

УДК 579.579.66

Синтез и физико-химические свойства экзополисахаридов, продуцируемых молочнокислыми бактериями *Leuconostoc mesenteroides*, культивируемыми на среде с лактозой и сахарозой

© 2019 Н.Б. ГРАДОВА^{1,*}, М.Г. СЕМЁНОВА², А.А. ХОХЛАЧЁВА¹, А.С. АНТИПОВА², Е.Д. МУРЗИНА¹

¹Химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва 125480

²ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Российская академия наук, Москва 119334

*e-mail: gradova_nb@mail.ru

Поступила в редакцию 11.09.2018 г.

После доработки 01.11.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Исследована динамика роста и синтеза экзополисахаридов бактериями *Leuconostoc mesenteroides*, культивируемыми на молочной сыворотке с добавлением сахарозы. Показано, что экзополисахариды продуцируются в процессе роста культуры. Подтверждено, что добавление сахарозы повышает продуктивность синтеза экзополисахаридов и не влияет на их состав. При использовании динамического и статистического методов измерения светорассеяния показано, что добавление сахарозы к среде культивирования влияет на физико-химические свойства экзополисахаридов, изменяя их структурные и термодинамические параметры в водной среде, что влияет на их функциональную активность и определяет направление наиболее эффективного использования.

Ключевые слова: кефирные грибки, молочнокислые бактерии, физико-химические свойства экзополисахаридов.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-82-88

Научные исследования по разработке технологий получения микробных ЭПС (биоразлагаемые, альтернативные синтетическим нетоксичные материалы) и поиск практического применения ЭПС в разных сферах народного хозяйства является актуальной задачей и инновационным направлением развития биотехнологии¹.

Разнообразие физико-химических структур ЭПС определяет широкий спектр сфер возможного их применения: медицина, фармацевтическая, пищевая, текстильная, химическая, нефте- и горнодобывающая промышленности, при культи-

вировании культур тканей животных и др. в качестве загустителей, текстурирующих агентов и веществ, суспендирующих, желирующих, эмульгирующих, изменяющих реологические свойства водных систем [1–8].

Научный и практический интерес представляют экзополисахариды (кефиран), продуцируемые ассоциативной культурой молочнокислых организмов, кефирными грибами (КГ), которые столетиями используются человеком для получения пищевых продуктов. Кефиран является глюкогалактаном и состоит из примерно равных остатков

¹Постановление Правительства Российской Федерации от 15.04.2014 г., № 301 “Об утверждении государственной программы РФ «Развитие науки и технологий» на 2013–2020 годы”.

Список сокращений: ДМСО – диметилсульфоксид; КГ – кефирные грибки; питательная среда MRS – по прописи deMan-Rogosa-Sharpe; ЭПС – экзополисахариды.

глюкозы и галактозы. В работах многих авторов показана высокая биологическая активность полисахарида кефирана, его антимикробное, противовоспалительное, иммуномодулирующее, противоастматическое действие [4, 5, 8], что определяет его перспективное использование в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Отмечена также возможность использования кефирана в качестве матриц в технологии культивирования культуры тканей животных, а также основы для получения пленкообразующих материалов [9–12].

В литературе в качестве практических способов получения экзополисахаридов (кефиран) рассматривается способ выделения их из массы кефирных грибков и выделения кефирана как продуцируемого экзополисахарида при культивировании молочнокислых бактерий на лактозе или молочной сыворотке [13–15]. При этом второй способ является более технологичным, определяет большую продуктивность процесса и стабильное качество продукта.

Однако промышленный способ получения кефирана до настоящего времени не реализован, и объясняется это низкой продуктивностью разработанных процессов.

При скрининге молочнокислых бактерий, компонентов ассоциативной культуры КГ, по признаку активности синтеза экзополисахаридов были отобраны культуры *Leuconostoc mesenteroides* и *L. lactis*, синтезирующие на среде с лактозой до 0,3 г/л ЭПС [13].

При культивировании данных культур на средах с лактозой и с добавлением сахарозы синтез ЭПС повышался до 4,97 и 2,30 г/л, соответственно, что подтвердило отмеченное ранее в литературе возможное влияние сахарозы на повышение продуктивности синтеза ЭПС лактобактериями [14].

