

Možnosti využití exopolysacharidů v mléčných výrobcích

Barbora Jelínková

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora Jelinková**
Osobní číslo: **T15926**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Možnosti využití exopolysacharidů v mléčných výrobcích**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Charakterizujte exopolysacharidy a jejich producenty.**
2. **Popište možnosti využití exopolysacharidů v potravinách se zaměřením na mléčné výrobky.**
3. **Charakterizujte změnu vlastností potraviny vlivem exopolysacharidů.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tiskárenská/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] HARUTOSHI, Tsuda. **Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications. Lactic Acid Bacteria - R. InTech, 2013. DOI: 10.5772/50839. ISBN 978-953-51-0955-6.**
- [2] SANLI, T., GURSEL, A., SANLI, E., ACAR, E., BENLI, M. **The effect of using an exopolysaccharide-producing culture on the physicochemical properties of low-fat and reduced-fat Kasar cheeses. International Journal of Dairy Technology, 66 (4): 535-542. 2013.**
- [3] COSTA, N.E., HANNON, J.A., GUINEE, T.P., AUTY, M.A.E., McSWEENEY, PLH., BERESFORD, TP. **Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of Lactococcus lactis on half-fat Cheddar cheese. Journal Dairy Science, 93: 3469-3486. 2010.**
- [4] RYNNE, N.M., BERESFORD, T.P., KELLY, A.L., GUINEE, T.P. **Effect of a roxy-exopolysaccharide-producing culture on coagulation and syneretic properties of rennet-induced milk gels. The Australian Journal of Dairy Technology, 63 (1): 3-7. 2008.**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **2. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2018**

Ve Zlině dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: JELINCOVÁ BARBORA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 17 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ²⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 3.5.2018

Jelincová Barbora

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací

²⁾ Vysoká škola neoprávněně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledků obhajoby prostřednictvím databáze knižničních prací, která spravuje. Způsob zveřejnění student může předtím vysvětlit.

³⁾ Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být nejvýše pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k mání veřejnosti v místě určeném národním předpisem vysoké školy nebo o ní tak určeno, v místě zpracování výsk. tvorby, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výtisk, copy nebo rozmnožování.

⁴⁾ Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

⁵⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3

(3) Na práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, u které nikdo ze učitelů, přičemž nebo nepříměno hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k jinému potřebě díla vytvořené žákem nebo studentem ke společné školních nebo studijních povinnostech vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

4. úřadní č. 121/2000 Sb. o práva autorském, o práva souvisejících s ním autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo.

(2) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 21 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla učitelovi svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat náhrady chybějícího projevu její o užití v soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zákona neplatí.

(2) Nemá-li uvedená osoba, může autor školního díla své dílo učít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výjimečně jim dosaženého v souvislosti s učením díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložil, a to podle poměru až do jejich skutečné výše; oňtom se přiměřeně v výši výjimečně dosaženému škole nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tématem této bakalářské práce je snaha přiblížit problematiku zabývající se exopolysacharidy. Pozornost byla věnována jejich charakteristice a také mikroorganismům, které mají schopnost produkovat tyto extracelulární polymery. Využívají se především v mlékárenském průmyslu, neboť ovlivňují reologické vlastnosti fermentovaných mléčných výrobků. Především mají schopnost plnit funkci stabilizátorů, nebo zahušťovadel a tím pozitivně přispívat ke konzistenci výrobků. Jejich využití má široký rozhled i v jiných průmyslových odvětvích, jako je kosmetický, farmaceutický i ropný průmysl.

Klíčová slova: exopolysacharidy, bakterie mléčného kvašení, fermentované mléčné výrobky, texturní vlastnosti

ABSTRACT

The topic of this bachelor thesis is an effort to expound the issue of exopolysaccharides. The main attention is devoted to their characteristics as well as to the microorganisms that have the ability to produce these extracellular polymers. They are mainly used in the dairy industry as they affect the rheological properties of fermented dairy products. Most importantly, they are able to act as stabilizers or thickeners and thereby contribute positively to the consistency of the products. They are widely used in a few other industries, namely in cosmetics, pharmaceuticals or the oil industry.

Keywords: exopolysaccharides, lactobacillales, fermented dairy products, textural properties

Děkuji vedoucí doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a za odborné a cenné rady, které vedly ke zpracování této bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 EXOPOLYSACHARIDY	11
2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ EXOPOLYSACHARIDŮ.....	15
2.1 HOMOEXOPOLYSACHARIDY	15
2.1.1 Glukany	15
2.1.1.1 Dextran.....	15
2.1.1.2 Mutan	15
2.1.1.3 Alternan	16
2.1.2 Fruktany	16
2.1.2.1 Levan	16
2.1.2.2 Inulin.....	17
2.2 HETEROEXOPOLYSACHARIDY.....	17
2.3 BIOSYNTÉZA EXOPOLYSACHARIDŮ POMOCÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	20
2.3.1 Biosyntéza homoexopolysacharidů.....	20
2.3.2 Biosyntéza heteroexopolysacharidů.....	22
2.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI EPS	23
3 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ EXOPOLYSACHARIDŮ	26
3.1 VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	26
3.1.1 Jogurty	26
3.1.2 Kefír	29
3.1.3 Sýry	30
3.1.4 Další možnosti využití EPS v potravinářství	34
3.2 VYUŽITÍ V KOSMETICKÉM A FARMACEUTICKÉM PRŮMYSLU	36
3.2.1 Léčba akné za pomoci nanočástic EPS	37
3.3 OSTATNÍ VYUŽITÍ BAKTERIÁLNÍCH EXOPOLYSACHARIDŮ V PRŮMYSLU	38
ZÁVĚR	40
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	41
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	46
SEZNAM OBRÁZKŮ	47
SEZNAM TABULEK.....	48

ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení jsou používány po celém světě, protože zlepšují konzervářské, sensorické a nutriční hodnoty. Jsou využívány jako startovací kultury při výrobě celé škály produktů. Ovšem, největší zastoupení mají v mlékárenském průmyslu, kde tvoří základ fermentovaným mléčným výrobkům. Mohou produkovat extracelulární polymery tzv. exopolysacharidy, které se využívají díky svým pestrým funkčním vlastnostem v mnoha aplikacích, např. potraviny, farmaceutika, kosmetika, biomedicína, ropný průmysl. Opačnou a negativní vlastností je, že mají schopnost vytvářet biofilm, který je nepříjemnou situací v potravinářských provozech. Úloha exopolysacharidů spočívá především v tom, že ovlivňují reologické, strukturální a sensorické vlastnosti potravin. Nahrazují různá aditiva jako například modifikované škroby, pektin, agar, karagenan, lecitin atd. Jejich produkci ale ovlivňují kultivační podmínky, jako je především složení média, teplota a pH prostředí. Proto může být získání těchto přírodních a zdravotně nezávadných polymerů obtížné.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 EXOPOLYSACHARIDY

V mnoha fermentovaných potravinách se používají bakterie mléčného kvašení (např. kysané zelí, trvanlivé fermentované salámy) a nejvíce u fermentovaných mléčných výrobků, mezi které řadíme sýr a kysané mléčné výrobky. Bakterie mléčného kvašení (BMK) produkují zejména kyselinu mléčnou, oxid uhličitý a také diacetyl, které pozitivně přispívají k struktuře, chuti a rovněž k trvanlivosti fermentovaných potravin. Mezi další užitečnou vlastnost některých bakterií mléčného kvašení patří schopnost produkovat exopolysacharidy (EPS), které mají hlavní roli v úpravě texturních vlastností u průmyslově vyráběných kysaných mléčných výrobků (zejména jogurtů nebo kefírů), sýrů a také mléčných dezertů. (Tsuda, Hara a Miyamoto, 2008)

Exopolysacharidy jsou polysacharidy, které mohou být vylučovány z buňky nebo produkovány na vnější straně buňky extracelulárními enzymy. Některé bakterie mléčného kvašení produkují EPS, které jsou vylučovány do prostředí, nebo mohou být připojeny ke kapsli vytvářející buněčný povrch. EPS z bakterií mléčného kvašení dělíme do dvou tříd a to na homoexopolysacharidy a heteroexopolysacharidy. Homo-EPS jsou složeny z jednoho typu monosacharidu, kdežto hetero-EPS se skládají z pravidelných a opakujících se jednotek 3-8 různých sacharidových skupin, které jsou syntetizovány z intracelulárních prekurzorů nukleotidů cukru. (Ganzle et al., 2005) Předpokládá se, že mezi hlavní fyziologické funkce EPS patří biologická obrana proti různým stresům, jako jsou toxické ionty kovů, fágový útok či vysoušení. Je však nepravděpodobné, že by bakterie používali EPS jako zdroj energie. Ovšem některé potenciálně probiotické kmeny bakterií mléčného kvašení byly schopny degradace EPS produkovaného jinými kmeny bakterií mléčného kvašení. (Ruijssenaars, Stingele a Hartmans, 2000; Korakli, Ganzle a Vogel, 2002)

I když se produkce EPS využívá v potravinářském průmyslu pro zlepšení vlastností produktu tak je důležité brát na zřetel i jejich schopnost spoluúčastnit se na tvorbě biofilmu na zpracovatelském zařízení. Bakterie vylučují EPS, aby byly schopny udržet se na povrchu materiálu ve formě lepivého slizu a tím způsobit kontaminaci produktu.

Exopolysacharidy hrají několik rolí v bakteriálních biofilmech, které jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: Některé role EPS v biofilmech (Nwodo et al., 2012)

Proces	Funkce EPS v biofilmech
Přilnavost	EPS zajišťují počáteční kolonizaci a dlouhodobé přilnutí biofilmu k povrchu
Agregace bakteriálních buněk	EPS spojují buňky a imobilizují bakteriální populace a tím se vytváří hustá buněčná hmota
Zadržování vody	Hydrofilní EPS mají vysokou schopnost zadržovat vodu, čímž hydratují mikroprostředí kolem biofilmu a nedochází k vysoušení
Soudržnost biofilmů	Neutrální a nabité EPS tvoří síť hydratovaných polymerů (biofilmovou matici), která stabilizuje biofilmy, určuje jejich stavbu a umožňuje komunikaci mezi buňkami
Zdroj živin	EPS jsou zdrojem sloučenin obsahujících uhlík, dusík a fosfor, které využívá bakteriální populace biofilmu
Ochranná bariéra	EPS poskytují během infekce odolnost bakterií proti nespecifickým a specifickým hostitelským obranným prostředkům, poskytují rezistenci k antimikrobním látkám, chrání cyanobakteriální nitrogenázu před škodlivými účinky kyslíku, chrání před pohlcujícími prvky

Přítomnost biofilmu může vyvolat závažné problémy v různých průmyslových odvětvích, jako je nápojový a potravinářský průmysl, průmysl na úpravu vody nebo třeba průmysl farmaceutický. Samozřejmě má i pozitivní vlastnosti, které se využívají při čištění odpadních vod nebo k degradaci toxických látek. Biofilmem nazýváme komunitu mikroorganismů, které se uchycují na různých površích, kde se může nacházet jejich zdroj vzniku, jako je voda, živiny i kyslík. (Jung, Choi a Lee, 2013)

Riziková místa vzniku biofilmu:

