



Research Paper

Isolation, Identification and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Bacteria Isolated from Traditional Dairy Products of Kerman

Zahra Khodaei¹, Shahla Soltani-Nezhad^{2*}

¹Department of Microbiology, Ke.C., Islamic Azad University, Kerman, Iran

²Department of Microbiology, Ji.C., Islamic Azad University, Jiroft, Iran

Received: 19/10/2025, Accepted: 18/11/2025

Abstract

Exopolysaccharides (EPSs) synthesized by lactic acid bacteria have the potential to be used as food additives with health benefits. The aim of this study was to investigate the production of EPS by strains isolated from traditional dairy in Kerman and their characterizations. The production of EPSs was measured by phenol-sulphuric acid method. The results were compared with the standard curve of glucose (mg/L). The EPSs production pattern was assessed with the pattern of bacterial growth as well as the effects of temperature and acidity changes on the EPSs production. In order to characterize EPSs, Fourier transform infrared (FTIR) spectrum was done. Finally, highest EPS producing isolates were identified by molecular methods. Our results show that all 20 examined isolates produced both cell-bound and released EPSs. Among them, two isolates were belonged to *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium*. The highest EPS production was observed at 37°C, pH 7.5 and started at late logarithmic phase. Identified functional groups from the purified EPSs obtained by infrared spectroscopy were include (O-H), (C-H) and (C=O) aldehyde groups. Here, for the first time our results show that isolated bacteria from traditional dairy in Kerman province have the ability to produce both cell-bound and released EPSs.

Keywords: Traditional dairy product, Exopolysaccharide, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*

Citation: Khodaei Z, Soltani-Nezhad S, Isolation, Identification and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Bacteria Isolated from Traditional Dairy Products of Kerman. *Quality and Durability of Agricultural Products and Food Staffs*, 2025;5(2): 17-29.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1221670>



© The Author(s) **Publisher:** Islamic Azad University of Kerman, Iran

* **Corresponding author:** Shahla Soltani-Nezhad, **Email:** soltanibiotech@iau.ir

Extended Abstract

Introduction

Mesophilic lactic acid bacteria are used as starter cultures in traditional fermented milks, industrial processes, and in the dairy industry. Some of them produce lactic acid, flavor compounds, and bacteriocins. Several strains also have the ability to secrete exopolysaccharides. Most exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria belong to the genera *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus*. Some strains of *Bifidobacterium* have also shown the ability to produce these exopolysaccharides. Exopolysaccharides are highly variable polymeric groups. Many plant-derived polysaccharides, such as starch, pectin, and gum, are used as thickeners and gelling agents. In recent decades, microbial exopolysaccharides have replaced plant polysaccharides, which have the above properties and are obtained in large quantities and with a higher degree of purity. The first group of microbial polysaccharides is a capsule that is located on the cell surface and plays an important role in protecting microbes against phage attack, phagocytosis, toxic compounds, and antibiotics. The second group is exopolysaccharides that are secreted outside the cell. Due to their physical and chemical properties, exopolysaccharides are widely used in the food industry as viscosifying, gelling, and thickening agents. These compounds are used in the removal of heavy metals and in the pharmaceutical industry as drug delivery agents. Their biological effects include anticancer, antiviral, anti-inflammatory, cholesterol-lowering, and blood sugar-lowering properties. They can also remain stable in the digestive tract and have a prebiotic effect. The aim of this study is to investigate the ability of exopolysaccharide production in strains isolated from local dairies in Kerman

province and to determine the nature of the exopolysaccharide produced.

Methods

Local dairy samples were collected from villages in Kerman province and cultured on MRS agar medium to isolate probiotic bacteria. After morphological examination and Gram and catalase tests, 20 isolates were selected. Bound and released exopolysaccharides were extracted by physical and chemical methods and quantified by phenol-sulfuric acid method. Exopolysaccharide-producing strains were identified using glucose standard curve. The growth pattern and exopolysaccharide production of the selected isolates were studied simultaneously and at 6-hour intervals. The effect of temperature (25 to 42 °C) and pH (6.5 to 8) on the rate of exopolysaccharide production in two isolates C-7 and C-10 was studied. Initial identification was done by biochemical tests and final by 16S rRNA gene sequencing. PCR reaction was performed with primers F8 and R1541 and the products were electrophoresed in agarose gel. Sequence alignment with NCBI and EBI databases and phylogenetic analysis were performed with MEGA software. Purified exopolysaccharide samples were prepared for FTIR spectroscopy by KBr pelleting method. All experiments were performed with equal repetition and data were analyzed by one-way analysis of variance. Significant differences between means were evaluated by Tukey test at the 95% level. This study sought to find indigenous *Lactobacillus* strains with high potential for exopolysaccharide production. Optimal environmental conditions for maximum exopolysaccharide production were also determined. The findings can be used in the development of functional and probiotic food products.

