И. А. Хусаинов, З. А. Канарская

ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ПРОИЗВОДСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Ключевые слова: продуценты экзополисахаридов, субстрат, ферментация, экстракция, выделение.

Рассмотрена технология промышленного производства бактериальных полисахаридов.

Keywords: producers exopolysaccharides substrate fermentation, extraction, selection.

The technology of industrial production of bacterial polysaccharides.

Актуальность. Несмотря на многообразие биополимеров и их практическую значимость, только некоторые из них получили промышленную реализацию (табл. 1) [1]. На глобальном рынке гидроколлоидов доминируют полисахариды водорослей и растений, такие, как альгинат, крахмал, пектин, карагинан, галактоманнан и др. Доля бактериальных экзополисахаридов (БЭПС) на рынке гидроколлоидов не превышает 10 % [2]. Во многом это обусловлено низким выходом и высокой себестоимостью получаемых продуктов. Для замены растительных гидроколлоидов на аналоги микробиологического происхождения требуются инновационные подходы. Основные пути снижения стоимости включает использование дешевых субстратов, улучшение выхода путем создания более продуктивных штаммов методом генетической инженерии, оптимизации процесса ферментации и всего технологического процесса [3].

Таблица 1 - Промышленно производимые бактериальные полисахариды и области их применения

Продуцент/ Бактериальный экзополисахарид	Мономер / Область применения	Молекул. вес (Да)
<i>L. mesenteroides</i> / Декстран	Глюкоза/ Пищевая, фарм. пром-сть	10^6 - 10^9
<i>P. aeruginosa</i> и <i>A. vinelandii</i> / Альгинат	Гилуруоновая и мануриновая кислоты/ Пищевые гидроколлоиды, медицина	$(0,3-1,3) \times 10^6$
Ксантан <i>Xanthomonas</i> spp.	Глюкоза, манноза и глюкуроновая кислота /Пищевая, нефтедобывающая, косметическая, фарм. пром- сть	$(2,0-50) \times 10^6$
Курдлан <i>Rhizobium meliloti</i> и <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Глюкоза/ Пищевая, фарм. пром- сть, извлечение металлов	5×10^4 - 2×10^6
Целлюлоза <i>Acetobacter</i> spp.	Глюкоза/ Пищев. (волокна), биомедицина, диафрагма для аудиотехники	$\sim 10^6$
Сукциноглокан <i>Alcaligenes faecalis</i>	Глюкоза и галактоза/ Пищевая и нефтедобывающая пром-сть.	5×10^3 - 1×10^6
Глюкоуронан <i>Sinorhizobium meliloti</i> M5N1CS и <i>Gluconacetobacter hansenii</i>	-/Пищевая и косметическая пром-сть.	6×10^4 - 6×10^5
Колановая кислота <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. и <i>Enterobacter</i> spp.	Фукоза, глюкоза, глюкуролат и галактоза/ Косметическая пром-ть	2×10^4 - 6×10^5

Промышленные микроорганизмы-продуценты бактериальных полисахаридов. Огромным промышленным потенциалом обладают БЭПС молочнокислых бактерий (МКБ), однако большинство МКБ демонстрируют низкий выход полисахаридов, что затрудняет их коммерциализацию. Для гомополисахаридов, в большинстве случаев, выход составляет менее 1 г/л для неоптимизированных условий и еще более низкий для гетерополисахаридов (ГеПС) [4]. Исследовали 10 штаммов МКБ изолированных из молочных и зерновых продуктов. В 9 из них выход глюканов составлял от 0,8 до 1,7 г/л и только гетерополисахариды от *Lb. Curvatus* в количестве 0,022 г/л. [5]. Сообщается о том, что 31 продуцент ГеПС скринированные от 201 штамма МКБ (термофилы и мезофиллы) синтезировали от 10 до 166 мг/л и только 7 из них производили более 100 мг/л.

Большое число исследований посвящено различным штаммам-продуцентам БПС. Получен штамм *L. mesenteroides* CMG713, селективированный для производства декстрана демонстрирует максимальный выход при 20 часовой ферментации на среде с 15 % сахарозы при 30 °С и pH 7,0. Эта бактерия продуцирует декстран с молекулярной массой около 2 млн Да, мономеры в котором соединены только α -1,6 глюкозидной связью [6].