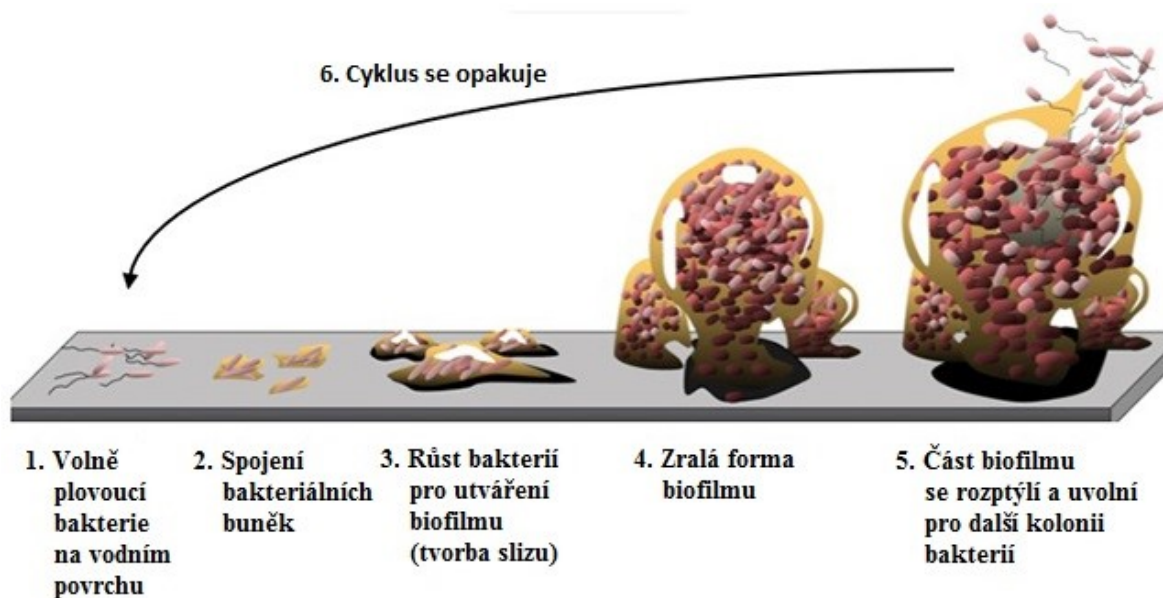
- Výrobní zařízení a potrubní systémy
- Méně dostupná místa (tzv. mrtvé rohy předmětu, zařízení), nerovnosti povrchu
- Chladicí systémy, klimatizace
- Vodovodní síť - potoky, řeky, oceány, odpadní vody, žumpy, průmyslové organické odpady, filtry, trupy lodí
- Lékařské nástroje, cizí tělesa v lidském těle (kanyly, katétrů či plastické protetické implantáty)

Mezi nejčastější mikroorganismy vytvářející biofilmy patří *Bacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Listerie* nebo kvasinky a plísně. V této ochranné vrstvě jsou bakterie mnohonásobně odolnější proti antimikrobním látkám (např. dezinfekční prostředky, antibiotika) a proto je čištění povrchu pokrytého biofilmem velmi obtížné. Je potřeba pravidelného úklidu, aby se zamezilo množení bakterií a předešlo se tak různým infekcím a kontaminacím.

Příklady prevence a odstranění biofilmu:

- Efektivní čištění zabrání vzniku kontaminace
- Mytí a čištění nejdříve viditelných nečistot a pak použití vhodných dezinfekčních a čistících prostředků
- Dosažení mikrobicidního účinku (usmrcení mikroorganismů) a uvolnění biofilmu
- Účinné odstranění záleží na mechanickém čištění, správné koncentraci dezinfekčního prostředku a teploty vody (mycí lázeň) a dobou působení (HACCP, ©2009)

Maximální odolnost vůči antibiotikům, vykazuje biofilm ve stádiu zralosti, kdy je jeho struktura houbovitá nebo věžovitá. (Hoiby, Bjarnsholt a Givskov; et al., 2010) Na Obrázku 1 je znázorněn vznik biofilmu na povrchu.



Obrázek 1: Vznik biofilmu (ZME Science, ©2007-2017)

2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ EXOPOLYSACHARIDŮ

2.1 Homoexopolysacharidy

Homo-EPS jsou složeny z jediného typu monosacharidů např. α -D-glukany, β -D-glukany, fruktany a další polygalaktany. Kvůli vlastnostem jejich primární struktury, vznikají mezi homopolysacharidy rozdíly, jako je molekulová hmotnost, vzorec vazeb hlavního řetězce či struktura větví. (Cerning, 1990; Harutoshi, 2013) Bakterie mléčného kvašení produkují dvě důležité skupiny homo-EPS, kterými jsou glukany a fruktany.

2.1.1 Glukany

Mezi ně patří například dextran, mutan a alternan. Jejich struktura, vazby a producenti jsou uvedeni na Obrázku 2.

2.1.1.1 Dextran

Dextran patří mezi historicky první objev homo-EPS, který byl nalezen ve víně. Za jeho produkci byl označen a identifikován *Leuconostoc mesenteroides*. (Nwodo et al., 2012) U *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* byla zaznamenána tvorba dextranu ze sacharózy, ale jeho schopnost tvořit dextran se může ztrácet v důsledku opakovaného přenosu do medií se zvýšenou koncentrací soli. U kmenů *Leuconostoc* sp. lze schopnost produkce dextranu obnovit, pokud jsou inokulovány do media, které obsahuje pomerančový nebo rajčatový džus. (Pederson a Albury, 1955)

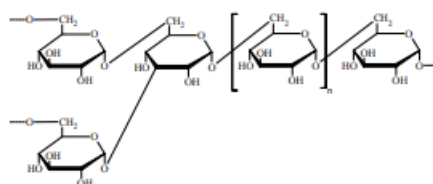
2.1.1.2 Mutan

Jedná se o glukan, který je syntetizovaný různými sérotypy *Streptococcus mutans*. Od dextranu se liší tím, že obsahuje vysoký počet vazeb α -1,3. Rozdíly v rozpustnosti spočívají v poměrech různých typů vazeb. Glukany rozpustné ve vodě jsou bohaté na vazby α -1,6, kdežto nerozpustné ve vodě jsou bohaté na vazby α -1,3. (Cerning, 1990) Mutan je spojován se zubním kazem, protože díky jeho nerozpustným vazbám α -1,3 se udržuje a infikuje ústní dutinu (40 – 80 %). Podporuje tedy přilnavost mikroorganismů na povrch zubů a tím dochází také ke vzniku zubního plaku.

2.1.1.3 Alternan

Struktura alternanu, která má střídavé vazby α -1,6 a α -1,3 je pravděpodobně zodpovědná za jeho fyzikální vlastnosti, vysokou rozpustnost a také nízkou viskozitu. Díky nim se používá pro úpravu texturních vlastností v potravinách s nízkou viskozitou. Jako první kmen produkující alternan byl uveden *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. Enzym, který jej syntetizuje ze sacharózy, se nazývá alternansukráza. (Cote a Robyt, 1982)

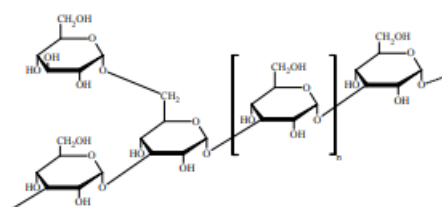
Dextran



α -1,6 (α -1,3)

Leuc. mesenteroides subsp. *mesenteroides*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuc. amelibiosum*, *Lb. curvatus*

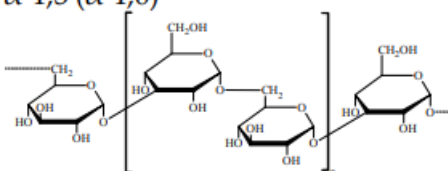
Mutan



α -1,3 (α -1,6)

Str. mutans

Alternan



α -1,3 and α -1,6

Leuc. mesenteroides

Obrázek 2: Struktura, vazby a producenti glukánů (Harutoshi, 2013)

2.1.2 Fruktany

Zde patří například levan a inulin. Struktura, vazby a jejich producenti, jsou uvedeny na Obrázku 3.

2.1.2.1 Levan

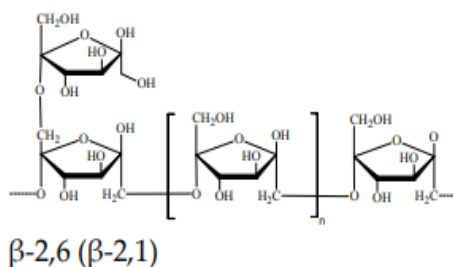
Levan je EPS, který je produkován ze sacharózy. Jedná se o fruktan složený z β -2,6- vazebných molekul fruktózy a s některými postranními řetězci rozvětven pomocí vazeb β -2,1. Jednou z bakterií mléčného kvašení produkující levan, patří např. *Streptococcus salivarius*. (Van Geel-Schutten et al., 1999)

2.1.2.2 *Inulin*

Inulin je fruktan složený z β -2,1- vazebných molekul fruktózy s některými větvemi spojenými s β -2,6 vazbami. Získává se pomocí extrakce z rostlin, především z kořene čekanky. Využívá se v různých aplikacích, zejména v potravinářském průmyslu (např. potraviny pro diabetiky), jelikož má velmi nízkou energetickou hodnotu. (Abdel-Wahhab et al., 2018)

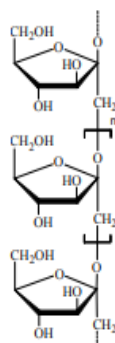
Produkce fruktanu byla také zjištěna u *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. (Korakli, Ganzle a Vogel, 2002)

Levan



Leuc. mesenteroides, Lb. reuteri

Inulin



Str. mutans

Obrázek 3: Struktura, vazby a producenti fruktanů (Harutoshi, 2013)

2.2 Heteroexopolysacharidy

Heteroexopolysacharidy vykazují svým chemickým složením širokou variabilitu. Jsou to polymerizované opakující se jednotky, které se skládají hlavně z D-glukózy, D-galaktózy a L-ramnózy. Složení monosacharidových podjednotek a struktura opakujících se jednotek

jsou považovány za druhově specifické. Jediný výjimečný případ se týká *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*. Jedná se o izolovaný druh z kukuřičného zrna, fermentovaného mléčného krmiva vyskytujícího se v oblasti severního Kavkazu, který produkuje velké množství polysacharidů. (Harutoshi, 2013) Mezi další kmeny produkující heteroexopolysacharidy patří *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus helveticus*. Příklady kmenů produkujících EPS a jejich monosacharidové složení jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Kmeny produkující EPS a jejich monosacharidové složení (de Vuyst a Degeest, 1999)

Kmeny	Obsah monosacharidu v EPS
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 <i>Lactobacillus helveticus</i> TY 1-2 a NCDO 766 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> C83 <i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi20, Sfi32, LY03	pouze glukóza a galaktóza
<i>Lactobacillus paracasei</i> 34-1	pouze galaktóza
<i>Streptococcus thermophilus</i> OR 901	pouze galaktóza a ramnóza
<i>Lactobacillus sake</i> 0-1	pouze glukóza a ramnóza
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CRL 420	pouze glukóza a fruktóza
<i>Streptococcus thermophilus</i> MR-1 C	pouze galaktóza, ramnóza a fukóza

Bakterie mléčného kvašení produkují rozličné množství heteroexopolysacharidů. V následujícím výčtu jsou uvedeny příklady produkce exopolysacharidů u vybraných bakterií mléčného kvašení:

- *Streptococcus thermophilus* - 50-350 mg / l
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 80-600 mg / l
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - 60-150 mg / l
- *Lactobacillus casei* - 50-60 mg / l

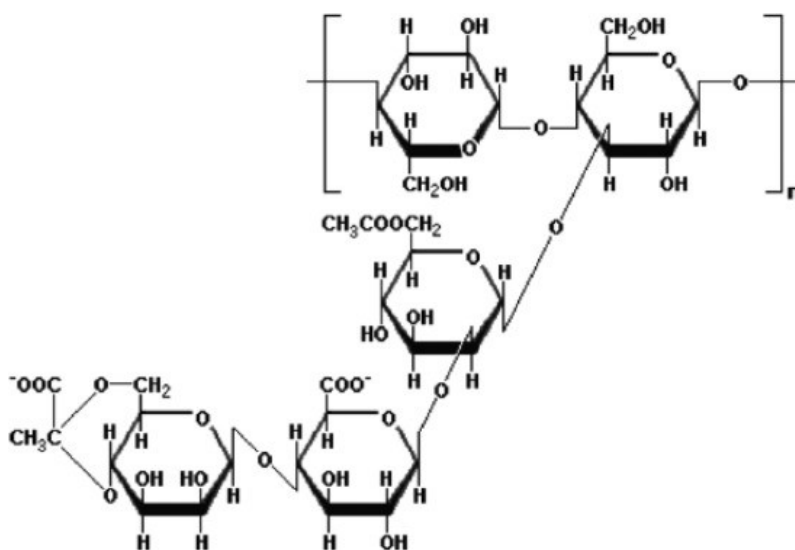
- *Lactobacillus plantarum* – zhruba 140 mg / l

