 3519-3527.
32. DEVEAU, H. - MOINEAU, S.: Technical note: Use of RFLP to characterize *Lactococcus lactis* strains producing exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86, 2003, s. 1472-1475.
33. FABER, E. J. - ZOON, P. - KAMERLING, J. - Vliegenthart, J. F. G.: The exopolysacchari-

- des produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. Carbohydrate Research, 310, 1998, s. 269-276.
34. GROBBEN, G. J. - CHIN-JOE, I. - KITZEN, V. A. - BOELS, I. C. - BOER, F. - SIKKEMA, J. - SMITH, M. R.: Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Applied and Environmental Microbiology, 64, 1998, s. 1333-1337.
 35. HUGENHOLTZ, J. - LOOIJESTEIJN, E. - STARRENBURG, M. - DIJKEMA, C.: Analysis of sugar metabolism in a EPS producing *Lactococcus lactis* by 31P NMR. Journal of Biotechnology, 77, 2000, s. 17-23.
 36. CHERVAUX, CH. - EHRLICH, S. D. - MAGUIN, E.: Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in novel chemically defined medium. Applied and Environmental Microbiology, 66, 2000, s. 5306-5311.
 37. KNOSHAUG, E. - AHLGREN, J. A. - TREMPY, J. E.: Growth associated exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* Ropy352. Journal of Dairy Science, 83, 2000, s. 633-640.
 38. LOOIJESTEIJN, J. - BOELS, I. C. - KLEEREBEZEM, M. - HUGENHOLTZ, J.: Regulation of exopolysaccharide by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1999, s. 5003-5008.
 39. MALAKAR, K. - MARTENS, D. E. - VAN BREUKELEN, W. - BOOM, R. M. - ZWIAERIN, G. M. H. - VAN'T RIA, K.: Modeling the interactions of *Lactobacillus curvatus* colonies in solid medium: consequences for food quality and safety. Applied and Environmental Microbiology, 68, 2002, s. 3432-3441.
 40. MOLLERACH, M. - LÓPEZ, R. - GARCÍA, E.: Characterization of the *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. Journal of Experimental Medicine, 188, 1998, s. 2047-2056.
 41. 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. International of Food Microbiology, 51, 1999, s. 105-111.
 42. STINGELE, F. - NEESER, J. R. - MOLLA, B.: Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. Journal of Bacteriology, 178, 1996, s. 1680-1690.
 43. RAMOS, A. - BOELS, I. C. - DE VOS, W. M. - SANTOS, H.: Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 67, 2001, s. 33-41.
 44. CIESLEWICZ, M. J. - KASPER, D. L. - WANG, Y. - WESSELS, M. R.: Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of *Streptococci*. Journal of Biological Chemistry, 276, 2001, s. 39-146.
 45. FRENGOVA, G. I. - SIMOVA, E. - BESHKOVA, D. M.: Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. Zeitschrift für Naturforschung, 57c, 2002, s. 805-810.
 46. HASSAN, A. N. - FRANK, J. F. - FARMER, M. A. - SCHMIDT, K. A. - SHALABI, S. I.: Observation of encapsulated lactic acid bacteria using confocal scanning laser microscopy. Journal of Dairy Science, 78, 1995, s. 2624-2628.
 47. HASSAN, A. N. - FRANK, J. F. - SCHMIDT, K. A. - SHALABI, S. I.: Rheological properties of yoghurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. Journal of Dairy Science, 79, 1996, s. 2091-2097.
 48. HASSAN, A. N. - FRANK, J. F. - SCHMIDT, K. A. - SHALABI, S. I.: Textural properties

- of yoghurt made with encapsuled nonropy lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 79, 1996, s. 2098-2103.
49. HASSAN, A. N. - CORREDIG, M. - FRANK, J. F.: Capsule formation by nonropy starter cultures affects the viscoelastic properties of yoghurt during structure formation. *Journal of Dairy Science*, 85, 2002, s. 716-720.
 50. HASSAN, A. N. - FRANK, J. F. - QVIST, K. B.: Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*, 85, 2002, s. 1705-1708.
 51. HASSAN, A. N. - IPSEN, R. - JANZEN T. - QVIST, K. B.: Microstructure and rheology of yoghurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86, 2003, s. 1632-1638.
 52. LUCEY, J. A.: Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85, 2002, s. 281-294.
 53. MOREIRA, M. - ABRAHAM, A. - DE ANTONI, G.: Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *Journal of Dairy Science*, 83, 2000, s. 395-400.
 54. SODINI, I. - LUCAS, A. - OLIVEIRA, M. N. - REMEUF, F. - CORRIEU, G.: Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. *Journal of Dairy Science*, 85, 2002, s. 2479-2488.
 55. VAN MARLE, M. E. - VAN DEN ENDE, D. - DE KRUIF, C. G. - MELLEMA, J.: Steady-shear viscosity of stirred yoghurts with varying ropiness. *Journal of Rheology*, 43, 1999, s. 1643-1662.
 56. KITAZAWA, H. - NOMURA, M. - ITOH, T.: Functional alternation of macrophages by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, 74, 1991, s. 2082-2088.
 57. ODA, M. - HASEGAWA, H. - KOMATSU, S. - KAMBE, M. - TSUCHIYA, F.: Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 1983, s. 1623-1625.
 58. DEVEAU, H. - VAN CALSTEREN, M. R. - MOINEAU, S.: Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2002, s. 4364-4369.
 59. MITTELMAN, M. W.: Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81, 1998, s. 2760-2764.

Do redakcie došlo 19.11.2004.

Exopolysaccharides from lactic acid bacteria

JAMRICHOVÁ, S.: *Bull. potrav. Výsk.*, 43, 2004, p. 127-137.

SUMMARY. Lactic acid bacteria possess various functional characteristics which participate on the formation of optimal qualitative characteristics of fermented milk products and on the control of technology. One such characteristic is the production of polysaccharides. This review summarizes recent data on classification, chemical composition and the structure of exopolysaccharides, the methodology of isolation and quantification, exopolysaccharides production with some lactic acid bacteria and functional as well as technological properties of exopolysaccharides.

KEYWORDS: lactic acid bacteria; exopolysaccharides; structure; isolation; production