Ферментация. Эффективность ферментации, как и в целом, эффективность производства БЭПС зависит от бактериальной фазы роста, состава среды, pH среды, температуры культивирования, режимов перемешивания, аэрации, вязкости среды и др. [7]. Большое значение имеет состав среды и соотношение углерода к азоту, в частности, соотношение 10:1 считается наиболее благоприятными для максимального производства ЭПС [8].

Установлено влияние компонентов питательной среды - источников углерода (глюкоза, фруктоза, лактоза, манноза, ксилитоза и сахароза) и азота (хлорид аммония, нитрат натрия, пептон, дрожжевой экстракт, мясной экстракт), минералов, витаминов и аминокислот, а также некоторых промышленных отходов как, например, тростниковая меласса, рисовые отруби на выход БЭПС *Bacillus subtilis*. Согласно полученным результатам, максимальный выход БЭПС наблюдался при концентрации сахарозы 2 % и составил 2,66 г/л, минимальный у фруктозы (0,96 г/л). Сахароза обеспечивает высокий выход, являясь

прекурсором для синтеза БЭПС. При более высокой концентрации сахарозы повышается осмотическое давление и выход полисахарида снижается [9]. Производство необходимого БЭПС может быть также достигнуто контролем условий культивирования. Во многих случаях структура БЭПС зависит от источника углерода. Например, меняя состав среды можно добиваться различного соотношения моносахаров в БЭПС.

Из различных источников азота органическая форма способствует большему выходу БЭПС, чем неорганическая. Наилучшие результаты наблюдаются при применении дрожжевого экстракта. В общем случае, повышение концентрации азота стимулировало рост клеток и снижает образование БПС. Из аминокислот большим эффектом обладает ввод L-аспарагина, затем L-глутамина и L-глицина.

Определены оптимальные для производства БПС концентрации различных минералов (Na^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , and Mn^{2+}). Среди витаминов большим эффектом обладает аскорбиновая кислота.

Выбор основного сырья для ферментации, как и оптимизация состава питательной среды в целом имеет определяющее значение в экономике производства БПС, т.к. сырье является наиболее дорогостоящим составляющим в производстве биополимеров. До 90-х годов исследования были направлены на изучение условий культивирования с получением высокочистых биополимеров. Однако, для повышения коммерческой привлекательности производства биополимеров, исследуются различные мультикомпонентные сырьевые системы, такие как мелассы, сиропы, отходы пищевой и перерабатывающей промышленности и др.

Сиропы и мелассы используются в качестве субстрата для производства пуллулана [10], ксантана [11], декстрана [12], склероглюкана [13], левана [14], и геллана [15] благодаря высокому содержанию сахарозы и других питательных компонентов и ростовых факторов, низкой цены, доступности и простоте хранения. Степень чистоты сырья носит индивидуальный характер и зависит от требований бактериальной клетки.

Жом сахарной свеклы, получаемый после экстракции сахарозы из свекловичной стружки, состоит преимущественно из целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина. Существует несколько способов обработки жома для дальнейшей переработки. Автоклавирование при температуре 122 и 136 °C изменяет композицию и физико-химические свойства, увеличивая растворимость пектинов и арабианов. Обработка перепадами давления повышает растворимость целлюлозных компонентов. Сообщается о выходе 0,89 г ксантана с 1 г автоклавированного жома в течение 4 дней ферментации [16].

Сырная сыворотка. Содержит около 70 % лактозы от СВ, а также др. компоненты и факторы роста, стимулирующие рост микроорганизмов. В производстве БПС применение сыворотки зависит от способности микроорганизмов утилизировать

лактозу. Сыворотка как сырье в производстве ксантана исследовалась в работе [17].

Фруктовые отжимки. Проводили экстракцию сахарозы из виноградной выжимки горячей водой, сепарировали раствор и выращивали *A. pullulans* NRRLY-6220 для производства пуллулана. Выход пуллулана составил 22,3 г/л в течение 7 дней ферментации [18].

Лигноцеллюлозная биомасса. Распространенный и дешевый альтернативный субстрат для микробиологической промышленности [19]. Древесина после кислотного гидролиза использовалась для получения сукциноглокана штаммами *Pseudomonas* sp. ATCC 31260. На кислотном гидролизате древесных опилок бактериями *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 и *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 образовывался полисахарид в количестве 64 - 72 % от веса сухих клеток [20].