Nejvyšší zaznamenané výtěžky heteroexopolysacharidů byly pozorovány u:

- *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M - 2775 mg / l
- *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B- 2500 mg / l

(Cerning, 1995, Harutoshi, 2013)

Ovšem výtěžek EPS produkovaného bakteriemi mléčného kvašení je mnohem nižší, než výnosy z jiných průmyslově důležitých mikroorganismů. Jedním z nich je například *Xanthomonas campestris*, jehož produkce činí 30-50 g / l xantanové gumy. (de Vuyst a Degeest, 1999) Její primární struktura znázorněná na Obrázku 4, se skládá z opakovaných pentasacharidových jednotek, které jsou tvořeny dvěma glukózami, dvěma manózami a kyselinou glukuronovou, propojené vazbami β -(1 \rightarrow 4), α -(1 \rightarrow 3). (Bobade, Cheetham a Hashim; et al., 2018)

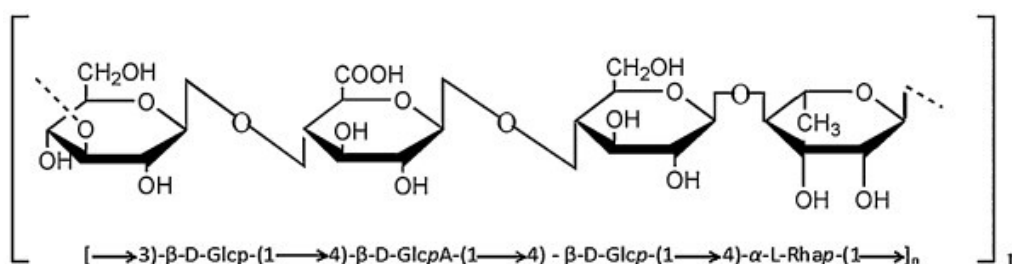


Obrázek 4: Molekulární struktura xanthanové gumy (Bobade, Cheetham a Hashim; et al., 2018)

Nejčastější surovinou pro výrobu xanthanu s potravinářským označením E415, je kukuřice nebo sója, které mohou být geneticky modifikované. Získává se fermentací glukózy nebo sacharózy. (FÉR potravina, ©2018) Xanthan je bakteriální EPS, který se využívá v potravinářském průmyslu, především kvůli jeho jedinečným reologickým vlastnostem

a možnosti nízkonákladové produkce. (de Vuyst a Degeest, 1999) V potravinářství vykazuje podobu bílého prášku, ale ve své čisté formě se jedná o bezbarvou látku, gelovitého charakteru. Je využíván jako zahušťovadlo nebo stabilizátor v mléčných a masných výrobcích. Jelikož neobsahuje gluten, tak se používá v bezlepkovém pečivu, kde dodává těstu potřebnou lepivost, kterou jinak zajišťuje gluten. (FÉR potravina, ©2018)

Další ESP využívaný v potravinářství a označovaný jako E418 je gellan. Primární struktura gellanové gumy znázorněná na Obrázku 5, je tvořena opakující se jednotkou obsahující glukózu, ramnózu a kyselinu glukuronovou, které jsou propojeny vazbami β -(1 \rightarrow 4). (Prajapati et al., 2013) Průmyslově se vyrábí aerobním kvašením bakterií *Sphingomonas elodea*, které jsou při procesu zahřívání usmrceny. Především se používá jako stabilizátor emulzí a pěn, dále jako zahušťovadlo nebo želírující látka. Vytváří gely, vznikající za studena nebo tepla, které mohou být stabilní při teplotních výkyvech. Například se přidává do sójových nebo ovocných nápojů, do želé a džemů. (de Vuyst a Degeest, 1999, FÉR potravina, ©2018)



Obrázek 5: Chemická struktura gellanové gumy (Prajapati et al., 2013)

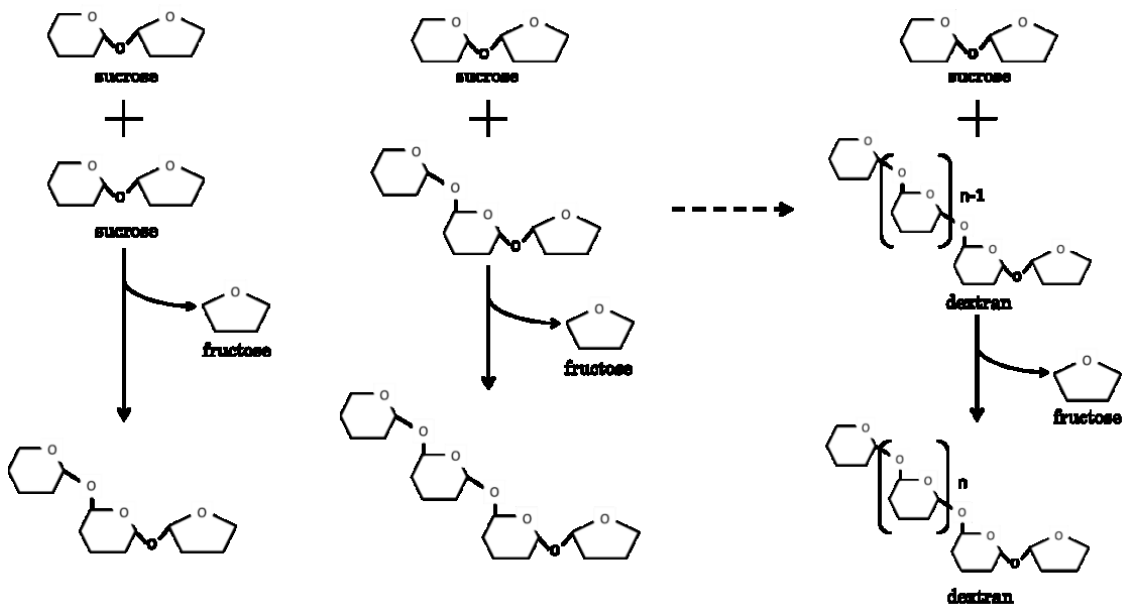
2.3 Biosyntéza exopolysacharidů pomocí bakterií mléčného kvašení

2.3.1 Biosyntéza homoexopolysacharidů

Za pomoci specifických enzymů glykosyltransferázy (GTF) nebo fruktosyltransferázy (FTF), které běžně nazýváme glukán-sukrasy nebo fruktan-sukrasy se syntetizují homoexopolysacharidy mimo buňku. Extracelulární GTF enzymy používají i bakterie mléčného kvašení produkující homoexopolysacharidy, pro syntézu α – glukánů s vysokou molekulovou hmotností ze sacharózy. U tohoto procesu se jako specifický substrát používá sacharóza a energie, která je pro tento proces nepostradatelná, pochází z hydrolýzy

sacharózy. Biosyntéza enzymů je jediným požadavkem na výrobu exopolysacharidů, neboť syntéza exopolysacharidů za pomoci GTF nebo FTF nezahrnuje aktivní transportní procesy, ani použití aktivovaných sacharidových prekurzorů. Proto je možné převést velké množství sacharózy na exopolysacharidy. V přítomnosti 160 g / l sacharózy produkuje během růstu *Lactobacillus sanfranciscensis* až 40 g / l levanu a 25 g / l L-ketózy. (Korakli et al., 2003)

I když mají GTF enzymy velkou míru podobnosti, tak laktobacily produkují širokou škálu glukánů, včetně polymerů s α -1,6 vazbami (dextran), α -1,3 vazbami (mutan) a také α -1,6 a α -1,4 vazbami (alternan). Relativní molekulová hmotnost glukánů z laktobacilů se pohybuje v rozmezí od 1×10^6 Da do 5×10^7 Da. Syntéza dextransu pomocí glykosyltransferázy je znázorněna na Obrázku 6. (Harutoshi, 2013)



Obrázek 6: Syntéza dextransu pomocí glykosyltransferázy (Harutoshi, 2013)

Enzymy GTF ze streptokoků jsou produkovány konstitutivně, kdežto enzymy GTF druhů *Leuconostoc* jsou specificky indukovány sacharózou. Například produkce GTF v *Leuconostoc mesenteroides*, je nízká v přítomnosti jiných zdrojů uhlíku, než sacharóza, ale dá se zvýšit přidáním sacharózy. (Ganzle a Vogel, 2002) Během fermentace se sacharózou je exprese GTF 10 až 15krát vyšší, než během fermentace glukózou v *Leuconostoc mesenteroides*. Při fermentaci s živným médiem obohaceným jak s glukózou, tak se sacharózou, byla aktivita GTF podobná té, která byla získána pouze sacharózou. Z toho vyplývá, že exprese GTF je nízká, pokud je v přítomnosti samotné glukózy a že aktivita GTF je významně vyvolána sacharózou. K zajištění indukce syntézy

enzymů je dostačující koncentrace 20 g / l sacharózy. Vyšší koncentrace nemají žádný vliv na zvýšení syntézy enzymů. (Harutoshi, 2013)

2.3.2 Biosyntéza heteroexopolysacharidů

Heteroexopolysacharidy jsou syntetizovány pomocí komplexních sekvencí interakcí, zahrnujících intracelulární enzymy. Na biosyntéze a sekreci hetero-EPS se podílí několik enzymů a proteinů, které nemusí být jedinečné pro tvorbu EPS. (de Vuyst a Degeest, 1999) Tvorba exopolysacharidů se uskutečňuje na základě polymerací opakujících se jednotek. Tyto jednotky tvoří série přídatku nukleotidů cukru na cytoplazmatické membráně. Pro syntézu jsou cukry výchozím materiálem. Jako zdroj energie mohou kmeny bakterií mléčného kvašení využívat různé zdroje monosacharidů i disacharidů. Díky dobře prozkoumaným systémům příjmu cukru, jsou zde zahrnuty systémy primárního transportu, přímá vazba translokace cukru na hydrolýzu ATP přes transportní specifickou ATPázu, dále pak sekundární systémy přepravy cukru či spojování přepravy cukru s dopravou iontů či jiných rozpuštěných látek. (de Vuyst et al., 2001)

Nukleotidy cukru, odvozené od glukózových-1-fosfátů, hrají během biosyntézy hetero-EPS zásadní roli (aktivace cukru), která je nezbytná pro monosacharidovou polymeraci, stejně jako například dekarboxylace nebo dehydrogenace. Například u glukózy obsažené v EPS vyprodukovaném *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 byla aktivita UDP-glukózové pyrofosforylázy, vedoucí k biosyntéze UDP-glukózy a UDP-galaktózy (aktivované formy glukózy a galaktózy), vyšší než u kultivovaných rostlin fruktózy. UDP-glukózová pyrofosforyláza byla také spojena s produkcí EPS u kmenu *Streptococcus thermophilus*. Je pravděpodobné, že glukóza nebo glukózová část z hydrolýzy laktózy je zdrojem cukru pro biosyntézu hetero-EPS u bakterií mléčného kvašení. (de Vuyst a Degeest, 1999)

Monomerní kompozice EPS nemusí ovšem záviset jen na úrovni cukrového nukleotidu uvnitř buňky, ale s největší pravděpodobností také na sestavě opakujících se jednotky EPS. Polymerace několika stovek až tisíců opakujících se jednotek probíhá postupným přidáváním sacharidových zbytků specifickými glykosyltransferázami z nukleotidových cukrů. Tím dochází k růstu jednotky, která je spojena s lipidovým nosičem a vzniká konečný EPS. (de Vuyst a Degeest, 1999, Harutoshi, 2013)

Posledním krokem biosyntézy je přemístění EPS přes membránu, k vnějšímu povrchu buňky a následně může být vyloučen do prostředí (sliz EPS) nebo zůstane připojen k buňce (kapsulární EPS). Množství nebo monosacharidové složení EPS může být ovlivněno právě transportem, ale i polymerací.

