

WAYS FOR INCREASING THE EFFICIENCY OF TECHNOLOGIES FOR THE SYNTHESIS OF MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES. PART 1. ESTABLISHING OPTIMAL CONDITIONS FOR BIOSYNTHESIS

T. Pirog, A. Voronenko

National University of Food Technologies

Key words:

Microbial exopolysaccharides

Optimization of the biosynthesis process

Single-factor studies

Multivariate experiments

Article history:

Received 23.01.2023

Received in revised form

06.02.2023

Accepted 17.02.2023

Corresponding author:

T. Pirog

E-mail:

tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

Conducting experiments in which only one factor is varied is the easiest way to establish the optimal conditions of producer cultivation. Usually, in such studies, a consistent determination of the nature and concentration of the carbon and nitrogen source, pH, temperature, duration of cultivation, as well as the method of inoculum preparation is carried out. Such single-factor studies remain an effective tool for the initial determination of the most critical factors which cause the greatest impact on the biosynthesis process and require additional optimization.

Further optimization of producer cultivation conditions using multivariate studies involves the use of various methods of mathematical planning of experiments, one of which is the Plackett-Burman design, which allows determining the level of influence on the process of a large number of variables while conducting a smaller number of experiments.

For the combined analysis of factors which have the greatest influence on the process of exopolysaccharides biosynthesis, other more complex mathematical models are usually used, in particular, the Box-Wilson method, the central composite design, or the Box-Behnken design. A significant advantage of the Box-Behnken design is that it does not contain combinations for which all factors are at the highest or lowest levels at the same time.

The analyzed literature data of recent years regarding ways to increase the efficiency of microbial exopolysaccharides technologies proved the need to use an integrated approach to solve this problem. So, at the first stage, it is necessary to establish the optimal composition of the nutrient medium. At the same time, the most modern approach is to conduct multifactorial studies using complex mathematical models, which take into account the interrelationship of various studied factors and make it possible to more accurately establish the optimal conditions of the cultivation process, which ensure increasing the concentration of microbial exopolysaccharides by 2—10 times compared to that before optimization.

ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТЕХНОЛОГІЙ СИНТЕЗУ МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ. ЧАСТИНА 1. ВСТАНОВЛЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ БІОСИНТЕЗУ

Т. П. Пирог, А. А. Вороненко

Національний університет харчових технологій

Проведення експериментів, в яких одночасно здійснюється варіювання лише однією змінною, є найбільш простим способом встановлення умов культивування продуцента, максимально наближених до оптимальних. Зазвичай, у таких дослідженнях проводиться послідовне визначення природи та концентрації джерела вуглецю й азоту, рН, температури, тривалості культивування, а також способу підготовки посівного матеріалу. Такі однофакторні дослідження залишаються ефективним інструментом для первинного визначення найбільш критичних факторів, які спричиняють найбільший вплив на процес біосинтезу і потребують додаткової оптимізації.

Подальша оптимізація умов культивування продуцента з використанням багатофакторних досліджень передбачає використання різних методів математичного планування експериментів, одним з яких є дизайн Плакета-Бурмана, що дає змогу визначити рівень впливу на процес великої кількості змінних при проведенні меншої кількості експериментів.

Для комбінованого аналізу факторів, які спричиняють найбільший вплив на процес біосинтезу екзополісахаридів, зазвичай, використовують інші комплексні математичні моделі, зокрема метод Бокса-Вілсона, центральний композиційний план або дизайн Бокса-Бенкена. Суттєва перевага дизайну Бокса-Бенкена полягає в тому, що він не містить комбінацій, для яких усі фактори одночасно перебувають на найвищому або найнижчому рівні.

Проаналізовані літературні дані останніх років щодо шляхів підвищення ефективності технологій мікробних ЕПС засвідчили необхідність застосування комплексного підходу для вирішення цього завдання. Так, на першому етапі необхідним є встановлення оптимального складу поживного середовища. При цьому найбільш сучасним підходом є проведення багатофакторних досліджень з використанням комплексних математичних моделей, які враховують взаємозв'язок різних досліджуваних факторів і дають змогу більш точно встановити оптимальні умови процесу культивування, що забезпечують підвищення концентрації мікробних екзополісахаридів у 2—10 разів порівняно з такою до оптимізації.

Ключові слова: мікробні екзополісахариди, оптимізація процесу біосинтезу, однофакторні дослідження, багатофакторні експерименти.

Постановка проблеми. Щорічно у світі відкриваються нові та поглиблено досліджуються вже відомі продуценти мікробних екзополісахаридів (ЕПС) (Rühmann, Schmid, & Sieber, 2015; Zayed та ін., 2021). Значний інтерес до практично цінних полімерів зумовлений здатністю до змінення реологічних характеристик

водних систем і наявністю різноманітних біологічних властивостей (бактерицидна, протизапальна, протипухлинна тощо (Moscovici, 2015; Yildiz, & Karatas, 2018; Saadat, Khosroushahi, & Gargari, 2019; Chaisuwantha *ін.*, 2020), завдяки яким вони знаходять застосування в різноманітних галузях промисловості — від харчової до нафтопереробної (Donot, Fontana, Baccou, & Schott-Galindo, 2012; Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020).

Незважаючи на це, впродовж десятиліть в основному продовжують використовуватися одні й ті самі комерційно успішні біополімери (Freitas, Alves, & Reis, 2011; Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020). Так, обсяги виробництва лише одного найбільш відомого ЕПС ксантану становлять понад 6% від світового ринку мікробних полісахаридів (Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020). Решту між собою поділяють декстрин (Díaz-Montes, 2021), гелан (Fialho та *ін.*, 2008), альгінат (Ahmad Raus, Wan Nawawi, & Nasaruddin, 2021), леван (Srikanth та *ін.*, 2015), пулулан (Cheng, Demirci, & Catchmark, 2011), сукциноглюкан (Jeong, Kim, Hu, & Jung, 2022).