При использовании спектральных методов анализа был показан аналогичный состав полисахаридов, продуцируемых кефирными грибками и культурами молочнокислых бактерий, культивируемых на средах с лактозой и при добавлении сахарозы [13].

Однако функциональная активность и возможность практического использования полисахаридов определяется не только их первичной структурой, последовательностью моносахаридных звеньев, но и другими физическими характеристиками, в частности их молекулярной массой, конформацией и термодинамическим средством к растворителю.

Цель настоящей работы – изучение динамики синтеза экзополисахаридов бактериями *Leuconostoc mesenteroides* на среде с добавлением сахарозы и сравнение их физико-химических свойств и экзополисахаридов, продуцируемых кефирными грибками.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

В качестве объектов исследования использовали экзополисахариды, выделенные из кефирных грибков (КГ), применяемых при производстве кефира на Ставропольском молочном заводе, и продуцируемых молочнокислыми бактериями *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-11942, при их культивировании на среде, содержащей лактозу и сахарозу [13].

Методы

Кефирные грибки культивировали в колбах с объемом среды 50–100 мл в микроаэрофильных условиях на молоке Parmalat 0,5%-ной жирности. Полисахариды из биомассы кефирных грибков выделяли осаждением их этиловым спиртом после нагревания грибков в кипящей воде.

Молочнокислые бактерии *Leuconostoc mesenteroides* культивировали в ферментере Minifors (Infors НТ, Швейцария) общим объемом 5 л, полезный объем 2,5 л при периодическом и отъемно-доливном режиме в микроаэрофильных условиях (80 об/мин мешалки), при температуре 30 °С на среде MRS, и молочной сыворотке с добавлением сахарозы. Экзополисахариды выделяли из культуральной жидкости многократным переосаждением этиловым спиртом [15]. Концентрацию ЭПС определяли фенол-серноокислотным методом. Образцы лиофильно высушивали в аппарате Scanvac CooSlafe 100-9 Pro (Швеция). УФ-спектральный анализ образцов ЭПС проводили на спектрофотометре фирмы Shimadzu UV-2600 (Япония).

Физико-химические свойства образцов ЭПС определяли методом динамического и статистического светорассеяния (прибор многоугольного лазерного светорассеяния ЛС-01, «ЗАО Научные приборы», Россия).

С помощью статического многоугольного лазерного светорассеяния для образцов ЭПС в их обезпыленных водных растворах (ионная сила 0.001M NaCl в отсутствие/присутствии 50%-ного ДМСО) были определены следующие показатели: среднемассовая молярная масса ($M_w = \sum_i w_i M_i$,

где w_i – массовая доля i -й фракции полимера, M_i – молярная масса i -й фракции полимера [16]), радиус инерции ($R_G^2 = 1/N \sum_i r_i^2$, где r_i – расстояние от всех мономерных единиц полимерной молекулы/полимерного ассоциата до центра масс молекулы/ассоциата; N – число мономерных единиц в полимерной молекуле/ассоциате [17, 18]) и второй вириальный коэффициент A_2 [16].

Отношение Релея ($R_\theta = (I_\theta/I_0)r^2$, где I_θ и I_0 – интенсивность света, рассеянного под углом θ , и падающего света, соответственно; r^2 – расстояние от центра рассеивающего объема до детектора) для каждой концентрации ЭПС, которое было измерено с использованием вертикально поляризованного гелий-неонового лазера (633 нм) света («Плазма», Россия) при различных 13 углах светорассеяния (θ – от 40° до 140°) с использованием прибора лазерного многоугольного светорассеяния ЛС-01, откалиброванного по обеспыленному бензолу ($R_{\theta=90} = 11,84 \cdot 10^{-6} \text{ см}^{-1}$) [18]. Для приготовления концентрационной серии растворов ЭПС использовали соответствующий растворитель, обеспыленный через мембранный фильтр Millipore (США) с порами размером 0,22 мкм; были измерены как минимум 5–8 точек по концентрации ЭПС. Далее исследуемые растворы ЭПС обеспыливали с помощью мембран Millipore (США) с порами размером 0,8 мкм. При этом определение концентрации ЭПС в исследуемых растворах до и после фильтрования с помощью известных инкрементов показателя преломления ($v_{\text{эпс}}$) выявило, что потери вещества не превышали 5%.