Несмотря на низкую стоимость, вторичные ресурсы могут содержать компоненты, которые будут способствовать возникновению различных метаболических путей. Это может привести к синтезу других полимеров и возникновению нежелательных побочных продуктов. Неактивные компоненты питательной среды, скапливаясь, могут выступать ингибиторами, снижая выход целевого продукта. Некоторые технологии предъявляют высокие требования к чистоте и качеству субстрата, что может существенно повысить затраты на их подготовку и увеличить общие инвестиционные затраты.

Кроме питательной среды на синтез БЭПС влияют условия культивирования, такие как pH и температура. В общем случае оптимум pH культуральной среды для образования БПС находится в диапазоне 5,5 - 6,5. Существенные отклонения от этого уровня ингибируют не только рост и развитие клеток, но и образование БЭПС [21]. Уровень pH зависит от микроорганизмов и находится в достаточно узком диапазоне. В частности, для синтеза БПС у *Enterobacter* A47 оптимум pH находится в пределах 6,0 - 8,0 [22]. Оптимальный уровень pH для синтеза ксантана находится в пределах 6 и 7,5. В процессе жизнедеятельности клетки выделяют большое количество кислот, что снижает pH и требуется его систематический контроль.

Температура существенно влияет на синтез БЭПС. Оптимальная температура для многих бактерий продуцентов БЭПС находится в диапазоне 26 - 31 °C. Снижение температуры на 10 °C ингибирует биосинтез БЭПС. Наблюдаются исключения - бактерии, вырабатывающие БЭПС в качестве ответа на температурный шок производят экстрацеллюлярные полисахариды (например, *Listeria monocytogenes*) [21].

Образование БПС зависит от генетического фактора, определяющего закономерность образования БПС в различной стадии роста - логарифмической или стационарной.

Аэрация используется главным образом на стадии активного роста клеток, в остальных случаях она лимитируется.

Одной из особенностей технологии получения БЭПС является изменения реологических свойств среды, как в процессе роста, так и на стадии образования БЭПС [23]. Это создает определенные проблемы не только в ухудшении таких технологических процессов, как перемешивание, передача тепла, кислорода, но также могут быть причиной нестабильности качества конечного продукта. Обеспечение эффективного процесса ферментации в промышленных условиях, возможности масштабирования технологий требует выработки определенной стратегии в развитии биореакторов для производства БЭПС [24]. Исследованы процессы ферментации в биореакторах с мультидисковыми перемешивающими устройствами, как например, при производстве метилана [25], применение аксиальных пропеллеров для перемешивания как в технологии курдлана [26].

Ферментативные методы. Некоторые поли- и олигосахара (декстран, изомальтоолигосахара, галактоолигосахара) могут быть получены прямым ферментативным синтезом из моно и дисахаров. Имобилизованные ферменты в этих способах производства предпочтительнее, поскольку могут многократно использоваться, улучшая также некоторые свойства ферментов, такие как стабильность, активность, специфичность и селективность [27].

Применительно к технике иммобилизации метод капсулирования в альгинаты представлен наилучшим образом, обеспечивая до 90 % выхода [28]. Декстраназы иммобилизуются на различных носителях: глютаральдегидактивированный хитозан, пористое стекло, бентонит, *Eupergit C*, демонстрируя высокий выход (90 %) [29]. Изучена возможность соиммобилизации декстрансахаразы и декстраназы для получения декстрана определенной степени полимеризации [30].

Положительные результаты по иммобилизации фермента декстраназа (*Leuconostoc mesenteroides* В-512F) получены на эпокси-активированном акриловом полимере *Eupergit C* 250L. Иммобилизация фермента осуществлялась при рН 5,4 для исключения инактивации фермента. Исследовалось количество иммобилизованного фермента на носителе, температура и продолжительность контакта. Восстановленная активность фермента достигала 22 %, оптимальная температура и рН были идентичны нативному ферменту. Фермент сохранял более 40 % начальной активности в течение 2 дней [31].

Иммобилизоваться могут также и клетки-продуценты БПС, например, *L. mesenteroides* KIBGE HA,1 иммобилизованный на акриламидном геле. При концентрации сахарозы в субстрате 10 % достигали максимальный выход декстрана с коэффициентом конверсии 5,82 при 25 °С, тогда как при более высокой температуре 35 °С коэффициент составил 3,5. С повышением концентрации сахарозы

выход декстрана уменьшался. Свободные клетки прекращали синтез декстрана по истечении 144 ч, тогда как иммобилизованные клетки синтезировали декстран до 480 ч. Молекулярная масса декстрана полученного иммобилизованными клетками была меньше, чем у свободных, декстран которых был аналогичен голубому декстрану [32].