У той же час більшість нових мікробних ЕПС, окрім (Martins, Vieira, Gaspar, & Santos, 2014), продовжують перебувати на початкових стадіях фундаментальних досліджень і становлять виключно науковий інтерес (Zayed та *ін.*, 2021). Навіть наявність унікальних практично цінних властивостей (Roca, Alves, Freitas, & Reis, 2015; Saadat, Khosroushahi, & Gargari, 2019; Mohd Nadzir та *ін.*, 2021) не гарантує їхнього успішного промислового впровадження (Rana, & Upadhyay, 2020; Fukuda, & Kono, 2021). Основним лімітуючим фактором при цьому є висока собівартість цільового продукту, яка в біотехнологічному виробництві продуктів мікробного синтезу головним чином визначається кінцевою концентрацією полімеру, а також вартістю та ефективністю споживання джерела вуглецю (Freitas, Alves, & Reis, 2011; Rahman, Venkatachalam, & Karuppiiah, 2020).

Оптимізація біотехнологічних процесів є ефективним інструментом для зниження собівартості мікробних екзополісахаридів та підвищення їхнього виходу в процесі виробництва в промисловому масштабі, що загалом призводить до підвищення конкурентоспроможності на світовому ринку цих практично цінних полімерів (Rana, & Upadhyay, 2020). У контексті промислового виробництва навіть незначне підвищення показників синтезу цільового продукту або зниження його вартості може мати істотну фінансову вигоду, особливо в довгостроковій перспективі.

Відомо, що концентрація ЕПС значною мірою варіює залежно від умов культивування продуцента. При цьому власне процес культивування є складним і комплексним, а на його ефективність одночасно впливають ряд біологічних і фізико-хімічних факторів (Freitas, Alves, & Reis, 2011; Singh та *ін.*, 2017; Sengupta, Datta, & Biswas, 2018; Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020).

Умови культивування, за яких досягаються максимальні показники синтезу ЕПС, встановлюються індивідуально для кожного продуцента комбінацією фізико-хімічних факторів (природа і концентрація джерела вуглецю та азоту, співвідношення C/N, мінеральний склад поживного середовища, температура, pH, тривалість культивування, ефективність масообмінних процесів тощо) (Singh та *ін.*, 2017). Велика кількість факторів призводить до того, що оптимізація процесу не може обмежуватися варіюванням однією змінною або встановленням оптималь-

них значень виключно для одного фактора (Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020).

Для вирішення цього завдання необхідне проведення ґрунтовних експериментальних досліджень, які за підходом до планування можна умовно поділити на однофакторні, під час яких проводиться вивчення впливу параметрів одного фактора варіювання, та багатофакторні, коли одночасно досліджується взаємодія декількох факторів та їхній вплив на процес культивування (Franceschini, & Macchietto, 2008; Mandenius, & Brundin, 2008; Kumar, Bhalla, & Rathore, 2014).

Мета статті: узагальнення сучасних даних літератури про використання різних методів, що використовуються для встановлення оптимальних умов біосинтезу мікробних екзополісахаридів.

Матеріали і методи. Матеріалами дослідження стали сучасні наукові публікації зарубіжних учених у провідних періодичних і спеціалізованих світових виданнях, що стосуються підвищення ефективності технологій мікробних екзополісахаридів на основі одно- і багатофакторних експериментів для комплексної оптимізації умов процесу біосинтезу цільового продукту.

Викладення основних результатів дослідження. *Поетапна оптимізація біосинтезу полісахаридів з використанням однофакторних досліджень.* Проведення експериментів, в яких одночасно здійснюється варіювання лише однією змінною є найпростішим способом встановлення умов культивування, максимально наближених до оптимальних. Зазвичай, у таких дослідженнях проводиться послідовне визначення природи та концентрації джерела вуглецю й азоту, рН, температури та оптимальної тривалості культивування.

Так, Elova зі співавт. (Elova, Kutliyeva, Zakiryaeva, & Bektukhamedova, 2021) встановили, що оптимальним для синтезу ЕПС молочнокислими бактеріями *Lactobacillus plantarum* Eb-2 є проведення культивування при рН 5,5 та температурі 37 °С у середовищі з сахарозою (2%) та пептоном (1%) упродовж 48 годин. За таких умов культивування концентрація полісахариду була у 3,6 раза вищою за показники на базовому середовищі. Зазначимо, що при цьому для вирощування продуцента використовували середовище, приготоване на молочній сироватці, яке за рахунок наявності катіонів Mn^{2+} сприяє додатковому підвищенню біосинтетичної активності молочнокислих бактерій.

Схожі результати було отримано при дослідженні впливу складу поживного середовища (природи та концентрації джерела вуглецю та азоту), рН та температури на синтез полісахариду штамом *Bacillus* sp. ZBP4 (Ergene, & Avci, 2018). У результаті проведення однофакторних досліджень встановлено оптимальні значення досліджуваних факторів, при яких концентрацію ЕПС було підвищено у 7,5 раза порівняно з показниками до оптимізації.

У наведених вище працях (Ergene, & Avci, 2018; Elova, Kutliyeva, Zakiryaeva, & Bektukhamedova, 2021), незважаючи на істотне підвищення показників синтезу цільового продукту, концентрація отриманого полісахариду була незначною і становила ≈ 1 г/л. Від цих досліджень вигідно вирізняються дослідження (Hereher та ін., 2018; El-Ghonemy, 2021), в яких кількість синтезованих ЕПС досягала 8—26 г/л.

Hereher зі співавт. (Hereher та ін., 2018) проводили скринінг виділених з різних зразків ґрунту перспективних продуцентів мікробних полісахаридів. Встано-

влено, що серед 16 ізолятів бактерії *Micrococcus roseus* накопичували найбільшу кількість ЕПС (1,8 г/л). Під час подальшої оптимізації складу поживного середовища та умов культивування (рН, температура та тривалість процесу) концентрацію цільового продукту вдалося додатково підвищити до 8 г/л. У результаті подібного скринінгу зі зразків ґрунту було виділено штам *Aspergillus* sp. DHE6, який після оптимізації умов культивування впродовж 240 год вирощування на середовищі з глюкозою (4%) накопичував 26,1 г/л, що було у 3,6 раза вищим за вихідні показники на базовому середовищі (El-Ghonemy, 2021).