Инкременты показателя преломления ЭПС были определены на дифференциальном рефрактометре Shimadzu (Япония) при длине волны $\lambda = 633$ нм против соответствующих растворителей в качестве растворов сравнения. Образцы

ЭПС, выделенные из кефирных грибков (образец № 1) и из культуральной жидкости *L. mesenteroides*, культивируемой на среде с сахарозой (образец № 2), в водной среде без ДМСО имели одинаковый инкремент показателя преломления: $v_{\text{эпс}} = 0,15 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3/\text{кг}$, а в водной среде с 50% ДМСО (образец № 3) показатель преломления был ниже $v_{\text{эпс}} = 0,11 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3/\text{кг}$ (табл. 1).

Все измерения интенсивности светорассеяния проводили в термостатируемой ячейке при $25 \pm 0,5$ °С.

Измеренные величины R_θ были использованы для графического построения зависимости $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ от угла рассеяния (θ) и от концентрации (C), согласно методу Берри [18]:

$$\left(\frac{HC}{\Delta R_\theta}\right)^{1/2} = \left(\frac{1}{M_w}\right)^{1/2} \cdot \left[1 + \frac{1}{6}(R_G q)^2\right] + A_2 M_w^{1/2} C, \quad (1)$$

где C – концентрация ЭПС (г/мл); ΔR_θ – избыточное рассеяние света раствором ЭПС, по отношению к светорассеянию чистым растворителем при угле измерения θ ; q – волновой вектор рассеяния, $q = (4\pi/\lambda_0) \sin(\theta/2)$; H – оптическая константа для вертикально поляризованного света, $H = 4\pi^2 n^2 v^2 / N_A \lambda_0^4$, где N_A – число Авогадро, λ_0 – длина волны падающего света в вакууме, n – показатель преломления растворителя, v – инкремент показателя преломления ЭПС.

Значения среднемассовой молярной массы (M_w) были определены как средние величины, найденные в точках пересечения с осью ординат концентрационных зависимостей $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ при $\theta \rightarrow 0$ (экстраполяция проведена по 13 углам) и угловых зависимостей $(HC/\Delta R_\theta)^{1/2}$ при $C \rightarrow 0$ (экстраполяция проведена по 5–8 концентрациям) для каждой изученной системы. Значения радиуса инерции (R_G) определялись

Таблица 1

Структурные и термодинамические характеристики экзополисахаридов, синтезированных культурой *Leuconostoc mesenteroides* и кефирными грибами

Structural and thermodynamic characteristics of the exopolysaccharides, both synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* culture and kefir corns

Образец	ЭПС, выделенные из среды	$M_w \cdot 10^{-6}$, Да	$A_2 \cdot 10^5$, см ³ ·моль ⁻¹ ·г ⁻²	R_G , нм	R_h , нм	$\rho = R_G/R_h$	$d \cdot 10^3$, г·см ⁻³
№ 1	Кефирный грибок	9,6	1,0	172	94	1,83	0,75
№ 2	КЖ <i>L. mesenteroides</i> (водная среда без ДМСО)	8,9	1,3	66	40	1,65	12,12
№ 3	КЖ <i>L. mesenteroides</i> (водная среда с 50% ДМСО)	2,3	2,0	82	98	0,84	1,66

Примечание: обозначения см. в тексте.

из тангенса угла наклона угловой зависимости $(HC/\Delta R_0)^{1/2}$ при $C \rightarrow 0$. Значения второго вириального коэффициента (A_2) определялись из тангенса угла наклона концентрационных зависимостей $(HC/\Delta R_0)^{1/2}$ при $\theta \rightarrow 0$.

Важно уточнить, что A_2 – второй вириальный коэффициент в разложении химических потенциалов ЭПС и растворителя по концентрациям, который характеризует термодинамическое сродство молекул биополимеров друг к другу и к растворителю [2]:

$$\mu_1 = \mu_1^0 - (RT / m_1) \cdot (m_2 + 1/2 A_2^* m_2^2); \quad (2)$$

$$\mu_2 = \mu_2^0 + RT \left[\ln(m_2 / m^0) + A_2^* m_2 \right], \quad (3)$$

где μ_i^0 и m_i – стандартный химический потенциал и концентрация (моляльная) i -компонента ($i=1$ для растворителя, $i=2$ для биополимера); A_2^* – молярный второй вириальный коэффициент ($\text{см}^3/\text{моль}$), который рассчитывается из весового A_2 ($\text{см}^3 \cdot \text{моль} \cdot \text{г}^{-2}$) по уравнению: $A_2^* = 2 A_2 M_w^2 / 1000$ [19]; m^0 – моляльность биополимера в стандартном состоянии.