Выделение БЭПС. Технологии извлечения БЭПС из культуральной жидкости представлены в настоящее время, преимущественно двумя способами, являющимися не столько альтернативными, сколько взаимодополняющими: классической технологией осаждения полярными растворителями и мембранное концентрирование. Мембранное концентрирование или ультрафильтрация автономно применяется для получения жидких форм продукта (например, в нефтяной промышленности), в других случаях она является стадией предварительной обработки раствора перед осаждением растворителями с целью получения более чистых БЭПС. Ультрафильтрация эффективна только для псевдопластичных полимеров (вязкость которых зависит от внешнего сдвигового усилия). Так псевдопластичный ксантановый гель концентрируется до вязкости 30000 Спз. Другие полисахариды с меньшей псевдопластичностью концентрируются только до фракции с аналогичной вязкостью и имеют низкую скорость потока. В промышленности применяются пластинчатые и рамные типы ультрафильтров. Мембраны изготовлены из полисульфона или поливинилидина. Преимущества данного способа – низкие энергозатраты и возможность исключить низкомолекулярные соединения в процессе концентрирования ЭПС, к тому же минимизирована биологическая деградация молекул в течении короткого времени фильтрации.

В качестве осадителей используются в промышленности такие растворители как ацетон, метанол, этанол и пропанол. Для экстракции биополимеров из культуральной жидкости тестировались различные растворители (этанол, метанол, диэтиловый эфир, ацетон, бутанол, пропанол, изоамиловый спирт, толуен, ксилен, бензен и хлороформ). Этиловый спирт требует около 24 часов для качественного осаждения БЭПС, в то время как метиловый спирт осаждал практически сразу после добавления. Диэтиловый эфир и ацетон также хорошо осаждают, но требуют более 24 ч. Остальные растворители не эффективны в качестве осадителей [9]. На количество растворителя, необходимого для осаждения большое влияние оказывает концентрация катионов в культуральной жидкости, с повышением которых существенно снижается количество растворителя. Для этих целей применяется ввод нитрата кальция и хлорида калия. Одним из недостатков способа осаждения растворителем – это необходимость в дорогостоящей последующей стадии дистилляции больших объемов растворителя. Другая проблема – соосаждение белков, солей пигментов, которые загрязняют готовый продукт.

Особое внимание уделяется стадии отделения клеток-продуцентов БЭПС, белков, нежелательных полимеров и примесей от извлекаемого БЭПС. Для отделения клеток применяют способ центрифугирования, режим работы которого зависит от вязкости жидкости. Процедура сепарации может сопровождаться предварительной термообработкой для дезактивации живых клеток (90 – 95 °С) [33]. Для извлечения трудноотделяемых клеток применяется добавление деионизированной воды перед центрифугированием. Для отделения прочносвязанных капсулированных БЭПС (биоленки) необходимо осуществлять предварительную экстракцию, которая зависит от природы связи клетки и полисахарида. Распространено применение различных реагентов, в частности, гидроксида натрия, других реагентов (буферные соли, ЭДТА, формальдегид, катионообменные смолы и др.) и ферментов (амилазы, протеазы и др.) [34, 35]. Применяют различные физические методы - ультразвуковую обработку, автоклавирование, нагрев, ультрафильтрацию, диализ и др. и комплексную обработку, например, кипячение клеточной суспензии в воде в течение 15 мин, нагрев до 60 °С в физиологическом растворе, нагрев до 65 °С в фенольном растворе и т.д. [34]. В составе конечного продукта могут содержаться различные низкомолекулярные вещества, соли, протеины и пр. Для достижения необходимой степени чистоты могут применяться следующие процессы: переосаждение полимеров из дистиллированной воды, химическая депротеинизация кислотами или ферментами, мембранные процессы - ультрадиализация. Все эти операции должны быть осуществлены с учетом выхода продукта, степенью чистоты и свойствами полимеров и нуждаются в разработке новых методов и подходов [36, 37].