Biosyntéza polysacharidů je energeticky náročný proces. Nejprve je nutný 1 ATP pro přeměnu každé molekuly hexózového substrátu na hexozofosfát. Další fosfátová vazba s vysokou energií je potřebná pro syntézu každého cukrového nukleotidu a k fosforylaci lipidového nosiče isoprenoиду C55 je zapotřebí 1 ATP. Energie je důležitá také pro proces polymerace a transportu. Bakterie mléčného kvašení mají omezenou schopnost produkovat energii, na rozdíl od aerobních bakterií (např. *Xanthomonas campestris*) a proto je množství celkového výtěžku EPS značně omezeno. (de Vuyst a Degeest, 1999)

2.4 Faktory ovlivňující produkci EPS

Kultivační podmínky pro produkci EPS se u jednotlivých mikroorganismů (BMK) liší. Celkový výtěžek EPS závisí především na složení média (zdroj uhlíku a dusíku) a podmínkách růstu daných kmenů (teplota, pH a inkubační doba). (de Vuyst a Degeest, 1999) Za neoptimálních podmínek kultivace se produkce intracelulárně syntetizovaného EPS pohybuje v rozmezí od 0,045 do 0,350 g/l⁻¹. Při použití optimálních kultivačních podmínek v závislosti na daném kmeni se produkce EPS zvýší na 0,150 až 0,600 g/l⁻¹. (Cerning, 1990, 1995) Ještě většího výtěžku EPS lze dosáhnout, pokud je produkující kmen *Streptococcus thermophilus* kultivován v mléce, současně s neprodukujícím *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Při této kombinaci BMK může činit produkce EPS až 0,800 g/l⁻¹. (Cerning, 1990)

Složení media patří k důležitým faktorům pro produkci EPS. Bylo uskutečněno několik výzkumů a studií, pro zjištění vhodných medií, které by umožnily produkci EPS. Mléko bylo častým zkoumaným médiem, protože bylo dostupnější a levnější. Jeho studií se ve své publikaci zabývali například De Vuyst a kol., 1998. Také bylo použito syrovátkové médium, avšak nejvhodnějším se stalo chemicky definované médium. To obsahuje zdroj uhlohydrátů, aminokyselin, vitaminů, báze nukleových kyselin a minerální soli, které jsou pro zkoumání živin na růst, metabolické dráhy i biosyntézu EPS

v bakteriích mléčného kvašení vhodnější. Umožňuje kvantitativní a kvalitativní produkci EPS a zkoumá i jeho přesné složení. (Degeest, Vaningelgem a De Vuyst, 2001)

Zvýšená produkce EPS byla původně získána přidáním hydrolyzovaného kaseinu do média z odstředěného mléka, na kterém byl kultivován *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ovšem, podle dalších výzkumů nebyla produkce EPS v růstovém mediu specificky spojena s přítomností proteinů kaseinu nebo syrovátky. Nicméně, Cerning a kol. (1990) zjistili, že kasein stimuluje produkci EPS a nepodporuje růst *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Další vhodné médium pro produkci EPS může být mléko obohacené glukózou nebo sacharózou. (Cerning et al., 1990) Například *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 nebo *Lactococcus lactis* produkuje podstatně větší množství EPS při kultivaci s glukózou nebo laktózou, než s fruktózou. Naopak u *Lactobacillus rhamnosus* C83 je nejučinnějším zdrojem uhlíku právě kombinace fruktózy a glukózy, ale také samotná manóza. (Gamar, Blondeau a Simonet, 1997) Stimulační účinek na biosyntézu EPS nemusí mít jen povaha zdrojů uhlíku a kombinace monosacharidů, ale i jejich koncentrace. Například, při kultivaci *Lactobacillus rhamnosus* C83 v chemicky definovaném mediu se 4 % manózy nebo 2 % glukózy a fruktózy (v poměru 1 : 1) se produkce EPS zvyšuje třikrát až čtyřikrát. (Degeest, Vaningelgem a De Vuyst, 2001, Gamar, Blondeau a Simonet, 1997)

Důležitou roli při produkci EPS hrají také zdroje uhlíku, dusíku a fosfátů. U některých bakterií (*Xanthomonas*, *Pseudomonas* a *Rhizobium* spp.) vede omezení dusíku ke zvýšené produkci EPS, to ale neplatí u bakterií mléčného kvašení. (de Vuyst et al., 1998) Bylo prokázáno, že optimální rovnost mezi zdrojem uhlíku a dusíku, je nezbytná pro dosažení vysokých výtěžků EPS. Bakterie mléčného kvašení jsou závislé na zdroji dusíku, neboť je nezbytný pro syntézu základních buněčných složek. Zatímco zdroj uhlíku, se přeměňuje na kyselinu mléčnou, čímž vzniká potřebná energie, ale zároveň syntetizuje také buněčnou stěnu a EPS. (Degeest, Vaningelgem a De Vuyst, 2001, Harutoshi, 2013, De Vuyst et al., 1998)

Mezi další složky média, které mohou ovlivňovat tvorbu EPS, jsou minerály, aminokyseliny a vitamíny. (Gamar, Blondeau a Simonet, 1997) Například médium obsahující kyselinu asparagovou, glutamovou nebo glycin, je vhodné pro růst již zmiňovaného *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Ve srovnání

s jinými bakteriemi mléčného kvašení (např. *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*) vyžaduje více aminokyselin. Ovšem vynechání jedné nebo dvou aminokyselin, nemá oproti růstu, žádný vliv na produkci EPS. Kyselina nikotinová (vitamin B₃), pantothenát vápníku (vitamin B₅ + soli vápníku) a riboflavin (vitamin B₂) jsou vitaminy nezbytné pro růst *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Nicméně, na rozdíl od zjištěných výsledků aminokyselin, mělo vynechání vitaminů výrazný vliv na zvýšení produkce EPS. Naopak vyloučení nukleové báze (adeninu), mělo za následek snížení produkce EPS zhruba o 50 %. (Grobben, Chin-Joe a Kitzen et al., 1998) Také bylo prokázáno, že soli Mn⁺² a Mg⁺² jsou hlavními růstovými faktory pro laktobacily (např. *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M) a podporují produkci EPS. (Gamar, Blondeau a Simonet, 1997)

Dalšími faktory, které mají vliv na výtěžek EPS, jsou teplota, pH, přítomnost kyslíku a inkubační doba. U *Lactobacillus sake* 0-1, který byl pěstován anaerobně při teplotě 20 ° C a pH 5,8, činila max. produkce EPS 1,40 g/l. Ovšem za použití ještě nižší teploty, se produkce EPS na 1 gram biomasy zvýšila z původních 600 mg při 20 ° C na 700 mg při 10 ° C, ale rychlost růstu buněk se snížila. (Vandenberg, Robijn a Janssen et al., 1995) Naopak *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR produkuje EPS, když se teplota pohybuje v rozmezí 36 - 39 ° C a pH 4,5 - 5,5. (Kimmel, Roberts a Ziegler, 1998) Gamar a kol. (1997) zjistili, že *Lactobacillus rhamnosus* C83 produkuje vyšší množství EPS při nižších teplotách, a to při 25 ° C než 30 ° C. (Gamar, Blondeau a Simonet, 1997) Stejně tak i u *Lactobacillus plantarum*, kultivovaném v syrovátce, byla produkce EPS vyšší při teplotě 25 ° C, než při 30 - 37 ° C. Pro maximální výnos produkce exopolysacharidů je tedy nezbytné zvážit nejen teplotu, ale i množství přítomných mikroorganismů, které EPS tvoří. (Harutoshi, 2013) Na produkci exopolysacharidů má také vliv aerobní a anaerobní prostředí. Bylo zjištěno, že vyšší výtěžky EPS jsou získány s nižším přístupem kyslíku nebo v anaerobním prostředí. (de Vuyst et al., 1998)

3 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ EXOPOLYSACHARIDŮ

Již před několika lety, byly bakteriální exopolysacharidy popisovány kvůli jejich strukturální variabilitě a fyzikálně-chemickým i biologickým vlastnostem. Přesto jsou jejich fyziologické funkce poměrně neznámé a jen málo z nich bylo využíváno pro průmyslové aplikace. I když jsou bakteriální EPS na trhu využívány minimálně a nejsou schopny konkurovat jiným zavedeným polysacharidům z rostlin či řas (např. xanthan, gelan), tak mohou nabídnout lepší kvalitu nebo čistotu. Účinnými a známými producenty polysacharidů, jsou právě bakterie mléčného kvašení. Jednou z těchto bakterií, je např. *Leuconostoc mesenteroides* vylučující homo-EPS dextran, který je komerčně využíván. Bohužel kvůli nízkým výtěžkům EPS, kterou produkuje většina druhů bakterií mléčného kvašení, nenacházejí obchodního využití. Nicméně jejich obrovská strukturální rozmanitost, nabízí a otevírá cesty k inovacím. (Badel, Bernardi a Michaud, 2011)

Bezpečný charakter laktobacilů přitahuje mnoho průmyslových odvětví, zejména průmysl potravinářský. Například *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* má široké využití v mlékárenském průmyslu. (Nwodo et al., 2012) Jsou označovány jako GRAS (tzn. obecně uznávané jako bezpečné) bakterie, což znamená, že jejich přítomnost v potravinách neohrožuje zdraví. EPS produkované laktobacily, se nejčastěji využívají u fermentovaných mléčných výrobků, pro jejich nepřímou úlohu v reologii produktu, ale také, pro jejich přínos pro zdraví spotřebitele. Ovšem nejprve spočívá úloha laktobacilů v tom, že během fermentace mléka, jsou zodpovědné za jeho acidifikaci (okyselení). (Badel, Bernardi a Michaud, 2011)

3.1 Využití v potravinářství

Některé bakterie mléčného kvašení, mají schopnost během fermentace mléka produkovat EPS. Toto zjištění se v posledních letech stalo fenoménem a EPS se začaly využívat zejména v mlékárenském průmyslu. (Rynne et al., 2008) Proto se kultury BMK produkující EPS běžně používají při výrobě fermentovaných mléčných výrobků a hrají klíčovou roli v reologii a struktuře vyrobených produktů. (Hassan et al., 2003)