Так, если $A_2 < 0$, то взаимодействия полимер–полимер более термодинамически благоприятны (химический потенциал биополимера μ_2 при увеличении концентрации биополимера в растворе уменьшается (см. уравнение (3)) по сравнению с взаимодействиями полимер–растворитель (химический потенциал растворителя μ_1 при увеличении концентрации биополимера в растворе возрастает (см. уравнение (2)) и, таким образом, растворитель считается термодинамически плохим. Напротив, если $A_2 > 0$, то взаимодействия полимер–полимер термодинамически менее благоприятны, чем взаимодействия полимер–растворитель и растворитель, термодинамически хороших. Если же $A_2 = 0$, то растворитель можно отнести к термодинамически идеальным, т.е. все виды парных взаимодействий в растворе термодинамически идентичны [16, 17]. Таким образом, при проведении измерений в водной среде величина второго вириального коэффициента косвенным образом дает представление о гидрофобности/гидрофильности поверхности молекул/ассоциатов биополимера.

В работе приводятся средние значения M_w , A_2 и R_G не менее чем двух повторений каждого эксперимента. Ошибка метода при определении M_w и A_2 составляет $\pm 10\%$. Ошибка метода в определении R_G составляет $\pm 5\%$ [17].

Значения гидродинамического радиуса (R_h) для изученных образцов ЭПС были получены в растворах методом динамического лазерного светорассеяния при 25 °С. Временная корреляционная функция интенсивности светорассеяния для изучаемых образцов была измерена при $\theta = 90^\circ$, используя аппарат ЛС-01 (вертикально поляризованный свет, $\lambda = 633$ нм). Для определения гидродинамического радиуса из временной корреляционной функции использовали специальную программу DYNALS Release 1.5 (все права защищены А. Голдинг и Н. Сидоренко). Ошибка измерений при определении гидродинамического радиуса R_h (на основании не менее 10 повторений) не превышала 10%.

На основании данных статического и динамического лазерного светорассеяния были дополнительно оценены архитектура рассеивающих частиц ЭПС в растворе (по определенным значениям структурно-чувствительного параметра $\rho = R_G/R_h$ [18, 20, 21]) и плотность рассеивающих частиц ЭПС в растворе (по уравнению $d = M_w/(N_A V)$, где M_w – среднемассовая молярная масса частицы; N_A – число Авогадро; V – объем частицы).

Если архитектура частиц может быть аппроксимирована сферой, как для изученных ЭПС ($1 < \rho < 2$) (табл. 1, [18, 20, 21]), то $V = 4/3\pi R_G^3$, где R_G – радиус инерции частицы [16].

Для приготовления биоразлагаемых пленок на основе полученных образцов ЭПС использовали водные растворы, содержащие 0,1 г ЭПС и 7,5 г раствора, к которым добавляли в качестве пластификатора 2,5 г глицерина (25 масс.%). Пленки получали в 4,5-сантиметровых пластиковых чашках Петри. Полученные растворы сушили при 87 °С в вентилируемой печи до достижения постоянного веса (около 6 ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продуцирование экзополисахаридов бактериями *Leuconostoc mesenteroides* в процессе их роста

При сравнительном культивировании бактерий *L. mesenteroides* на среде MRS и молочной сыворотке с добавлением сахарозы в концентрации 30 г/л в периодическом режиме было показано, что удельная скорость роста составляла в логарифмической фазе 0,37 и 0,33 ч⁻¹, концентрация клеток – 3,7 и 2,2 у.е., а концентрация ЭПС – 3,64 и 3,40 г/л, соответственно.

На основании данных результатов был рассчитан отъемно-доливной режим (1 л/ч) культивирования бактерий на молочной сыворотке с добавлением сахарозы. Результаты исследований показали возможность стабильного роста бактерий *L. mesenteroides* при отъемно-доливном режиме, а также продуцирование ЭПС бактериями в процессе их роста (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о возможности осуществления технологии получения ЭПС на основе непрерывного культивирования бактерий на молочной сыворотке с добавлением сахарозы при коэффициенте скорости протока более 0,35 ч⁻¹ и получения ЭПС в концентрации около 3 г/л.