В качестве примера современного подхода к производству БПС представлен техпроцесс производства клинического декстрана с целью увеличения его выхода, а также получения фруктозы, как ценного сопродукта. С этой целью декстранасахаразу получали в результате непрерывной ферментации в неарируемых условиях, затем фермент извлекался в процессе непрерывной последовательной ультрацентрифугации и ультрафильтрации после чего использовался для синтеза декстрана в непрерывнодействующем противоточном хроматографическом реакторе-сепараторе. Мембранная фильтрация и непрерывная эксклюзионная хроматография применялась для фракционирования и получения клинического декстрана и выделения фруктозы. Оптимизация стоимости продукта достигалась исключением стадии обработки этанолом и его рекуперации [38, 39, 40].

Выводы

Потребление БЭПС имеет выраженную тенденцию роста в различных областях

промышленности. Сдерживающими факторами их интенсивного промышленного внедрения является несовершенство технологии производства и вследствие этого высокая себестоимость продукции. Совершенствование биотехнологии БЭПС требует поиска эффективных решений, как по совершенствованию штаммов бактерий-продуцентов, так и технических и технологических решений производственного процесса. Большинство патентов в области производства БЭПС посвящены их применению в различных областях, генетической инженерии бактерий и способам (технологиям) производства. Большого внимания также требует разработка эффективного оборудования для ферментации и выделения полимеров из питательной среды. В отличие от большинства микробиологических производств, технология биополимеров требует новых подходов к массообменным и теплообменным процессам. В частности, первоочередными вопросами являются задачи повышения выхода с единицы объема аппаратов в условиях повышенной вязкости, повышение чистоты от сопутствующих клеточных компонентов, снижение затрат на стадии концентрирования и сушки полимеров с высокой водосвязывающей способностью.

Литература

1. *Ezekiel G., Anthony I.* Review Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects Uchechukwu U. Nwodo, Okoh Int. J. Mol. Sci. 13. 14002 – 14015. (2012).
2. *Phillips K.* Demand for healthier foods stirs up growth in hydrocolloids. Chemical Week. (2012).
3. *Yang, S.-T.* Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Elsevier. (2007).
4. *Werning M.L., Notararigo S., Nocher M., Fernandez de Palencia P.* Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. (2010).
5. *Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, De Vuyst, L.* Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. International Journal of Food Microbiology. Vol. 118. No. 3. pp. 250-258. (2007).
6. *Sarwat F., Qader S.A., Aman A., Ahmed N.* Production and characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Int J Biol Sci. 4(6):379-86. (2008).
7. *Kamerling J.P.* Bacterial exopolysaccharides. Comprehensive glycoscience. Elsevier. Amsterdam. Sutherland IW. (2007).
8. *Tapan Kumar Singha.* Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production, Isolation and Applications. Department of Microbiology IOSR Journal of Pharmacy Mar. Vol. 2(2) pp: 276 - 281. (2012).
9. *Sirajunnisa Abdul Razack, Vijayagopal Velayutham, Viruthagiri Thangavelu.* Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. Turkish Journal of Biology Turk J Biol. 37: 280-288. (2013).
10. *Cheng K.C., Demirci A., Catchmark J.M.* Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. Food Sci Technol Int. 17(2):99 - 109. (2011).