3.1.1 Jogurty

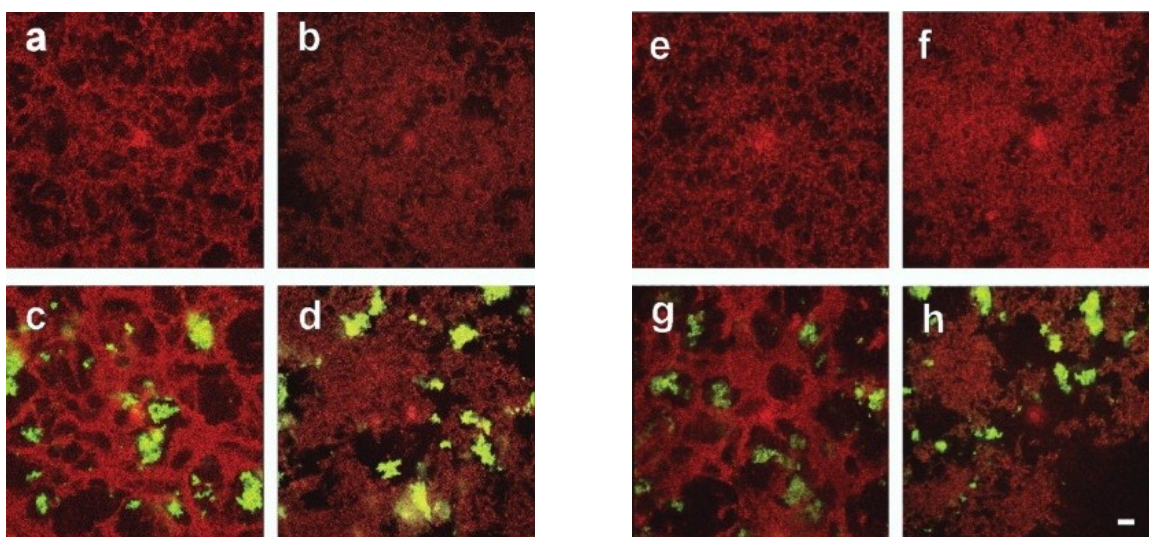
Principem výroby jogurtu je inokulace (naočkování) a následná fermentace (kvašení), nejčastěji kravského mléka bakteriemi mléčného kvašení. Nejběžnějšími mléčnými

bakteriemi jsou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*, které se používají společně jako kultura, v poměru 1:1. Jogurt může být vyráběn dvěma způsoby a to klasicky nebo tankově. Klasický způsob je takový, kdy mléko fermentuje přímo ve spotřebitelském obalu a tankový způsob probíhá tak, že fermentace probíhá ve velké nádrži a až poté se dávkuje do spotřebitelských obalů. Aby se dosáhlo potřebné konzistence a struktury, tak se do mnohých ochucených jogurtů resp. obecně ochucených kysaných mléčných výrobků přidávají zahušťovadla a stabilizátory (např. sušené odtučněné mléko nebo sušená syrovátka, modifikované škroby, pektin, želatina, karagenan a jiné). Bohužel tyto aditiva, mohou nepříznivě ovlivnit skutečnou chuť a vůni jogurtu. (Degeest, Vaningelgem a De Vuyst, 2001) Ovšem dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 se nesmí používat žádné přídatné látky do neochucených jogurtů resp. obecně neochucených kysaných mléčných výrobků. (QCM Copyright, ©2017)

Slibnou alternativou tedy je, použití jogurtových startovacích kultur, které obsahují kmeny produkující EPS. (Cerning, 1995) EPS, které se produkují *in situ* (tzn. inokulací mléka jogurtovou startérovou kulturou, která obsahuje kmeny produkující EPS), mají schopnost zadržovat vodu a tím se omezuje proces synereze (samovolnému vytékání kapaliny z gelu) v průběhu skladování výrobků. EXP se rovněž podílejí na zlepšení viskozity, která má vliv na konečnou strukturu výrobku. Spotřebitelé často žádají jogurt s vyšší viskozitou, ovšem se zvyšováním sušiny, rostou náklady na výrobu a tím se stává produkt dražším. Proto je jednou z alternativ využití kultur s produkcí EXP. Ty jsou schopny nahradit také tuk, a proto jejich použití může příznivě ovlivnit strukturu u jogurtů s nízkým obsahem tuku, který by mohl získat podobnou konzistenci, jako mají jogurty vyrobené z plnotučného mléka. (de Vuyst a Degeest, 1999)

Hassan a kol (2003) ve své studii uvádí, že jogurty vyrobené za použití EPS mají lepší viskozitu, strukturu a také jsou méně náchylné k synerezi, oproti jogurtům vyrobeným bez použití EPS, které vykazují nízkou viskozitu a struktura má tendenci být zrnitá. (Hassan et al., 2003, Duboc a Mollet, 2001) Na Obrázku 7 lze pozorovat rozdíly v mikrostruktuře jogurtů, které byly vyráběny z kmenů produkujících a neprodukujících EPS. Použitými kmeny byly *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Jogurt vyrobený bez přítomnosti EPS (kultura *Streptococcus thermophilus* CHCC2136, CHCC5842 a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC769), vykazoval homogenní strukturu s náhodně rozloženými malými dutinami a proteinová síť byla tvořena tenkými vlákny. Znázorněno na Obrázcích 7 (a, b, e, f). Kdežto u jogurtu

získaného z kmenů produkující EPS (kultura *Streptococcus thermophilus* CHCC3534, CHCC3541), byla struktura tvořena většími dutinami obsahujícími EPS a proteinová síť představovala silnější vlákna. Jak lze vidět na Obrázcích 7 (c, d, g, h). Rozdíly ve struktuře byly zachyceny také u jogurtu s míchaným koagulátem, které lze vidět na snímcích 7 (b, d, f, h) a nemíchaným koagulátem znázorněné na snímcích 7 (a, c, e, g). Na obrázku 7 je proteinová síť znázorněna červeně, EPS zeleně a tmavá barva poukazuje na přítomnost syrovátky. Z výsledků práce lze tedy konstatovat, že EPS mají pozitivní vliv i na strukturu jogurtů. (Hassan a kol 2003)



Obrázek 7: Mikrostruktura jogurtu znázorněná pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie. (Hassan a kol 2003)

Stabilizátory plní důležitou funkci, a to že zabraňují uvolňování syrovátky. Interagují s mléčnými složkami, jako jsou bílkoviny a mohou zvyšovat hladinu hydratace. Také vykazují zahušťovací vlastnosti, které zvyšují viskozitu. Využití potravinářských přídatných látek v potravinách je však regulováno nařízením 1333/2008. EPS mají tedy další důležitou funkci, kdy se používají jako přírodní zahušťovací činidla (s obdobnými vlastnostmi jako stabilizátory), ke zlepšení reologických vlastností jogurtu. Ovšem tato funkce závisí na množství, složení a struktuře EPS, ale i na interakci EPS s mléčnými složkami (zejména ionty a bílkovinami). (Duboc a Mollet, 2001) Bylo zjištěno, že kultury BMK obsahují různé koncentrace EPS, které produkují jednotlivé kmeny. Například *Streptococcus thermophilus* produkuje až 3000 mg/l, *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* až 2100 mg/l, *Lactobacillus casei* až 490 mg/l a *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* až 600 mg/l. (Cerning et al., 1990, Grobбен, Chin-Joe a Kitzen et al., 1998, Duboc a Mollet, 2001)

Další poznatek byl ten, že dva různé kmeny *Streptococcus thermophilus*, produkující stejné množství EPS s identickým složením a strukturou, ale s odlišnou molekulovou hmotností, mohou odlišně ovlivnit viskozitu jogurtů s rozmíchaným koagulátem. Proto různé kmeny produkující EPS, mohou zvyšovat viskozitu jogurtu jinak. (Faber et al., 1998)

3.1.2 Kefír

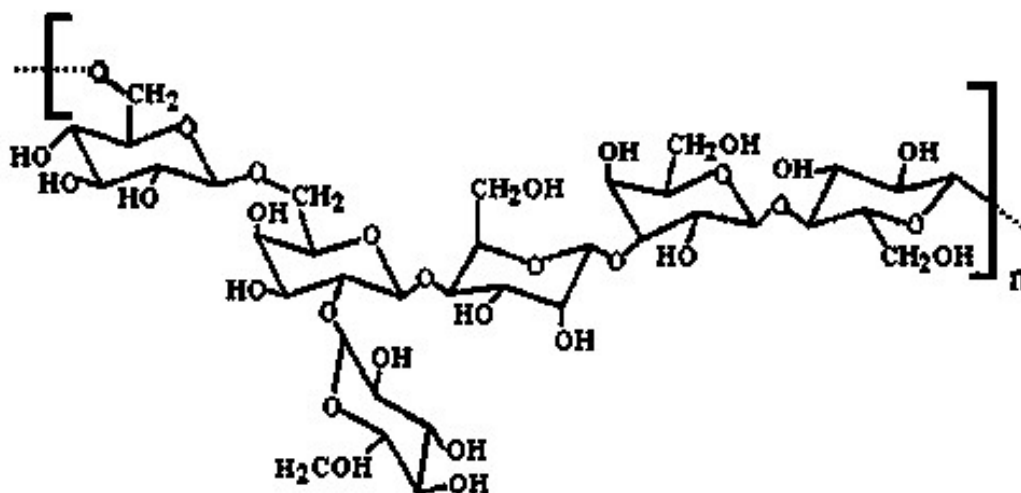
Kefír, stejně jako jogurt, zaujímá důležité místo ve východoevropských zemích. Tento nápoj se připravuje fermentací mléka po přidání kefírových zrn. Kefírová zrna, znázorněná na Obrázku 8, jsou kombinací bakterií a kvasinek, které jsou začleněny do polysacharidové matrice, obsahující bílkoviny, tuky a cukry.



Obrázek 8: Kefírová zrna

Přítomné mikroorganismy přeměňují mléčný cukr na kyselinu mléčnou, čímž vzniká kyselý, lehce perlivý a mírně alkoholický nápoj, který má konzistenci podobnou řídkému jogurtu. Pro přípravu se používá několik druhů mikroorganismů, kterými mohou být např. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir*, *Candida kefir*, *Saccharomyces* sp., a další.

(Badel, Bernardi a Michaud, 2011) Bylo zjištěno, že *Lactobacillus kefiranofaciens* produkuje exopolysacharid nazývaný kefiran, znázorněný na Obrázku 9.



Obrázek 9: Struktura kefiranu (Aptekarz Polski, ©2018)

Jeho podíl v kefirových zrnech je zhruba 45 % a je složen z D-glukózy a D-galaktózy v poměru 1:1. Jeho hlavní úlohou v kefirovém znu je, že chrání mikroorganismy před vysycháním. Zrna totiž mohou být sušeny a znovu použity pro další fermentaci mléka. Rimada a kol. (2006) provedli výzkum, kdy srovnávali reologické chování gelů z odstředěného mléka s obsahem a bez obsahu kefiranu. Gely neobsahující kefiran, vykazovaly nižší viskozitu, než gely s přídavkem kefiranu, který naopak viskozitu významně zvýšil. Výsledky tedy ukazují, že kefiran je schopen zlepšit viskozitu a viskoelastické vlastnosti kyselých gelů. Proto může být tento přírodní EPS použit jako alternativní zahušťovadlo, v mléčných výrobcích. (Rimada a Abraham, 2006)

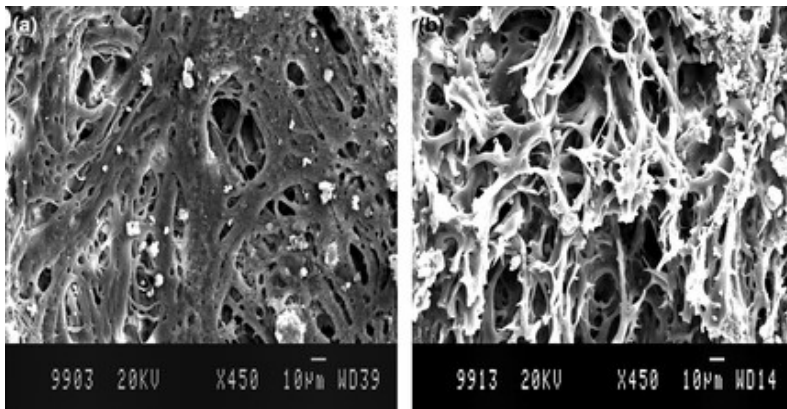
3.1.3 Sýry

Stále častěji se preferuje konzumace sýrů s nízkým obsahem tuku, ale zároveň je kladen požadavek na přijatelnou chuť a texturu sýrů. Ovšem u výroby těchto sýrů, dochází k vývoji pevné textury, která se nerozkládá během žvýkání, na rozdíl od sýrů, vyrobených z plnotučného mléka. Krémovitého pocitu v ústech a požadované textury, které poskytuje právě tuk, je možné dosáhnout zvýšením obsahu vlhkosti. Tyto problémy, které vznikají u nízkotučných sýrů, mohou vyřešit bakterie mléčného kvašení, produkující EPS. Jak již

bylo zmíněno u fermentovaných mléčných výrobků, jsou schopny plnit funkci zahušřovadel, stabilizátorů a napomáhat tak k dosažení požadovaných texturních vlastností. (Costa et al., 2010, Dabour et al., 2006)