У праці (Petrova та ін., 2021) продемонстровано можливість інтенсифікації синтезу полісахаридів штамом *Bacillus licheniformis* 24 завдяки реалізації культивування з підживленням на оптимізованих середовищах з глюкозою або фруктозою у 4,9 та 3,3 раза відповідно. Показано, що оптимальний режим внесення субстратів залежав від використовуваного джерела вуглецю. Так, при рості на глюкозі одноразове внесення субстрату на 40 год вирощування приводило до підвищення кількості синтезованого полісахариду на 30%. У той же час при внесенні трьох додаткових порцій фруктози на 28, 36, 54 год культивування при рості штаму 24 в субстраті супроводжувалося підвищенням показників синтезу ЕПС лише на 12%.

Незважаючи на простоту планування та проведення однофакторних досліджень, вони мають ряд суттєвих недоліків, зокрема потребують значних трудовитрат і додаткових економічних витрат внаслідок необхідності проведення великої кількості експериментальних досліджень для належного оцінювання впливу кожного фактора та визначення його оптимальних значень.

Зважаючи на зазначене, ефективнішими є багатофакторні дослідження, які дають змогу не тільки одночасно вивчати вплив більшої кількості факторів при проведенні меншої кількості практичних робіт, а й враховують їх комбіновану взаємодію під час впливу на процес культивування (Baş, & Boyacı, 2007; Steinberg, & Bursztyn, 2010; Ibrahim, & Elkhidir, 2011).

Використання багатофакторних досліджень для комплексної оптимізації умов культивування. Для ефективної оптимізації умов культивування з використанням багатофакторних досліджень спершу доцільним є визначення найбільш критичних факторів, які потребують більш детального дослідження. Ефективним інструментом для вирішення цього завдання є використання методу математичного планування експериментів за планом (дизайном) Плакета-Бурмана, який дає змогу обчислити рівень впливу на процес великої кількості змінних при проведенні меншої кількості експериментів (Bhat, Vaid, Habib, & Bajaj, 2020). Зазначимо, що хоча дизайн Плакета-Бермана є зручним інструментом на початковому етапі оптимізації, проте він не враховує взаємодії, які можуть відбуватися між різними досліджуваними факторами (Oleksy-Sobczak, & Klewicka, 2020).

Зважаючи на це, для подальшого комбінованого аналізу факторів, які спричиняють найбільший вплив на процес, зазвичай, використовують інші більш комплексні математичні моделі, зокрема, метод Бокса-Вілсона (метод поверхні відгук) (Baş, & Boyacı, 2007; Steinberg, & Bursztyn, 2010; Ibrahim, & Elkhidir, 2011), метод Тагучі (Rao, Kumar, Prakasham, & Hobbs, 2008; Bhati, Baghel, & Singhal, 2021) тощо. При цьому для планування експериментів залежно від поставлених завдань, зазвичай, використовують центральний композиційний план або дизайн

Бокса-Бенкена (Ferreira та ін., 2007). Так, наприклад, план Бокса-Бенкена більш ефективний, ніж центральний композиційний дизайн при дослідженні впливу трьох факторів на вибрані відгуки. Ще одна перевага дизайну Бокса-Бенкена полягає в тому, що він не містить комбінацій, для яких усі фактори одночасно перебувають на найвищому або найнижчому рівні (Ferreira та ін., 2007). Таким чином, при плануванні досліджень можна уникнути проведення експериментів з використанням «крайніх» значень параметрів, за яких з високою ймовірністю будуть отримані незадовільні результати.

Незалежно від використаного для проведення досліджень підходу, першочерговим при проведенні оптимізації умов культивування є встановлення оптимального вмісту компонентів поживного середовища (Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020). Зазвичай, при цьому основними факторами варіювання є природа та концентрація джерела вуглецю та азоту, а також вміст мікро- та макроелементів, які можуть впливати на синтез ЕПС.

Зазначимо, що визначення оптимального складу поживного середовища у таких дослідженнях проводять з використанням однофакторних експериментів, з подальшим уточненням їхнього оптимального вмісту в багатфакторних експериментах.

Так, у праці (Vinothini, Latha, Arulmozhi, & Dhanasekaran, 2019) встановлено, що оптимальним джерелом вуглецю і азоту для *Streptomyces griseorubens* GD5 є галактоза та дріжджовий екстракт відповідно. За їх наявності у складі середовища концентрація ЕПС становила 4,8—5,2 г/л. У результаті подальшого встановлення оптимальної концентрації та співвідношення джерела вуглецю та азоту, а також уточнення вмісту мінеральних солей кількість синтезованого полісахариду було підвищено майже вдвічі (до 9,5 г/л).

При використанні аналогічного підходу для інтенсифікації синтезу ЕПС штамом *Klebsiella oxytoca* ICCF 419 після визначення оптимального співвідношення C/N (23,45) концентрацію цільового продукту було підвищено до 17,4—20,5 г/л (Tomulescu та ін., 2020).

Інші дослідники (Suryawanshi, Naik, & Eswari, 2019) продемонстрували здатність молочнокислих бактерій *Lactobacillus* sp. на середовищі з декстрозою синтезувати 60 г/л полісахариду. Зазначимо, що результати є дещо сумнівними, оскільки концентрація джерела вуглецю в середовищі культивування становила лише 1,5%, а прогнозований вихід ЕПС згідно з розробленою авторами моделлю на основі штучного інтелекту становив 30,17 г/л.

Dhagat зі співавт. (Dhagat, & Jujjavarapu, 2021) встановили, що найвищі показники одночасного синтезу полісахариду (17,6 г/л) та біоємультатора (6,1 г/л) штамом *Brevibacillus borstelensis* спостерігалися за наявності 2,2% глюкози, 1,4% глутамату натрію та 0,6% дріжджового екстракту в середовищі культивування. На основі отриманих результатів авторами з використанням штучного інтелекту було розроблено математичну модель, яку планується використати під час проведення часткової заміни компонентів поживного середовища на відходи агропромислового комплексу.