УФ-спектральный анализ состава экзополисахаридов, синтезированных бактериями *L. mesenteroides* при росте на среде, содержащей лактозу и сахарозу, и кефирными грибами показал идентичность их состава, пик определялся на уровне 189,5 нм (рис. 2), что соответствует ранее полученным данным [13].

Структурные и термодинамические параметры экзополисахаридов

Поскольку известно, что функциональная активность полисахаридов определяется не только их составом, но и физико-химическими свойствами, для определения направления наиболее эффективного использования экзополисахаридов,

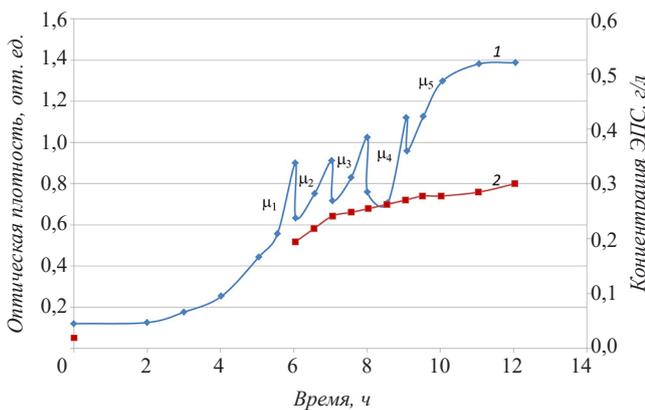


Рис. 1. Рост бактерий *Leuconostoc mesenteroides* на молочной сыворотке с добавлением сахарозы при отъемно-доливном режиме (1) и динамика накопления экзополисахаридов (2). $\mu_1 = 0,364 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_2 = 0,356 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_3 = 0,353 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_4 = 0,372 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_5 = 0,361 \text{ ч}^{-1}$

Fig. 1. The growth of bacteria *Leuconostoc mesenteroides* on a medium containing whey supplemented with sucrose in the sequencing batch bioreactor (1) and dynamics of the accumulation of exopolysaccharides (2). $\mu_1 = 0,364 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_2 = 0,356 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_3 = 0,353 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_4 = 0,372 \text{ ч}^{-1}$; $\mu_5 = 0,361 \text{ ч}^{-1}$

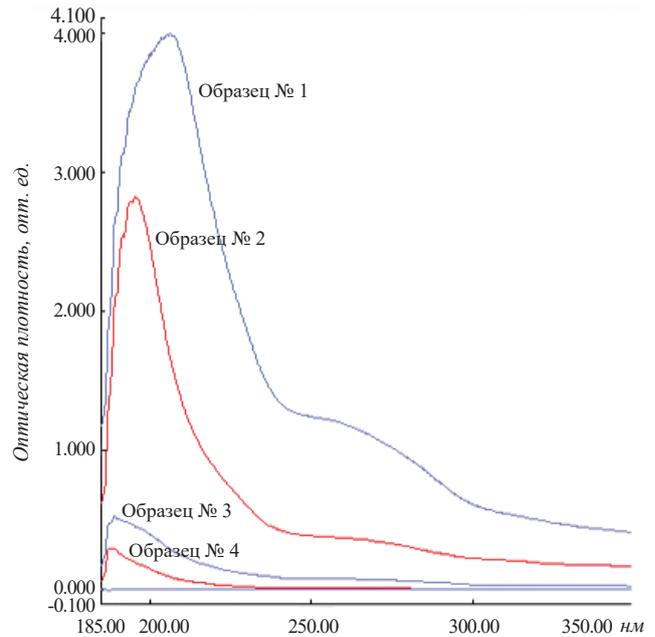


Рис. 2. УФ-спектральный анализ образцов ЭПС кефирных грибов и продуцируемого бактериями *Leuconostoc mesenteroides*: образец № 1 – ЭПС, синтезированный культурой *L. mesenteroides*; образец № 2 – кефиран, выделенный из кефирных грибов; образец № 3 – ЭПС, синтезированный культурой *L. mesenteroides* (разбавленный в 100 раз); образец № 4 – кефиран, выделенный из кефирных грибов (разбавленный в 100 раз)