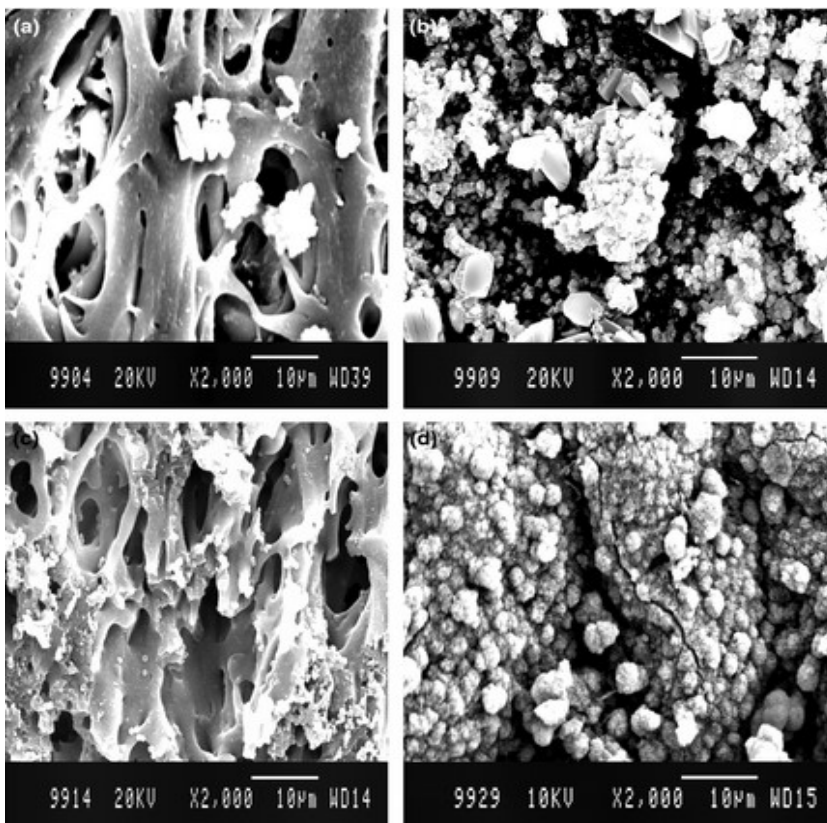
Touto problematikou se zabývali ve své studii Şanlı a kol., (2013), kdy posuzovali účinky EPS na fyzikálně-chemické vlastnosti u nízkotučného sýru kasar. K jeho výrobě použili *Streptococcus thermophilus* produkující EPS a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, který byl kombinován s *Lactobacillus helveticus* LH301. Jak se předpokládalo, tak snížení obsahu tuku vedlo k poklesu sušiny, vlhkosti a také obsahu soli, protože došlo ke ztrátě vody. Mírné zvýšení vlhkosti, bylo pozorováno u sýrů s kulturou produkující EPS, protože mají schopnost zadržet vodu v sířenině. Ztráty vody byly popsány i Dabourem a kol. (2006) u sýru čedar se sníženým obsahem tuku. U nízkotučného sýru kasar, který byl vyroben za nepřítomnosti EPS, byla textura tvrdší. Naopak za použití BMK produkující EPS, se stala textura měkčí. Tento poznatek byl zaznamenán také u Broadbent a kol. (2001). (Şanlı et al., 2013, Dabour et al., 2006, Broadbent et al., 2001)

Mikrostrukturu nízkotučných sýrů, lze vyšetřit za použití skenovací elektronové mikroskopie. Na Obrázcích 10 a 11 jsou definovány mikrofotografie sýrů kasar s kulturami produkujícími a neprodukujícími exopolysacharidy, kde jsou jasně vidět rozdíly v jejich mikrostruktuře. K pozoruhodným změnám v mikrostruktuře sýra za použití kultury produkující EPS, patří změna bílkovinné matrice. Jak můžeme vidět na Obrázcích 10 a 11a,11c, kdy je matrice v těchto sýrech více otevřená a je možné vidět houbovitou strukturu a také důkladně rozptýlené větší dutiny. Tyto dutiny mohou obsahovat větší množství vody. Hassan a kol. (2004) uvažovali, že otevřenou strukturu způsobuje přítomnost EPS. Mikrostruktura sýrů, které jsou vyrobeny za pomoci kultury neprodukující EPS, se skládá z klastrů (shluků) kaseinových micel spojených do tenké a těsné kaseinové sítě, která je znázorněna na Obrázku 11b a 11d. Tyto sýry jsou složeny z kaseinových agregátů, které mají nepravidelný tvar i velikost a zrnitý vzhled. Za výslednou strukturu a funkčnost sýrů jsou zodpovědné složky bílkovin a tuků. Ke zvýšení objemové frakce kaseinové matrice vedlo snížení obsahu tuku a k poklesu počtu objemových frakcí uzavřených tukových kuliček, jak můžeme vidět na Obrázku 10a. Takovéto sýry vykazovaly rozšířenou proteinovou matici, v níž bylo přítomno jen několik tukových kuliček. (Şanlı et al., 2013, Hassan et al., 2004)



Obrázek 10: Mikrofotografie sýrů kasar z elektronového mikroskopu (Şanlı et al., 2013)

a) nízkotučný sýr s 10 % obsahem tuku v sušině s kulturou produkující EPS b) nízkotučný sýr s 20 % obsahem tuku v sušině a kulturou produkující EPS



Obrázek 11: Mikrofotografie sýrů kasar z elektronového mikroskopu (Şanlı et al., 2013)

a) nízkotučný sýr s 10 % obsahem tuku v sušině s kulturou produkující EPS b) nízkotučný sýr s 10 % obsahem tuku v sušině s kulturou neprodukující EPS c) nízkotučný sýr s 20 % obsahem tuku v sušině s kulturou produkující EPS d) nízkotučný sýr s 20 % obsahem tuku v sušině s kulturou neprodukující EPS

Bylo zjištěno, že kultury produkující EPS, by mohly pomoci modifikovat a vylepšovat vlastnosti textury a to zejména u sýrů s 20 % obsahem tuku v sušině prostřednictvím snížení nežádoucí tuhosti. (Şanlı et al., 2013)

Ve studii Hassan a kol. (2004) použili dva izogenní kmeny *Streptococcus thermophilus*, pro výrobu sýru karish z odstředěného mléka. *Streptococcus thermophilus* CHCC3534 produkoval malé množství EPS a jeho genetická varianta, *Streptococcus thermophilus* CHCC5842 produkoval vyšší množství EPS. V této studii byly zjištěny významné rozdíly ve vlhkosti a viskoelastických vlastnostech sýra karish, které byly připisovány přítomnosti EPS. Podobný výzkum provedli i Costa a kol., (2010), který použil izogenní kmeny *Lactococcus lactis* DPC 6532 produkující EPS a *Lactococcus lactis* DPC 6533 neprodukující EPS, kterými chtěli zjistit přímý účinek EPS, na polotučný sýr čedar. Výsledkem bylo, že sýr vyrobený s kmenem produkující EPS, vykazoval vysokou úroveň táhlovitosti a také měl vyšší viskozitu, na rozdíl od sýru, který byl vyroben kmenem neprodukující EPS. Například Rynne a kol., (2008), zkoumali účinky kultury, produkující EPS (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 322), na koagulační vlastnosti mléka, při různých hodnotách pH a také synerezi výsledných gelů. Bylo zjištěno, že inokulace mléka kulturou produkující EPS, při pH 6,55 zlepšilo koagulační vlastnosti (zpevnění a ucelení sraženiny) a snížilo rychlost exprese syrovátky z výsledných gelů, na začátku synereze, kdy je uvolnění syrovátky nejvýraznější. Při nižších hodnotách pH (5,75 až 6,35) nedošlo k žádnému účinku. Tato studie poukazuje na to, že EPS mohou ovlivnit koagulační a syneretické vlastnosti mléčných gelů. (Hassan et al., 2004, Costa et al., 2010, Rynne et al., 2008)

Dalším, kdo se již dříve zabývali účinky EPS, byl Perry a kol. (1997). Jejich studie spočívala v tom, že zkoumali vliv EPS a jeho schopnost zadržovat vodu v nízkotučném sýru mozzarella. Pro výrobu nízkotučného sýru mozzarelly (6 %) použili jako výchozí kmeny *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, které produkují EPS. Jako kmeny neprodukující EPS, které použili pro výrobu kontrolního sýru, se staly *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Do startérových kultur, byly přidány i kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, produkující také EPS. Byly zjištěny významné rozdíly ve vlhkosti, stejně jako u předchozích studií (Hassan et al., 2004, Costa et al., 2010), kdy přítomnost EPS, také ovlivnila vlhkost daných sýrů. Obsah vlhkosti u sýrů mozzarella, které byly vyrobeny výchozími a vedlejšími kulturami produkujícími EPS, se zvýšil o 4 %. U použití

samotné startovací kultury produkující EPS se zvýšila vlhkost o 3 % oproti kontrolnímu sýru, kde nedošlo k žádnému rozdílu. Došlo i ke zvýšení obsahu tuku, což je přičítáno právě zvýšenému obsahu vlhkosti. (Perry, Mc Mahon a Oberg, 1997)

3.1.4 Další možnosti využití EPS v potravinářství

Polysacharidy, ať už z rostlinných zdrojů (např. škrob, arabská guma, karagenany) nebo mikrobiální polysacharidy, patří k důležitým přísadám, které se využívají v potravinářském průmyslu. Během fermentace potravin produkují bakterie mléčného kvašení EPS, které jsou schopné nahradit výše uvedená aditiva (např. arabská guma, karagenany). (de Vuyst a Degeest, 1999, Korakli et al., 2001) Běžně se EPS produkované mléčnými kulturami, aplikují v mlékárenském průmyslu, kde se využívají jejich prospěšné schopnosti, které byly zjištěny a popsány v několika publikacích. (Hassan et al., 2004, Duboc a Mollet, 2001, Şanlı et al., 2013) Jelikož zlepšují texturní vlastnosti a prodlužují trvanlivost, mohou být použity také při výrobě chleba. (Korakli et al., 2001)

Kmen *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 byl použit k přípravě tradičních pšeničných a žitných sourdoughs (těsto obsahující kulturu *Lactobacillus* a kvasinky). Tento kmen má schopnost produkovat EPS ze sacharózy, přičemž se jedná o vysokomolekulární homo-polymer fruktanu, typu levan. Použití sourdoughs, optimalizuje technologické a výživové vlastnosti chleba a také slizu EPS, vyprodukovaného lactobacili. Cílem této studie bylo stanovit metabolismus sacharózy a poskytnout důkaz že *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 je schopen během fermentace těsta produkovat EPS. Bylo zjištěno, že EPS vyprodukovaný *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 je složen převážně z fruktózy, kterou ovšem není schopen využívat jako zdroj uhlíku, ale přeměňuje ji na mannitol. Díky laktobacilům, které produkují EPS s převládajícím obsahem fruktanů, se naskýtá možnost, nahradit běžně používané rostlinné polysacharidy (např. modifikované škroby). Proto je možno uvažovat o použití laktobacilů produkujících EPS, protože mohou ovlivnit reologické vlastnosti, strukturu i trvanlivost chleba. Tato studie mohla otevřít nové pohledy na funkční potraviny z obilovin. (Korakli et al., 2001)

Další oblastí v potravinářském průmyslu, kde můžeme využít EPS, je produkce fermentovaných masných výrobků. Během procesu fermentace masa, dochází ke změnám sensorických vlastností a trvanlivosti, kdy probíhají biochemické i fyzikální pochody, za které jsou zodpovědné bakterie mléčného kvašení. Jedním oblíbeným fermentovaným masným výrobkem, který pochází z Turecka a v dnešní době je rozšířený i v Evropě, je tzv. sucuk (turecká fermentovaná klobása), kterou můžeme vidět na Obrázku 12.