Проведення аналогічних досліджень описано у працях (Srinivas, Naga, & Padma, 2016; Moghannem, Farag, Shehab, & Azab, 2018; Rončević та ін., 2020). Так, Moghannem зі співавт. (Moghannem, & Farag, 2018) повідомили про синтез 7,9 г/л

ЕПС на середовищі з мелясою (12%). У праці (Srinivas, Naga, & Padma, 2016) досліджено можливість заміни сахарози та дріжджового екстракту на сік цукрової тростини та чорну чечевицю (урд) відповідно під час синтезу декстрану бактеріями *Weissella confusa*. У результаті проведення багатофакторних досліджень було не тільки встановлено можливість синтезу ЕПС на альтернативній сировині, а й досягнуто підвищення показників синтезу декстрану у 2,6 раза (до 33,5 г/л) порівняно з результатами, отриманими на базовому середовищі.

Інші дослідники (Gojgic-Cvijovic та ін., 2019) встановили, що для оптимального синтезу левану штамом *Bacillus licheniformis* NS032 на мелясі, необхідно спершу провести її комплексну обробку кислотою та активованим вугіллям. При цьому кількість синтезованого полісахариду (10,4 г/л) була у 4—5 разів нижчою, ніж за використання аналогічної концентрації сахарози (200 г/л). Під час подальшої оптимізації складу поживного середовища встановлено, що для досягнення максимальних показників синтезу левану (53,2 г/л) до обробленої меляси (12,5% за вуглеводами) необхідно додатково вносити сахарозу (7,5%) та фосфат (0,47%).

У той же час є повідомлення про синтез 80,1 г/л полісахариду штамом *Weissella confusa* XG-3 (Zhao та ін., 2020), якого було досягнуто після зниження вмісту сахарози (з 10% до 8%) та ацетату натрію (з 0,5% до 0,37%) в середовищі культивування та підвищення початкового рН культуральної рідини (з 5,5 до 5,8).

Під час оптимізації вмісту компонентів поживного середовища для синтезу ксантану штамом *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 встановлено, що найвища концентрація полісахариду (12,95 г/л) спостерігалася за наявності у середовищі культивування 3,3% гліцеролу, 0,055% пептону та 0,073% NH_4NO_3 (Rončević та ін., 2020). У той же час зниження концентрації джерела вуглецю до 1,6%, а також органічного та мінерального джерела азотного живлення до 0,018% та 0,067% відповідно, дало змогу знизити залишкову концентрацію гліцеролу та загального азоту в культуральній рідині на 73,77 та 58,9% відповідно, що суттєво спрощує виділення та очищення цільового продукту. При цьому концентрація ЕПС знижувалася лише на 9,19%.

Зазначимо, що встановлення оптимальних умов культивування продуцента ЕПС передбачає не лише уточнення оптимального вмісту компонентів середовища культивування, а й визначення параметрів культивування, за яких забезпечуються найвищі показники синтезу цільового продукту. Так, у праці (Ermiş, Poşraz, Dertli, & Yılmaz, 2020) продемонстровано, що оптимізація параметрів культивування (температура, рН і тривалість процесу) під час росту молочнокислих бактерій *Lactobacillus brevis* E25 на стандартному середовищі MRS з додаванням 1% сахарози приводило до підвищення синтезу ЕПС до 35 г/л.

Для штаму *Lactobacillus plantarum* SP8 температура і тривалість культивування разом з вмістом глюкози та дріжджового екстракту, спричиняли найбільший вплив на синтез ЕПС (Zhang, Zhao, Liu, Yang, 2020). Додаткове дослідження комплексної взаємодії даних факторів за допомогою методу Бокса-Вілсона сприяло підвищенню кількості синтезованого полісахариду у 18,7 раза порівняно з культивуванням на стандартному середовищі MRS.

У процесі культивування *Lactobacillus rhamnosus* MTCC 5462 на середовищі з глюкозою (1%) рівень впливу рН на синтез полісахариду був на 8% вищим, ніж вплив концентрації джерела азоту (Bhati, Baghel, & Singhal, 2021). Загалом, за оп-

тимальних умов культивування концентрація ЕПС досягала 10,7 г/л. Для інших представників молочнокислих бактерій, *Lactobacillus acidophilus* LA5 та *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, при вирощуванні на молочній сироватці, критичним виявилася концентрація джерела азоту (дріжджового екстракту), температура й тривалість процесу (Amirі та ін., 2019). Проте навіть за оптимальних умов культивування моно- чи змішаної культури продуцентів концентрація полісахаридів була дуже низькою і не перевищувала 0,19—0,35 г/л.

У праці (Bhat, Vaid, Habib, & Bajaj, 2020) досліджували комбінований вплив умов культивування (склад поживного середовища, тривалість вирощування, pH) на синтез ЕПС бактеріями *Enterococcus faecium* K1 та *Lactobacillus paracasei* M7. Незважаючи на те, що в результаті оптимізації показники синтезу полісахаридів штамів K1 та M7 було підвищено на 101,4% та 79,6% відповідно, концентрація цільового продукту залишалася незначною і не перевищувала 0,7 г/л.

Після встановлення оптимальних умов культивування дріжджів *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 на середовищі з сахарозою (2%) показники синтезу ЕПС підвищувались у 6 разів і досягали 4,86 г/л (Farinazzo, Fernandes, Mauro, & Garcia, 2021). Інші автори (Ragavan, & Das, 2019; Xiong, 2020) в результаті аналогічної оптимізації процесу встановили умови культивування *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 та *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17, при яких забезпечується синтез 2,89 та 50,56 г/л полісахаридів відповідно.

У ході дослідження синтезу ЕПС молочнокислими бактеріями *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0943, LOCK 0935 та OM-1 встановлено, що незалежно від штаму оптимальним джерелом вуглецю виявилася суміш фруктози (20 г/л), глюкози (20 г/л) та сахарози (20 г/л) (Oleksy-Sobczak, & Klewicka, 2020). У подальших дослідженнях впливу параметрів культивування встановлено, що оптимальні значення температури (25 °C), pH (5,7) та кількості внесеного посівного матеріалу (5%) є однаковими для трьох продуцентів. У той же час штам LOCK 0943 під час культивування потребував додаткової аерації (Oleksy-Sobczak, Klewicka, & Piekarska-Radzik, 2020).