Fig. 2. UV-spectral analysis of the samples of exopolysaccharides (EP), which were both isolated from kefir corns and synthesized by bacteria *Leuconostoc mesenteroides*: sample № 1 – EP, synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* culture; sample № 2 – kefiran, isolated from kefir corns; sample № 3 – EP, synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* culture (diluted by a factor of 100); sample № 4 – kefiran, isolated from kefir corns (diluted by a factor of 100)

продуцируемых бактериями *L. mesenteroides* в водной среде, была проведена сравнительная оценка структурных ($M_w, R_G, R_h, \rho = R_G/R_h, d$) и термодинамических (A_2) параметров комбинацией методов динамического и статического лазерного светорассеяния экзополисахаридов, продуцируемых кефирными грибами (ЭПС КГ) и бактериями *L. mesenteroides*.

С использованием величин $v_{\text{эпс}}$ были рассчитаны структурные и термодинамические параметры экзополисахаридов на основании измерений лазерного светорассеяния и с помощью уравнения (1). Из табл. 1 видно, что полисахариды, выделенные из кефирных грибов (образец № 1), и полисахариды, синтезированные бактериями (образец № 2), имели сходные, в пределах ошибки

опыта, значения среднемассовых молярных масс, а также вторых вириальных коэффициентов, характеризующих их термодинамическое сродство к водной среде.

Однако остальные измеренные параметры имели значимые различия. При этом наиболее ярко выраженные различия были отмечены в размерах полисахаридов в водной среде. Так, радиус инерции (R_G) и гидродинамический радиус (R_h) ЭПС *L. mesenteroides* были меньше в 2,6 и 2,3 раза, соответственно, чем эти радиусы экзополисахаридов, полученных из кефирных грибов (образец № 1).

Так же меньшие значения структурно чувствительного параметра ρ , обнаруженные для ЭПС *L. mesenteroides*, указывали на большую компактность этих рассеивающих частиц ($\rho = 1,65$) по сравнению с рассеивающими частицами ЭПС КГ ($\rho = 1,83$), при их общей сферической форме ($1 < \rho < 2$) [14, 16, 17].

Такие различия в размерах образцов ЭПС (№ 1 и № 2) при близких значениях их молярных масс приводили к большим на порядок значениям плотности частиц ЭПС *L. mesenteroides* в водной среде, что может свидетельствовать о самопроизвольном формировании ассоциатов молекул ЭПС *L. mesenteroides* в водной среде. Это было подтверждено при растворении образца № 2 в 50%-ном водном растворе ДМСО (образец № 3) для подавления внутри- и межмолекулярных водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Практически четырехкратное снижение молярной массы ЭПС *L. mesenteroides* в присутствии 50% ДМСО (табл. 1), сопровождающееся при этом практически семикратным уменьшением плотности этих частиц, подтверждало, что ЭПС, синтезированный культурой *L. mesenteroides*, формировал в водной среде плотные ассоциаты благодаря множеству межмолекулярных, вероятнее всего, водородных связей.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что функциональная активность полисахаридов, продуцируемых *L. mesenteroides*, отличается от таковой полисахаридов, выделенных из кефирных грибов. Данное положение подтверждалось разной способностью полученных полисахаридов образовывать полимерные пленки.

Для приготовления биоразлагаемых пленок на основе полученных образцов экзополисахаридов в качестве пластификатора был использован глицерин, который является наиболее распространенным пластификатором в производстве деградируемых пленок [8–10]. Полисахариды, выде-

ленные из кефирных грибов, были способны образовывать пленки, что было показано ранее и другими авторами [11]. Полисахарид, синтезированный бактериями *L. mesenteroides*, не образовывал пленок. Вероятнее всего, это происходило из-за уменьшения функциональной активности молекул полисахарида. Из объединенных в сферические ассоциаты высокой плотности молекул было затруднено формирование однородной, с большим числом контактов между молекулами полимерной сетки, необходимой для создания прочных пленок.