Obrázek 12: Sucuk (turecká fermentovaná klobása), (Tsoft, ©2003-2017)

Tradiční výroba sucuku spočívala v tom, že se do směsi z jehněčího nebo hovězího masa, ocasního tuku, soli a koření nepřidávaly chemické přísady typu dusičnanů, dusitanů, kdy proces fermentace probíhal samovolně. Tato tradiční výroba byla modernizována a do směsi se zapojily antimikrobiální látky, antioxidanty a proces probíhal za řízených atmosférických podmínek, kdy fermentace probíhá určitou dobu pod kontrolovanou teplotou. (Bozkurt & Erkmen, 2002)

Snahou bylo vyrobit fermentovaný sucuk s pomocí EPS, za určitých teplot ($14 - 18\text{ }^{\circ}\text{C}$) a doby fermentace (8 – 16 hod.) specifické pro dané kmeny, kterými jsou *Lactobacillus plantarum* a *Leuconostoc mesenteroides*. U obou kmenů bylo zaznamenáno, že s prodloužením doby dozrání a teplotou fermentace se produkce EPS zvýšila a zároveň byla nejdůležitějším parametrem pro produkci EPS při výrobě sucuku. O něco vyšší produkci EPS vykazoval *Leuconostoc mesenteroides*, než *Lactobacillus plantarum* a jejich směs, během zkoušených podmínek fermentace. Rozdíl v produkci EPS mezi testovanými kmeny, může být způsoben vnějšími faktory, jako je teplota fermentace, protože kmeny mají odlišné teplotní požadavky a testované fermentační teploty se přibližují více mezofilním podmínkám. Důležitým faktorem, který může ovlivnit výrobu EPS, jsou také vnitřní vlastnosti a to genetický mechanismus *Leuconostoc mesenteroides* a

Lactobacillus plantarum. *Leuconostoc mesenteroides* produkuje homo-EPS, které obecně vykazují mnohem vyšší výtěžek, než je výtěžek hetero-EPS, který produkuje *Lactobacillus plantarum*. (de Vuyst a Degeest, 1999) Ze studie je zřejmé, že fermentační teplota je nejdůležitějším faktorem pro získání konečných výtěžků EPS, během fermentačního procesu při výrobě sucuku. (Enes, Tahsin a Berna; et al., 2016)

Dále byly zkoumány texturní vlastnosti a jedním z poznatků bylo, že přítomnost EPS vytvořila strukturu podobnou tkanivu a to díky síti EPS, která se utvořila v proteinech přítomných v testovaných vzorcích sucuku. Sucuk vyrobený za použití EPS, vykazoval tvrdší, méně lepkavou a tuší strukturu. Tato studie poukázala na význam fermentačních podmínek pro výslednou kvalitu sucuku a také objasnila funkční role produkce EPS během zrání sucuku. (Enes, Tahsin a Berna; et al., 2016)

3.2 Využití v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu

Některé bakteriální exopolysacharidy se vyznačují přirozenou biologickou kompatibilitou a také zdánlivou netoxickou povahou, které vedou k jejich využívání nejen v průmyslových odvětvích, ale také lékařských aplikacích. Tím se stávají atraktivnější, než polysacharidy, které získáváme z rostlin či řas. (Nwodo et al., 2012) Jedním z příkladů je bakteriální celulóza, která se používá jako stabilizátor emulzí v kosmetickém průmyslu nebo pro výrobu umělé kůže pro lékařské účely. (Badel, Bernardi a Michaud, 2011)

Zvýšenou pozornost získaly exopolysacharidy produkované bakteriemi mléčného kvašení tím, že mají pozitivní přínos pro naše zdraví. Některé bakterie (např. *L. acidophilus*, *L. casei*) se označují jako probiotika, což jsou živé mikrobiální složky potravin, které podporují lidské zdraví. (Nwodo et al., 2012) Zvláště byly zkoumány imunitní stimulace, antimutagenicita a protinádorová aktivita fermentovaných mléčných výrobků, které byly připraveny bakteriemi mléčného kvašení produkující nebo neprodukující EPS. (Kitazawa et al., 1998)

Například dextran produkovaný již zmíněným *Leuconostoc mesenteroides* byl použit k přípravě jedné z neúčinnějších náhrad plazmatu a používal se při šoku a ztrátě krve. Glykosaminoglykan heparin je léčivý přípravek používaný pro prevenci a léčbu tromboembolických poruch, ale jeho účinek je u pacientů s nedostatkem antitrombinu bezvýznamný a také s vedlejšími účinky, jako je krvácení a trombocytopenie. Proto je

předpokladem, že sulfátové formy alginátu poslouží jako alternativa se zvýšenou aktivitou. Mezi další terapeutické aktivity, které jsou připisované sulfátovým formám alginátu, patří například antikoagulační, anti-aterosklerotická, anti-metastatická, anti-angiogenetická či protizánětlivá. (deAngelis a White, 2002)

Novou příležitostí na využití v biotechnologiích, průmyslu nebo vývoji buněčné terapie a regenerační medicíny, popřípadě i jiných aplikací, mají mořské bakterie. Jedná se o objev nových polysacharidů, které nabízí rozmanitá mořská biosféra (např. hlubokomořské hydrotermální větrací otvory nebo antarktický mořský led). (Nwodo et al., 2012) Jednou zdravotně nezávadnou farmaceutickou přísadou (doplňkem stravy), byla používána *Spirulina*, která pro vegetariány a vegany představuje náhradu za proteinové přípravky ze živočišných zdrojů. *Spirulina platensis* produkuje spirulan sulfátovaný, což je polysacharid, u kterého bylo zjištěno, že působí jako inhibitor plicní metastázy, prevence adheze a také proliferace nádorových buněk. Další mořskou bakterií, která produkuje polysacharidy je *Vibrio diabolicus*. Její polysacharidy jsou podobné kyselině hyaluronové, mají schopnost obnovovat integritu kostí a na trhu jsou uváděny pod obchodním názvem "Hyalurift". (de Morais et al., 2010)

3.2.1 Léčba akné za pomoci nanočástic EPS

Acne vulgaris (akné) je chronické zánětlivé onemocnění mazových žláz, které se vyznačuje hyperkeratinizací a nadměrnou kolonizací *Propionibacterium acnes*. Na trhu jsou dostupná množství antibiotik, proti kterým jsou však kmeny akné odolné a navíc tyto medikamenty mohou způsobit vedlejší účinky. Díky tomu se zvýšila snaha nalézt přirozeně se vyskytující agents proti akné. Za posledních několik desetiletí získaly svou pozornost exopolysacharidy, které se vyznačují bioaktivními vlastnostmi, jakými jsou stabilita, biokompatibilita i biologická rozložitelnost. (Karlapudi, Kodali a Kota, 2016) EPS má schopnost pronikat do buněčné membrány bakterií a v místě, kde potlačuje mikrobiální růst, dochází k přerušení replikačního procesu bakterií. (Nwodo et al., 2012) Byla uskutečněna studie, kdy cílem bylo syntetizovat nanopartikulu na bakteriální bázi založenou na exopolysacharidech, která by sloužila jako stabilní biokompatibilní materiál pro podávání léků. (Karlapudi, Kodali a Kota, 2016)

Z lidské kůže a živné půdy, kterou byl tryptikázový sojový agar s 5 % ovčí krve, byla na Petriho misce izolována bakterie *Propionibacterium acnes*. Jako vzorek posloužila lidská kůže, která byla odebrána celkem 22 zdravým dobrovolníkům z obličeje. EPS byl získán extrakcí z biofilmu produkující *Acinetobacter sea*. Molekuly chitosanu, které projdou poly-elektrolytickou komplexací s polysacharidy, mohou za silného magnetického působení spontánně vytvořit nanočástice. Proto byly různé koncentrace roztoků EPS smíchány s roztokem chitosanu, aby došlo za silného magnetického působení ke vzniku nanočástic EPS. Rozhodující roli při tvorbě nanočástic hraje také koncentrace a pH roztoků chitosanu a EPS. Stabilní nanočástice se vytvořily, když pH roztoku chitosanu bylo 3 a roztok EPS měl pH přibližně 4,5. Při zvýšení, nebo snížení hodnot pH roztoků EPS a chitosanu, vedlo ke tvorbě sraženin. (Karlapudi, Kodali a Kota, 2016)

Akné může vyvolat psychické utrpení, jako jsou deprese a úzkost. Standartní orální a topické terapie, které jsou běžně podávány, mohou být doprovázeny vedlejšími účinky a to, podráždění kůže, gastrointestinální potíže či vývoj bakterií odolných proti lékům. Výzkumy naznačily, že většina pacientů hledá bezpečné alternativní terapie a právě EPS mohou být východiskem. Tím, že jsou doprovázeny bez vedlejších účinků, tak bylo snahou syntetizovat a vyhodnotit účinnost nanočásticového protizánětlivého krému, založeného na bázi EPS proti boji s *Propionibacterium acnes*. Tímto výzkumem a studií se otevřely nové cesty k dalšímu prozkoumání významné role nanočástic EPS, jako účinná a bezpečná topická léčba akné a také dalších souvisejících infekcích. (Karlapudi, Kodali a Kota, 2016)

3.3 Ostatní využití bakteriálních exopolysacharidů v průmyslu

Bylo objeveno a zdokumentováno mnoho typů exopolysacharidů. Pravděpodobně jen hrstka má průmyslový a lékařský význam s významnou komerční hodnotou, z hlediska jejich použití jako biomateriálů nebo modifikátorů reologie vodních systémů. Jsou to právě výrobní náklady, které způsobují omezení v používání některých bakteriálních polysacharidů. Kdežto naopak, unikátní vlastnosti EPS, které nenalezneme v jiných tradičních polysacharidech (řasy a rostliny), by se promítaly do aplikací s vysokou hodnotou, takže kvalita výrobků by překonala výrobní náklady. (Nwodo et al., 2012)

Například *Xanthomonas campestris* produkující xanthanovou gumu, je další bakterie, která má široké průmyslové využití. Mezi průmyslové aplikace, které mají rozsáhlé spektrum

oblastí, patří například potraviny, toaletní potřeby, kosmetika i barvy na vodní bázi. Právě vynikající reologické vlastnosti, které umožňuje xanthanová guma, se používají jako reologické kontrolní činidlo ve vodních systémech a také jako stabilizátor pro emulze a suspenze. (Roberts, 1996) Přidáním xanthanu k rovnoměrnému suspendování pevných složek, se v zemědělství zlepšila průtoková schopnost fungicidů, herbicidů i insekticidů. Reologické vlastnosti xanthanu přispěly také ke zlepšení pesticidů a jejich trvanlivosti. Také formulace nových generací termoplastů zahrnovala xanthanovou gumu, jelikož je vysoce šetrná k životnímu prostředí. Stejně tak i ropný průmysl používá xanthanovou gumu při těžbě ropy, vrtání nebo čištění potrubí. (Roberts, 1996) Především díky své vynikající kompatibilitě se solí a odolnosti proti tepelné degradaci, je užitečná také jako přísada do vrtných kapalin. (Nwodo et al., 2012)

Ačkoli se aplikace bakteriálních EPS využívají v oblastech jako je průmysl (textilní, mlékárenský), farmacie (léčivé přípravky a léčiva) a životní prostředí (flokulace, sanace), tak v procesu vložkování (čiření) bude jeho aplikace významným milníkem pro podporu zdraví i ekologického šetrného využití, zejména v komunálních procesech i procesech čištění odpadních vod. (Nwodo et al., 2012) Ve stanicích na úpravu vody se pro vložkování suspendovaných částic používají anorganické soli hliníku. Těmi jsou například síran hlinitý, polychlorid hliníku, organické syntetické polymery derivátů polyakrylamidu či polyethyleniminu. Bohužel těmito vložkovadly byly prokázány nepříznivé účinky na zdraví, kterými jsou neurotoxicita, karcinogenita a Alzheimerova choroba. Snahou a hnací silou tedy je, zkoumání vložkovacích vlastností některých exopolysacharidů i dalších biopolymerů a nalézt bezpečné alternativy. Vysokou účinnost vložkování zprostředkovávají biopolymery produkované *Virgibacillus* sp., *Artrobacter* sp. a *Bacillus* sp. Gilbert. (Cosa et al., 2011)

Je tedy zřejmé, že bakteriální exopolysacharidy mohou účinně zprostředkovávat flokulaci a být použity ve velkých průmyslových procesech, které se týkají úpravy vody nebo odpadních vod. (Nwodo et al., 2012)

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřená na různých možnostech využití exopolysacharidů, především ve fermentovaných mléčných výrobcích. Snahou bylo přiblížit jejich producenty, samotné složení a podmínky, za kterých mohou být získány. Pro tyto informace posloužilo několik studií, které pozorovaly různé bakterie mléčného kvašení a jejich schopnost, během fermentace produkovat extracelulární polymery. Další důležité poznatky se týkaly samotných exopolysacharidů a jejich významných vlastnostech, zejména pro potravinářský průmysl. Jejich přírodní nenahraditelný charakter, má schopnost pozitivně ovlivňovat texturu a konzistenci mléčných výrobků. Především u sýrů a jogurtů, se sníženým obsahem tuku, hrají zásadní roli při ovlivňování vlhkosti. Právě tuk je základem pro jemnější a chutnější konzistenci, kterou nízkotučné výrobky postrádají a musí být nahrazován aditivou. Exopolysacharidy však splňují požadavky, zvyšují vlhkost a zabraňují synerezi. Tím dodávají mléčným výrobkům strukturu a chuť takovou, jakou mají produkty vyráběné z plnotučného mléka. Zásadním faktorem je jejich zdravotní nezávadnost, která je důležitá nejen v potravinářském průmyslu, ale i v kosmetickém, odpadním a farmaceutickém. Proto otevírají nové pohledy a možnosti využití různými průmyslovými cestami.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDEL-WAHHAB, Mosaad A. et al., 2018. *Protective capabilities of silymarin and inulin nanoparticles against hepatic oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity of Deoxy-nivalenol in rats*. TOXICON, **142**, 1-13.