Нао зі співавт. (Нао та ін., 2019) у послідовних дослідженнях впливу складу поживного середовища та параметрів культивування морських бактерій *Pseudoalteromonas agarivorans* Нао 2018 встановили умови, що забезпечували максимальний синтез ЕПС (2,6—3,0 г/л). Оптимізоване середовище культивування містило значну кількість (3,5%) морської солі, що, очевидно, зумовлене природнім місцем існування продуцента. У той же час у (Sun та ін., 2020) в ході дослідження синтезу ЕПС арктичним ізолятом *Polaribacter* sp. SM1127 встановлено можливість заміни 3% морської солі в середовищі культивування на значно меншу кількість NaCl (0,4%) без зниження показників синтезу цільового продукту (6,27 г/л). Під час подальшої реалізації культивування з підживленням концентрацію ЕПС було додатково підвищено у 3 рази (до 19,25 г/л).

Про досягнення високих показників синтезу полісахариду в результаті оптимізації умов культивування також повідомляється в праці (Окого та ін., 2021). Так, продемонстровано, що додавання 5,1% сахарози та 14,7% сульфату амонію під час вирощування *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16 на картопляно-декстрозному бульйоні (містить 2,4% декстрази) при pH 5 супроводжувалося синтезом 134,8 г/л полісахариду.

Узагальнені дані щодо факторів варіювання, досліджуваних під час встановлення оптимальних умов культивування, та показників синтезу полісахаридів за таких умов наведено в таблиці. Наведені дані свідчать про те, що оптимізація умов культивування продуцента забезпечує підвищення концентрації мікробних екзополісахаридів у середньому в 2—10 разів порівняно з такою до оптимізації.

Таблиця. Узагальнена характеристика факторів варіювання та показників синтезу мікробних полісахаридів за оптимальних умов культивування

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметра після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
<i>Aspergillus</i> sp. DHE6	Глюкоза, 4	Концентрація глюкози Концентрація дріжджового екстракту рН Температура Швидкість перемішування Тривалість культивування	4 % 0,15 % 6,0 30 °C 150 об/хв 240 год	7,2	26,1	El-Ghone-my, 2021
<i>Bacillus licheniformis</i> 24	Глюкоза, 20 (початкова концентрація)	Внесення глюкози на 40 год культивування	н/п	2,2—2,6	12,61	Petrova та ін., 2021
<i>Bacillus licheniformis</i> 24	Фруктоза, 20 (початкова концентрація)	Внесення фруктози на 28, 36, 54 год культивування	н/п	1,90—2,11	7,03	Petrova та ін., 2021
<i>Bacillus licheniformis</i> NS032	Бурякова м'яса, 12,5 (за вуглеводами) Сахароза, 7,5	Концентрація бурякової м'яси Концентрація сахарози Концентрація фосфату	12,5 (за вуглеводами) 7,5 0,47	10,4—10,9	53,2	Gojgic-Cvijovic та ін., 2019
<i>Bacillus</i> sp. ZBP4	Бурякова м'яса, 6 (за вуглеводами)	Концентрація м'яси Концентрація трипону рН Температура	6 % 0,5 % 5,0 45 °C	0,14	1,07	Ergene, & Avci, 2018
<i>Bacillus velezensis</i> KY471306	М'яса, 12 (за вуглеводами)	Концентрація м'яси Концентрація дріжджового екстракту Температура	12 % 0,6 % 30 °C	4,10	7,90	Moghannem, Farag, Shehab, & Azab, 2018

<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. lactis BB12	Лактоза, 4,64	Концентрація дріжджового екстракту Температура Тривалість культивування	2 % 38,2 °C 41,6 год	0,10	0,16	Amiri та ін., 2019
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Глюкоза, 2,2	Концентрація глюкози Концентрація глутамату Концентрація дріжджового екстракту Концентрація MgSO ₄	2,2 % 1,4 % 0,6 % 0,06 %	13,5 (ЕПС) 4,6 (біо-емульгатор)	17,6 (ЕПС) 6,1 (біо-емульгатор)	Dhagat, & Jujjavarapu, 2021
<i>Enterococcus faecium</i> K1	Лактоза, 1,07	Концентрація лактози Концентрація цитрату рН Тривалість культивування	1,07 % 0,25 % 5,4 94,05 год	0,36	0,72	Bhat, Vaid, Habib, & Bajaj, 2020
<i>Glutamicibacter halophytocola</i> KLBMP 5180	Мальтоза, 0,37	Концентрація мальтози Концентрація солодового екстракту Концентрація MnCl ₂ рН Температура Швидкість обертів	0,37 % 0,99 % 0,14 % 7,5 28 °C 200 об/хв	0,74	2,89	Xiong та ін., 2020
<i>Klebsiella oxytoca</i> ICCF 419	Лактоза, 3	Концентрація лактози Концентрація кукурудзяного екстракту Співвідношення C/N Концентрація KН ₂ РO ₄ Концентрація лимонної кислоти	3 % 1,34 % 23,45 0,1 % 0,1 %	15,0	17,4-20,5	Tomulescut та ін., 2020
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5	Лактоза, 4,64	Концентрація дріжджового екстракту Температура Тривалість культивування	2 % 42 °C 12 год	0,13	0,35	Amiri та ін., 2019

<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5 та <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12	Лактоза, 4,64	Концентрація дріжджового екстракту Температура Тривалість культивування	2 % 42 °C 24 год	0,08	0,19	Amiri та ін., 2019
<i>Lactobacillus brevis</i> E25	Сахароза, 1 Глюкоза, 2	pH Температура Тривалість культивування	6,5 35 °C 18 год	10,0	35,0	Ermis, Poyraz, Dertli, & Yilmaz, 2020
<i>Lactobacillus paracasei</i> M7	Глюкоза, 1	Концентрація глюкози pH Тривалість культивування	1 % 7,6 48 год	0,38	0,68	Bhat, Vaid, Habib, & Bajaj, 2020
<i>Lactobacillus plantarum</i> Eb-2	Сахароза, 2	Концентрація сахарози Концентрація пептону pH Температура Тривалість культивування	2 % 1 % 5,5 37 °C 48 год	0,25	0,91	Elova, Kutliyeva, Zakiryaeva, & Bekmukhamedova, 2021
<i>Lactobacillus plantarum</i> SP8	Глюкоза, 2,2	Концентрація глюкози Концентрація дріжджового екстракту Температура Тривалість культивування	2,2 % 3 % 35,6 °C 22 год	0,09	0,28	Zhang, Zhao, Liu, & Yang, 2020
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0935	Фруктоза, 2 Глюкоза, 2 Сахароза, 2	Концентрація фруктози Концентрація глюкози Концентрація сахарози Концентрація дріжджового екстракту Інокулят pH Температура Тривалість культивування	2 % 2 % 2 % 0,4 % 5 % 5,7 25 °C 24 год	0,1	0,9	Oleksy-Sobczak, & Klewicka, 2020; Oleksy-Sobczak, Klewicka, & Piekarska-Radzik, 2020
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0943	Фруктоза, 2 Глюкоза, 2 Сахароза, 2	Концентрація фруктози Концентрація глюкози Концентрація сахарози Інокулят pH Температура Тривалість культивування Швидкість перемішування	2 % 2 % 2 % 5 % 5,7 25 °C 30 год 80 об/хв	0,09	1,14	Oleksy-Sobczak, Klewicka, 2020; Oleksy-Sobczak, Klewicka, & Piekarska-Radzik, 2020