Наиболее перспективными направлениями использования экзополисахаридов, синтезированных культурой *L. mesenteroides* на среде с лактозой и добавлением сахарозы, по результатам данного исследования, можно назвать фармацевтическую, косметическую и пищевую промышленность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ботвинко И.В. Экзополисахариды бактерий. *Успехи микробиологии*, 1985, (20), 79–122.
2. Semenova M.G., Dickinson E. Biopolymers in food colloids: thermodynamics and molecular interactions. Leiden: Brill, 2010, 369.
3. Freitas F., Alves V.D., Reis M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological application. *Trends Biotechnology*, 2011, 29(8), 388–398. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008
4. Medrano M., Racedo S.M., Rolny I.S., et al. Oral administration of kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *J. Agricultural Food Chemistry*, 2011, 59, 5299–5304. doi: 10.1021/jf1049968
5. Rodrigues K.L., Caputo L.R.G., Carvalho J.C.T., et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 2005, 25(5), 404–408. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020
6. Laws A.P., Marshall V.M. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 2011, 11, 709–721. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00115-7
7. Chen Y.P., Hsiao P.J., Hong W.S., et al. *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis *in vitro* and *in vivo*. *J. Dairy Science*, 2012, 95(1), 63–74. doi: 10.3168/jds.2011-4696
8. Еникеев Р.Р. Описание, биосинтез и биологическое действие полисахарида кефирных грибов-кефирана. *Биофармацевтический журнал*. 2011, 3(3), 11–18.
9. Piermaria J.A., Pinotti A., Garcia M.A., Abraham A.G. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloid*, 2009, 23, 684–690. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.05.003

10. Piermaria J., Bosch A., Pinotti A., et al. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25, 1261–1269. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.11.024
11. Motedayen A.A., Khodaiyan F., Salehi E.A. Development and characterization of composite films made of kefir and starch. *Food Chemistry*, 2013, 13, 1231–1238. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.073
12. Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefir. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(1), 477–483. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.010
13. Градова Н.Б., Хохлачева А.А., Мурзина Е.Д., Мясоедова В.В. Микробные компоненты кефирных грибков, как продуценты экзополисахарида кефирана. *Биотехнология*. 2014, (6), 18–26. doi: 10.1134/S0003683815090045
14. Zajšek Katja, Goršek Andreja, Kolar Mitja. Cultivating condition effects on kefir production by mixed culture as of lactic bacteria of kefir grains. *Food Chemistry*. 2013, 139, 970–977. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.142
15. Piermaria J.A., de la Canal M.L., Abraham A.G. Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22, 1520–1527. doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.10.005
16. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. М.: Химия, 1965, 772.
17. Эскин В.Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул. Л.: Наука, 1986, 287.
18. Burchard W., Ross-Murphy S.B. Light scattering. Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers. Glasgow: Blackie, 1994, 151–214.
19. Wells, I.D. The transformation of virial equations for polymer solutions between different concentration scales. *Chemica Scripta*, 1984, 23, 202–204.
20. Ioan C.E., Aberle T., Burchard W. Structure properties of dextran. 2. Dilute solution. *Macromolecules*, 2000, 33, 5730–5739. doi: 10.1021/ma000282n
21. Tuteja A., Mackay M.E., Hawker C.J., Van Horn B., Ho D.L. Molecular architecture and rheological characterization of novel intramolecularly crosslinked polystyrene nanoparticles. *J. Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 2006, 44, 1930–1947. doi: 10.1002/polb.20826

Synthesis and Physicochemical Properties of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria *Leuconostoc mesenteroides* Cultured in Lactose- and Sucrose-Containing Medium

N.B. GRADOVA^{1,*}, M.G. SEMENOVA², A.A. KHOKHLACHEVA¹, A.S. ANTIPOVA², and E.D. MURZINA¹

¹Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125480, Moscow Russia

²Emanuel Institute for Biochemical Physics (IBCP), Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow Russia

*e-mail: gradova_nb@mail.ru

Received September 11, 2018

Revised November 1, 2018

Accepted January 15, 2019

Abstract—The dynamics of *Leuconostoc mesenteroides* bacteria growth and synthesis of exopolysaccharides when cultured on a medium containing whey and sucrose has been investigated. It was shown that exopolysaccharides were produced during the culture growth and the addition of sucrose increased in the productivity of those compounds without affecting their composition. Using the dynamic and static methods of light scattering, it was shown that sucrose as a medium component modified physicochemical properties of exopolysaccharides changing their structural and thermodynamic characteristics in aqueous medium, which affected their functional activity and determined the way of their most efficient use.

Key words: kefir fungi, lactic acid bacteria, physicochemical properties of exopolysaccharides.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-82-88