Aptekarz Polski, ©2018. In: [Http://www.aptekarzpolski.pl: /2010/03/03-2010-z-cyklu- napoje-fermentowane-kefir/](http://www.aptekarzpolski.pl: /2010/03/03-2010-z-cyklu- napoje-fermentowane-kefir/) [online]. [cit. 2018-04-21].

BADEL, S., T. BERNARDI a P. MICHAUD, 2011. *New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides*. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, **29**(1), 54-66.

BOBADE, V., M. CHEETHAM a J. HASHIM; ET AL., 2018. *Influence of gas injection on viscous and viscoelastic properties of Xanthan gum*. WATER RESEARCH, **134**, 86-91.

BOZKURT, H. a O. ERKMEN, 2002. *Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk)*. Meat Science, **61**, 149-156.

BROADBENT, J. R. et al., 2001. *Use of exopolysaccharide producing cultures to improve functionality of low fat cheese*. International Dairy Journal, **11**, 433–439.

CERNING, J. et al., 1990. *Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic-acidbacteria*. SCIENCES DES ALIMENTS, **10**(2), 443-451.

CERNING, J., 1990. *Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol. Lett., **87**, 113-130.

CERNING, J., 1995. *Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria*. LAIT, **75**(4-5), 463-472.

COSA, S. et al., 2011. *Bioflocculant production by Virgibacillus sp. Rob isolated from the bottom sediment of Algoa Bay in the Eastern Cape, South Africa*. Molecules, **16**, 2431–2442.

COSTA, N. E. et al., 2010. *Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of Lactococcus lactis on half-fat Cheddar cheese*. Journal of Dairy Science, **93**, 3469–3486.

COTE, G. L. a F. J. ROBYT, 1982. *Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRI B-1355 that synthesizes an alternating (1→6), (1→3)- α -D-glucan*. Carbohydr. Res., **101**, 57-74.

DABOUR, N. et al., 2006. *Improvement of texture and structure of reduced-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing Lactocci*. Journal of Dairy Science, **89**, 95–110.

- DE MORAIS, M. G. et al., 2010. *Preparation of nanofibers containing the microalga Spirulina (Arthrospira)*. *Bioresour. Technol.*, **101**, 2872–2876.
- DE VUYST, L. a B. DEGEEST, 1999. *Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiology Reviews*, **23**(2), 153-177.
- DE VUYST, L. et al., 1998. *Production by and isolation of exopolysaccharides from Streptococcus thermophilus grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis*. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 1059-1068.
- DE VUYST, L. et al., 2001. *Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria*. *Int. Dairy J.*, **11**, 687-707.
- DEANGELIS, P.L. a C.L. WHITE, 2002. *Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from Pasteurella multocida Type D*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7209–7213.
- DEGEEST, B., F. VANINGELGEM a L. DE VUYST, 2001. *Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria*. *INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*, **11**(9), 747-757.
- DUBOC, P. a B. MOLLET, 2001. *Applications of exopolysaccharides in the dairy industry*. *International Dairy Journal*, **11**(9), 759-768.
- ENES, D., Y. M. TAHSIN a T. N. BERNA; ET AL., 2016. *Effects of in situ exopolysaccharide production and fermentation conditions on physicochemical, microbiological, textural and microstructural properties of Turkish-type fermented sausage (sucuk)*. *Meat Science*, **121**, 156-165.
- FABER, E. J. et al., 1998. *The exopolysaccharides produced by Streptococcus thermophilus Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures*. *Carbohydrate Research*, **310**(4), 269-276.
- FÉR potravina, ©2018. In: <https://www.ferpotravina.cz:/seznam-ecek/E415> [online]. [cit. 2018-05-06].
- FÉR potravina, ©2018. In: <https://www.ferpotravina.cz:/seznam-ecek/E418> [online]. [cit. 2018-05-06].
- GAMAR, L., K. BLONDEAU a J. M. SIMONET, 1997. *Physiological approach to extracellular polysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus strain C83*. *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*, **83**(3), 281-287.

GANZLE, M. et al., 2005. *Exopolysaccharide production by intestinal lactobacilli*. Probiotics & Prebiotics: Scientific Aspects. Norfolk: Caister Academic Press., pp. 83-96.

GROBBEN, G. J., I. CHIN-JOE a V. A. KITZEN et al., 1998. *Enhancement of exopolysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus NCFB2772 with a simplified defined medium*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, **64**(4), 1333-1337.

HACCP, ©2009. <https://haccp.webnode.cz/:/sledovani-urovne-hygieny-v-potravinarskych-provozech/> [online]. [cit. 2018-04-19].

HARUTOSHI, Tsuda, 2013. *Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications*. Lactic Acid Bacteria - R. InTech. DOI: 10.5772/50839. ISBN 978-953-51-0955-6.

HASSAN, A. N. et al., 2003. *Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides*. J. Dairy Sci., **86**, 1632-1638.

HOIBY, Niels, Thomas BJARNSHOLT a Michael GIVSKOV; ET AL., 2010. *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, **35**, 322-332.

JUNG, Jin-Ho, Na-Young CHOI a Sun-Young LEE, 2013. *Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by Cronobactersakazakii depending on environmental conditions*. FOOD MICROBIOLOGY, **34**, 70-80.

KARLAPUDI, Abraham P., Vidya P. KODALI a Krishna P.; et al. KOTA, 2016. *Deciphering the effect of novel bacterial exopolysaccharide-based nanoparticle cream against Propionibacterium acnes*. 3 BIOTECH, **6**.

KIMMEL, S. A., R. F. ROBERTS a G. R. ZIEGLER, 1998. *Optimization of exopolysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus RR grown in a semidefined medium*. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 659-664.

KITAZAWA, H et al., 1998. *Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Int. J. Food Microbiol, **40**, 169-175.

KORAKLI, M. et al., 2003. *Exopolysaccharide and kestose production by Lactobacillus sanfranciscensis LTH2590*. Appl. Environ. Microbiol., **69**, 2073- 2079.

KORAKLI, M., A. ROSSMANN, GANZLE M. G. R., F. VOGEL, 2001. *Sucro-se metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by Lactobacillus sanfranciscensis*. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, **49**(11), 5194-5200.

KORAKLI, M., M. G. GANZLE a R. F. VOGEL, 2002. *Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by Lactobacillus sanfranciscensis*. J. Appl. Microbiol., **92**, 958-965.

NWODO et al., 2012. *Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects*. International Journal of Molecular Sciences, **13**(11), 14002-14015.

PEDERSON, C. S. a ALBURY M., 1955. *Variation among the heterofermentative lactic acid bacteria*. J. Bacteriol., **70**(6), 702-708.

PERRY, D.B., D.J. MC MAHON a C.J. OBERG, 1997. *Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat mozzarella cheese*. Journal of Dairy Science, **80**(5), 799-805.

PRAJAPATI, V. D. et al., 2013. *An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer*. ARBOHYDRATE POLYMERS, **93**(2), 670-678.

QCM Copyright, ©2017. [Http://www.szu.cz:/tema/bezpecnost-potravin/predpisy-eu-1](http://www.szu.cz:/tema/bezpecnost-potravin/predpisy-eu-1) [online]. [cit. 2018-05-06].

RIMADA, P. S. a A. G. ABRAHAM, 2006. *Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels*. International Dairy Journal, **16**(1), 33-39.

ROBERTS, I. S., 1996. *The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria*. Annu. Rev. Microbiol., **50**, 285–315.

RUIJSSENAARS, H., F. STINGELE a S. HARTMANS, 2000. *Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides*. Curr. Microbiol., **40**, 194-199.

RYNNE, N. M. et al., 2008. *Effect of a ropy-exopolysaccharide-producing culture on coagulation and synergetic properties of rennet-induced milk gels*. The Australian Journal of Dairy Technology, **63**(1), 3-7.

ŞANLI, T. et al., 2013. *The effect of using an exopolysaccharide-producing culture on the physicochemical properties of low-fat and reduced-fat Kasar cheeses*. International Journal of Dairy Technology, **66**(4), 535-542.

SAShE.sk, ©2009-2018. In: <https://www.sashe.sk:/MARIWA/detail/kefirove-zrna-domaci-kefir> [online]. [cit. 2018-04-21].

Tsoft, ©2003-2017. In: <http://www.gulersucuklari.com:/U22,8,parmak-sucukevlik-acilik-gucuk-guler.htm> [online]. [cit. 2018-04-29].

TSUDA, H., K. HARA a T MIYAMOTO, 2008. *Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum mutant strain 301102S*. J. Dairy Sci., **91**, 2960-2966.

VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H. et al., 1999. *Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the Lactobacillus reuteri wild-type strain and by mutant strains*. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 3008-3014.

VANDENBERG, D. J. C., G. W. ROBIJN a A. C. JANSSEN, et al., 1995. *Production of a novel extracellular polysaccharide by Lactobacillus-sace 0-1 and characterization of the polysaccharide*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, **61**(8), 2840-2844.

ZME Science, ©2007-2017. <https://www.zmescience.com:/science/what-are-biofilms/> [online]. [cit. 2018-04-19].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK Bakterie mléčného kvašení

EPS Exopolysacharid

Homo-EPS Homoexopolysacharid

Hetero-EPS Heteroexopolysacharid

GTF Glykosyltransferáza

FTF Fruktosyltransferáza

ATP Adenosintrifosfát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vznik biofilmu	14
Obrázek 2: Struktura, vazby a producenti glukánů	16
Obrázek 3: Struktura, vazby a producenti fruktanů	17
Obrázek 4: Molekulární struktura xanthanové gumy	19
Obrázek 5: Chemická struktura gellanové gumy	20
Obrázek 6: Syntéza dextransu pomocí glykosyltransferázy	21
Obrázek 7: Mikrostruktura jogurtu znázorněná pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie.	28
Obrázek 8: Kefírová zrna	29
Obrázek 9: Struktura kefiranu	30
Obrázek 10: Mikrofotografie sýrů kasar z elektronového mikroskopu	32
Obrázek 11: Mikrofotografie sýrů kasar z elektronového mikroskopu	32
Obrázek 12: Sucuk (turecká fermentovaná klobása)	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Některé role EPS v biofilmech	12
Tabulka 2: Kmeny produkující EPS a jejich monosacharidové složení	18