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MTCC 5462	Глюкоза, 1	Концентрація глюкози Концентрація цитрату Кількість інокуляту pH Температура	1 % 0,3 % 3 % 7,0 37 °C	1,1—1,3	10,7	Bhati, Baghel, & Singhal, 2021
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> OM-1	Фруктоза, 2 Глюкоза, 2 Сахароза, 2	Концентрація фруктози Концентрація глюкози Концентрація сахарози Кількість інокуляту pH Температура Тривалість культивування	2 % 2 % 2 % 5 % 5,7 25 °C 24 год	0,13	0,99	Oleksy-Sobczak, & Klewicka, 2020; Oleksy-Sobczak, Klewicka, & Piekarska-Radzik, 2020
<i>Lactobacillus</i> sp.	Глюкоза, 1,5	Концентрація глюкози Концентрація цитрату амонію Концентрація NaH ₂ PO ₄ Концентрація KH ₂ PO ₄ Концентрація MgSO ₄	1,5 % 0,15 % 0,3 % 0,25 % 0,025 %	10,0	60,0	Suryawan-shi, Naik, & Eswari, 2019
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> JF17	Сахароза, 18	Концентрація сахарози pH Температура	18 % 7,3 20 °C	9,8—10,6	50,56	Farinazzo, Fernandes, Mauro, & Garcia, 2021
<i>Lipomyces starkeyi</i> VIT-MN03	Сахароза, 2	Концентрація сахарози Концентрація NaCl pH Температура Тривалість культивування	2 % 3 % 4 25 °C 720 год	0,82	4,86	Ragavan, & Das, 2019
<i>Micrococcus roseus</i>	Сахароза, 4,5	Концентрація сахарози Концентрація (NH ₄) ₂ SO ₄ Температура Тривалість культивування	4,5 % 0,02 % 25 °C 96 год	1,8	8,0	Hereher та ін., 2018

<i>Polaribacter</i> sp. SM1127	Сахароза, 3,65 (початкова концентрація)	Внесення сахарози на 72, 96, 120 год культивування Концентрація пептону Концентрація дріжджового екстракту Концентрація NaCl Кількість інокуляту рН Температура Тривалість культивування	3,65 % 0,94 % 0,5 % 0,4 % 2 % 7,5 11,25 °C 144 год	2,11	19,25	Sun та ін., 2020
<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> Hao 2018	Глюкоза, 3	Концентрація глюкози Концентрація дріжджового екстракту Концентрація морської солі Кількість інокуляту Температура Швидкість перемішування Тривалість культивування	3 % 0,45 % 3,5 % 8,79 % 25 °C 171 об/хв 33,78 год	0,55—1,1	2,6—3,0	НАО та ін., 2019
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> sp. GUMS16	Сахароза, 5,1 Глюкоза, 2,4	Концентрація сахарози Концентрація (NH ₄) ₂ SO ₄ рН	5,1 % 14,7 % 5	68,4—81,3	134,8	Okoro та ін., 2021
<i>Streptomyces griseorubens</i> GD5	Галактоза, 0,75	Концентрація галактози Концентрація дріжджового екстракту Концентрація NaCl Концентрація суміші мікро- та макроелементів	0,75 % 0,25 % 0,2 % 10 мл/л	4,65	9,50	Vinothini, Latha, Arulmozhi, & Dhanasekaran, 2019

<i>Weissella confusa</i>	Сік цукрової тростини, 5	Концентрація соку цукрової тростини Концентрація чорної чечевиці (ураду) Концентрація $MgCl_2$ Концентрація $MgSO_4$ Концентрація K_2HPO_4	5 % 2,5 % 0,25 % 0,25 % 2,5 %	13,0	33,5	Srinivas, Naga & Padma, 2016
<i>Weissella confusa</i> XG-3	Сахароза, 8	Концентрація сахарози Концентрація ацетату рН	8 % 0,37 % 5,8	33,6	97,5	Zhao та ін., 2020
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951	Гліцерол, 1,6	Концентрація гліцеролу Концентрація пептону Концентрація NH_4NO_3	1,6 % 0,02 % 0,07 %	7,98	11,25	Rončević та ін., 2020

Висновки

Проаналізовані літературні дані останніх років щодо шляхів підвищення ефективності технологій мікробних ЕПС засвідчили необхідність застосування комплексного підходу для вирішення цього завдання. Так, на першому етапі необхідним є встановлення оптимального складу поживного середовища (природа та концентрація джерела вуглецю та азоту, мінеральних солей та інших компонентів) та умов культивування (рН, температура, тривалість процесу тощо) продуцента. При цьому найбільш ефективним підходом є проведення багатофакторних досліджень з використанням комплексних математичних моделей (метод Бокса-Вільсона, метод Тагучі та ін.), що враховують взаємозв'язок різних досліджуваних факторів і дають змогу більш точно встановити оптимальні умови процесу біосинтезу цільового продукту.

У той же час однофакторні дослідження в комплексі із сучасними дизайнами проведення експериментальних досліджень (наприклад, Плакета-Бурмана) залишаються ефективним інструментом для первинного визначення найбільш критичних факторів, які спричиняють найбільший вплив на процес і потребують додаткової оптимізації.