11. *Marzieh Moosavi-Nasab, Safoora Pashangeh, and Maryam Rafsanjani.* Effect of Fermentation Time on Xanthan Gum Production from Sugar Beet Molasses World Academy of Science. Engineering and Technology. Vol: 44. (2010).
12. *Marianna Santos, Jose Teixeira, Alirio Rodrigues,* Biochemical Engineering Journal Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f), 4. 177 - 188. (2000).
13. *Fosmer A., Gibbons W.* Separation of scleroglucan and cell biomass from *Sclerotiumglucanicum* grown in an inexpensive, by-product based medium. (2011)
14. *Basic J.* Curdlan production by *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 on an. Microb 48:65 – 68. (2008). ethanol fermentation coproduct. West TP, Nemmers B
15. *Banik R.M., Santhiagu A., Upadhyay S.N.* Optimization of nutrients for gellan gum production. Bioresource Techno 1 98:792 – 797. (2007). by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology.
16. *Harcum S.W., Yoo S.D.* Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. Bioresource Technol 70:105 – 109. (1999).
17. *Afzal M.* Optimisation of Water Absorbing Exopolysaccharide Production on Local Cheep Substrates by *Bacillus* Strain CMG 1403 using one variable at a time approach. Journal of Microbiology Vol. 52. № 1. pp. 44 – 52. (2014).
18. *Israilides C.J., Smith A., Harthill J.E., Barnett C., Bambalov G., Scanlon B.* Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. Appl Microbiol Biotechno 149:613 – 617. (1998).
19. *Kuhad R.C., Singh A.* Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects. International Pvt Ltd, 390 c. (2007).
20. *Silva J.A., Tobella L.M., Becerra J., Godoy F., Martinez M.A.* J Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 using acid-hydrolyzed sawdust as carbon source. Biosci Bioeng 103:542 – 546. (2007).
21. *Czaczyk K., Myszka K.* Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 16. No. 6. (2007).
22. *Torres C.A., Antunes S., Ricardo A.R., Grandfils C., Alves V.D., Freitas F., Reis M.A.* Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis. Bioresour Technol. 119:148 - 56. (2012).
23. *V.D. et al.* Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. Alves. Carbohydr. Pol. 81. 758 – 764. (2010).
24. *R.J. Seviour, B.Mc. Neil, M.L. Fazenda, L.M. Harvey.* Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. Critical Reviews in Biotechnology. 31(2):170 - 85. (2010).
25. *Jung-Hoe Kim, Toshiomi Yoshida.* Production of a High Viscosity Polysaccharide, Methylan, in a Novel Bioreactor Deok-Kun Oh. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 54, No. 2. (1997).
26. *Lawford H.G., Rousseau J.D.* Bioreactor Design Considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 28 – 29. (1991).
27. *Mateo C., Palomo, M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 40. No. 6. pp. 1451 – 1463. (2007).
28. *Tanriseven, A., Dogan S.* Production of isomaltoligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres. Process Biochemistry. Vol. 37. No. 10. pp. 1111 – 1115.
29. *Aslan, Y., Tanriseven, A.* Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltoligosaccharides from dextran. Biochemical Engineering Journal. Vol. 34. No.1. pp. 8 - 12. (2007).
30. *Erhardt, F.A., Kigler, J., Chakravarthula, R.R., & Jrdening, H.J.* Co-Immobilization. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 100, No.4. pp. 673 - 683. (2008). of dextransucrase and dextranase for the facilitated synthesis of isomaltoligosaccharides: preparation, characterization and modeling.
31. *Comez de Segura A., Alcalde M., Yates M., Rojas-Cervantes M.L., Lopez-Cortes N., Ballesteros A., Plou F.J.* Immobilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C supports. Biotechnol. Prog. 20(5):1414 - 20. (2004).
32. *Qader S.A., Aman A., Azhar A.* Continuous Production of Dextran from Immobilized Cells of *Leuconostoc mesenteroides* KIBGE HA1 Using Acrylamide as a Support. Indian J Microbiol. 51(3):279-82. (2011).
33. Food Technol. Biotechnol. Gellan gum: fermentative production, downstream processing and applications. 45, 341– 354. (2007).
34. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical. World Pierre Lembre, Cecile Lorentz and Patrick Di Martino <http://dx.doi.org/10.5772/51213>
35. Carbohydr. Pol. 80, 1037–1041, 2010. Recovery and purification of the exopolysaccharide PS-EDIV from *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101. Bahl, M.A. et al.
36. *Freitas F., Alves V.D., Reis M.A.* Trends Biotechnol. 29(8):388-98 Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. (2011).
37. *Канарский А.В., Дулькин Д.А., Семенов Э.И., Чеботарь В.К., Щербаков А.В., Канарская З.А.* Вестник Казан. технол. унив. Т. 15. № 14. с. 186 – 190. (2012).
38. *Barker P.E., Ganetsos G., Ajongwen N.J.* J Chem Technol Biotechnol. A novel approach to the production of clinical-grade dextran. 57(1):21-6. (1993).
39. *Хусаинов И.А., Канарский А.В., Канарская З.А.* Вестник Казан. технол. унив. Т. 16. № 6 (1). с. 131 – 137. (2013).
40. *Хусаинов И.А.* Вестник Казан. технол. унив. Т. 17. № 5. с. 167 – 173. (2014).

© **И. А. Хусаинов** – ассистент каф. ПИМП КНИТУ, innzar@rambler.ru; **З. А. Канарская** – канд. техн. наук, доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, zosya_kanarskaya@mail.ru.