Література

Ahmad Raus, R., Wan Nawawi, W. M. F., Nasaruddin, R. R. (2021). Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 280—306. doi: 10.1016/j.ajps.2020.10.001.

Amiri, S., Rezaei Mokarram, R., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M. (2019). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12: optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 752—765. doi: 10.1016/

j.ijbiomac.2018.11.084.

Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari, F. M., Molina, G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475—1495. doi: 10.1080/10408398.2019.1575791.

Baş, D., Boyaci, I. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836—845. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.

Bhat, B., Vaid, S., Habib, B., Bajaj, B. K. (2020). Design of experiments for enhanced production of bioactive exopolysaccharides from indigenous probiotic lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 57(5), 539—551.

Bhati, A., Baghel, A. K., Singhal, B. (2021). Optimization of culture conditions for eps production in *Lactobacillus rhamnosus* MTCC 5462 through Taguchi design methodology. In: *Proceedings of International Conference on Scientific and Natural Computing*, 253—260. doi: 10.1007/978-981-16-1528-3_22.

Chaisuwan, W., Jantanasakulwong, K., Wangtueai, S., Phimolsiripol, Y., Chaiyasot, T., Techapun, C. et al. (2020). Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: fermentation, modifications and bioactivities. *Food Bioscience*, 35:100564. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100564>.

Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, J. M. (2011). Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 29—44. doi: 10.1007/s00253-011-3477-y.

Dhagat, S., Jujavarapu, S. E. (2021). Simulated annealing and artificial neural network as optimization tools to enhance yields of bioemulsifier and exopolysaccharides by thermophilic *Brevibacillus borstelensis*. *The Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4):105499. doi: 10.1016/j.jece.2021.105499.

Díaz-Montes, E. (2021). Dextran: sources, structures, and properties. *Polysaccharides*, 2(3), 554—565. doi: 10.3390/polysaccharides2030033.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951—962. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083.

El-Ghonemy, D. H. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of exopolysaccharides produced by a novel *Aspergillus* sp. DHE6 under optimized submerged fermentation conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36:102150. doi: 10.1016/j.bcab.2021.102150.

Elova, N., Kutliyeva, G., Zakiryaeva, S., Bekmukhamedova, N. (2021). Optimization of cultivation conditions for increasing the production of exopolysaccharides of the *Lactobacillus plantarum* Eb-2 strain. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 8(5), 8689—8697.

Ergene, E., Avci, A. (2018). Effects of cultural conditions on exopolysaccharide production by *Bacillus* sp. ZBP4. *The Journal of Agricultural Science*, 24, 386—393. doi: 10.15832/ankutbd.456666.

Ermiş, E., Poyraz, E., Dertli, E., Yilmaz, M. T. (2020). Optimization of exopolysaccharide production of *Lactobacillus brevis* E25 using RSM and characterization. *Sakarya University Journal of Science*, 24(1), 151—160. doi: 10.16984/saufenbilder.545929.

Farinazzo, F. S., Fernandes, M. T. C., Mauro, C. S. I., Garcia, S. (2022). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from native Atlantic Forest juçara fruit. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Vol. 52. Iss. 3, 245—252. doi: 10.1080/10826068.2021.1931880.

Ferreira, S. L., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C. et al. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179—186. doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011.

Fialho, A. M., Moreira, L. M., Granja, A. T., Popescu, A. O., Hoffmann, K., Sá-Correia, I. (2008). Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 889—900. doi: 10.1007/s00253-008-1496-0.

Franceschini, G., Macchietto, S. (2008). Model-based design of experiments for parameter precision: state of the art. *Chemical Engineering Science*, 63(19), 4846—4872. doi: 10.1016/j.ces.2007.11.034.

Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388—398. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008.

Fukuda, K., Kono, H. (2021). Cost-benefit analysis and industrial potential of exopolysaccharides. In: Nadda A. K., K. V. S. Sharma S. (eds) *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials*. Springer Series on Polymer and Composite Materials. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-75289-7_12.

Gojic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Loncarevic, B. D., Todorovic, N. M., Pergal, M. V., Ciric, J. et al. (2019). Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International Journal of Biological Macromolecule*, 121, 142—151. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019.

Gu, Y., Zheng, J., Feng, J., Cao, M., Gao, W., Quan, Y. et al. (2017). Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4163—4174. doi: 10.1007/s00253-017-8171-2.

Gupta, J., Rathour, R., Dupont, C. L., Kaul, D., Thakur, I. S. (2021). Genomic insights into waste valorized extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Bacillus* sp. ISTL8. *Environmental Research*, 192:110277. doi: 10.1016/j.envres.2020.110277.

Han, H. M., Kim, I. J., Yun, E. J., Lee, J. W., Cho, Y., Jin, Y. S. et al. (2021). Overproduction of exopolysaccharide colanic acid by *Escherichia coli* by strain engineering and media optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 111—127. doi: 10.1007/s12010-020-03409-4.

Hao, L., Liu, W., Liu, K., Shan, K., Wang, C., Xi, C. et al. (2019). Isolation, optimization of fermentation conditions, and characterization of an exopolysaccharide from *Pseudoalteromonas agarivorans* Hao 2018. *Marine Drugs*, 17(12):703. doi: 10.3390/md17120703.

Hereher, F., El Fallal, A., Abou-Dobara, M., Toson, E., Abdelaziz, M. M. (2018). Cultural optimization of a new exopolysaccharide producer "*Micrococcus roseus*". *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4), 632—639. doi: 10.1016/j.bjbas.2018.07.007.

Ibrahim, H. M., Elkhidir, E. E. (2011). Response surface method as an efficient tool for medium optimisation. *Trends in Applied Sciences Research*, 6(2), 121—129. doi: 10.3923/tasr.2011.121.129.

Jeong, J. P., Kim, Y., Hu, Y., Jung, S. (2022). Bacterial succinoglycans: structure, physical properties, and applications. *Polymers (Basel)*, 14(2):276. doi: 10.3390/polym14020276.

Kumar, V., Bhalla, A., Rathore, A. S. (2014). Design of experiments applications in bioprocessing: concepts and approach. *Biotechnology Progress*, 30(1), 86—99. doi: 10.1002/btpr.1821.

Mandenius, C. F., Brundin, A. (2008). Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*, 24(6), 1191—1203. doi: 10.1002/btpr.67. PMID: 19194932.

Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Marine Drugs*, 12(2), 1066—1101. doi: 10.3390/md12021066.

Moghannem, S. A. M., Farag, M. M. S., Shehab, A. M., Azab, M. S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *The Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 452—462. doi: 10.1016/j.bjm.2017.05.012.

Mohd Nadzir, M., Nurhayati, R. W., Idris, F. N., Nguyen, M. H. (2021). Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: a review. *Polymers (Basel)*, 13(4):530. doi: 10.3390/polym13040530.

Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6:1012. doi: 10.3389/fmicb.2015.01012.

Okoro, O. V., Gholipour, A. R., Sedighi, F., Shavandi, A., Hamidi, M. (2021). Optimization of exopolysaccharide (EPS) production by *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16. *Chemical Engineering*, 5(3):39. doi: 10.3390/chemengineering5030039.

Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E. (2020). Optimization of media composition to maximize the yield of exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 774—783. doi: 10.1007/s12602-019-09581-2.

Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E., Piekarska-Radzik, L. (2020). Exopolysaccharides production

by *Lactobacillus rhamnosus* strains — optimization of synthesis and extraction conditions. *LWT — Food Science and Technology*, 122:109055. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109055.

Petrova, P., Arsov, A., Ivanov, I., Tsigoriyna, L., Petrov, K. (2021). New Exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* 24 display substrate-dependent content and antioxidant activity. *Microorganisms*, 9(10):2127. doi: 10.3390/microorganisms9102127.

Ragavan, M. L., Das, N. (2019). Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. *Annals of Microbiology*, 69, 515—530. doi: 10.1007/s13213-019-1440-9.

Rahman, S. S. A., Venkatachalam, P., Karuppiyah, S. (2020). Cost-effective production of dextran using *Saccharum officinarum* juice (SOJ) as a potential feedstock: downstream processing and characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1—13. doi: 10.1007/s13399-020-00926-4.

Rana, S., Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 577—583. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084.

Rao, R. S., Kumar, C. G., Prakasham, R. S., Hobbs, P. J. (2008). The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnology Journal*, 3(4), 510—523. doi: 10.1002/biot.200700201.

Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., Reis, M. A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in Microbiology*, 6:288. doi: 10.3389/fmicb.2015.00288.

Rončević, Z., Bajić, B., Vlajkov, V., Dodić, S., Grahovac, J., Jokić, A. et al. (2020). Optimisation of xanthan production on glycerol-based medium using response surface methodology. *The Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 37(4), 617—627. doi: 10.1007/s43153-020-00062-6.

Rühmann, B., Schmid, J., Sieber, V. (2015). High throughput exopolysaccharide screening platform: from strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day. *Carbohydrate Polymers*, 122, 212—220. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.021.

Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y., Gargari, B. P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 217, 79—89. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025.

Sengupta, D., Datta, S., Biswas, D. (2018). Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1587—1598. doi: 10.1007/s00253-018-8745-7.

Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C. K. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7:2087. doi: 10.3389/fmicb.2016.02087.

Srikanth, R., Reddy, C. H., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102—114. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.003.

Srinivas, B., Naga Padma, P. (2016). Statistical optimization of medium components by response surface methodology for dextran production by *Weissella confusa*. *International Journal of Sciences and Applied Research*, 3(2), pp. 47—57.

Steinberg, D. M., Bursztyn, D. (2010). Response surface methodology in biotechnology. *Quality Engineering*, 22, 78—87. doi: 10.1080/08982110903510388.

Sun, M. L., Zhao, F., Zhang, X. K., Zhang, X. Y., Zhang, Y. Z., Song, X. Y. et al. (2020). Improvement of the production of an Arctic bacterial exopolysaccharide with protective effect on human skin cells against UV-induced oxidative stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4863—4875. doi: 10.1007/s00253-020-10524-z.

Suryawanshi, N., Naik, S., Eswari, J. S. (2019). Extraction and optimization of exopolysaccharide from *Lactobacillus* sp. using response surface methodology and artificial neural networks. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(10), 987—996. doi: 10.1080/10826068.2019.1645695.

Tomulescu, C., Moscovici, M., Stoica, R. M., Albu, G. B., Sevcenco, C., Vamanu, A. (2020). Inves-

tigation of culture conditions by Response Surface Methodology and kinetic modeling for exopolysaccharide production by *Klebsiella oxytoca* ICCF 419 strain, using lactose as substrate. *Romanian Biotechnological Letters*, 25(6), 2033—2044. doi: 10.25083/rbl/25.6/2033.2044.

Vinothini, G., Latha, S., Arulmozhi, M., Dhanasekaran, D. (2019). Statistical optimization, physiochemical and bio-functional attributes of a novel exopolysaccharide from probiotic *Streptomyces griseorubens* GD5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 575—587. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.011.

Xiong, Y. W., Ju, X. Y., Li, X. W., Gong, Y., Xu, M. J., Zhang, C. M. et al. (2020). Fermentation conditions optimization, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides obtained from the plant growth-promoting endophytic actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 1176—1185. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.247.

Yildiz, H., Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41—46. doi: 10.1016/j.procbio.2018.06.009.

Zayed, A., Mansour, M. K., Sedeek, M. S., Habib, M. H., Ulber, R., Farag, M. A. (2021). Rediscovering bacterial exopolysaccharides of terrestrial and marine origins: novel insights on their distribution, biosynthesis, biotechnological production, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1—21. doi: 10.1080/07388551.2021.1942779.

Zhang, L., Zhao, B., Liu, C. J., Yang, E. (2020). Optimization of biosynthesis conditions for the production of exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the exopolysaccharides antioxidant activity test. *Indian Journal of Microbiology*, 60(3), 334—345. doi: 10.1007/s12088-020-00865-8.

Zhao, D., Liu, L., Jiang, J., Guo, S., Pin, W., Ge, J. (2020). The response surface optimization of exopolysaccharide produced by *Weissella confusa* XG-3 and its rheological property. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(10), 1014—1022. doi: 10.1080/10826068.2020.1780609.