Results and Discussion

Of the 46 samples studied, 20 isolates were selected based on microbial

phenotypic tests, of which two isolates C-10 and C-7 were selected for further research based on the amount of exopolysaccharide production. The highest amount of bound exopolysaccharide was reported for sample C-7 and then C-10, which were 21 and 15 mg/L, respectively, and the range of bound exopolysaccharide production was (0.03-21) mg/L. In the case of released exopolysaccharide, the highest amount was reported for isolates C-7 and C-10, which were 14 mg/L for sample C-7 and 11 mg/L for sample C-10 and 23 mg/L for released exopolysaccharide production. The selected strains (C-7 and C-10) had the highest exopolysaccharide production at the end of the logarithmic phase and the beginning of the stationary phase, and after that the production rate decreased. The highest production rate was reported for isolate C-10 at 37 °C and for isolate C-7 at 42 °C. The highest production rate was observed at acidity 7 and 7.5. There was no significant difference between the production rates at these two acidity levels. The lowest production rate was reported at acidity 6.5. Based on molecular identification, strain C-7 was attributed to *Enterococcus faecium* and strain C-10 to *Lactococcus lactis*. In the infrared spectrum, a peak at 1724 related to the aldehyde functional group was observed, which could be related to the sugar factor. Other functional groups observed from the purified exopolysaccharide include the hydroxyl (OH) group peak observed at 3419 and the nitrile or alkyne group at 2359. Peaks related to alkane hydrogens were also observed at 2926. In this study, 20 isolates of lactic acid bacteria native to Kerman province, Iran were screened for their ability to produce exopolysaccharides. The results showed that all isolates were capable of producing both bound and released exopolysaccharides. The highest exopolysaccharide production occurred at the end of the logarithmic phase and the beginning of the stationary phase and then

decreased. Two isolates, C-7 and C-10, were selected as the top producers. Environmental studies showed that 30°C and pH between 7 and 7.5 were the most optimal conditions for exopolysaccharide production in these strains. These findings are consistent with some previous studies, but the type and amount of production were more precisely determined in this work. Unlike many previous studies that focused on only one strain, this study examined a wider range of local samples. Also, for the first time, exopolysaccharide production has been reported from traditional Kerman dairy products. The results indicate that growth conditions, time, and genetic characteristics of the strains are effective in the production of these compounds. These indigenous isolates can be used as starter cultures in functional food industries.

Conclusion

This research led to the identification of bacterial strains isolated from traditional dairy products and the characterization of the EPS they produce. The findings highlight the practical potential of these bacterial strains as natural sources of EPS for the food industry particularly as bio-stabilizers and health-promoting compounds, including prebiotic effects.

Keywords

Traditional dairy product, Exopolysaccharide, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*

Funding

No funding

Authors' contribution

All authors contributed equally to the writing and preparation of this manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.



مقاله پژوهشی

جداسازی، شناسایی و تعیین ماهیت اگزوپلی ساکارید تولیدشده توسط باکتری‌های موجود در لبنیات محلی کرمان

زهرا خدایی^۱، شهلا سلطانی نژاد^{۲*}

^۱گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

^۲گروه میکروبیولوژی، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، جیرفت، ایران

دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۷

چکیده

اگزوپلی ساکاریدهای باکتری‌های اسید لاکتیک اگر به عنوان افزودنی غذایی مورد استفاده قرار گیرند، اثرات سلامتی بالقوه‌ای دارند. هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری‌های تولیدکننده اگزوپلی ساکارید از لبنیات محلی کرمان و تعیین ماهیت اگزوپلی ساکارید تولیدی می‌باشد. ۴۶ نمونه از محصولات لبنی سنتی در شرایط استریل جمع‌آوری شده و روی محیط MRS agar کشت داده شد. پس از خالص‌سازی و بررسی خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی، ۲۰ جدایه انتخاب گردیده و تولید اگزوپلی ساکارید، با روش فنل/سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد. نتایج با منحنی استاندارد گلوکز مقایسه و میزان تولید بر حسب میلی گرم بر لیتر تعیین گردید. الگوی تولید اگزوپلی ساکارید با الگوی رشد باکتری‌ها و نیز اثرات تغییرات دما و اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی ساکارید و طیف FTIR به منظور تعیین ماهیت آن بررسی شد. در نهایت جدایه‌های برتر از نظر میزان تولید اگزوپلی ساکارید انتخاب و به روش مولکولی شناسایی شدند. نتایج نشان داد ۲۰ جدایه مورد بررسی هر دو نوع اگزوپلی ساکارید باند شده و رها شده را تولید کردند. دو جدایه برتر متعلق به لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکتوکوکوس فاسیوم می‌باشند. بیشترین مقدار تولید، در دمای ۳۷°C و اسیدیته ۷ و ۷/۵، در انتهای فاز لگاریتمی رشد می‌باشد. گروه‌های عملکردی اگزوپلی ساکارید خالص‌شده حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز شامل گروه‌های آلدیدی، (O-H)، (C-H) و (C=O) می‌باشند. گروه‌های عاملی، اشاره به ماهیت قندی اگزوپلی ساکارید دارد. نتایج نشان داد که باکتری‌های جدا شده از لبنیات محلی استان کرمان، دارای توانایی تولید اگزوپلی ساکارید می‌باشند. این یافته‌ها پتانسیل کاربرد این جدایه‌ها را به عنوان منابع طبیعی تولید اگزوپلی ساکاریدهای زیست‌فعال در صنایع غذایی و سلامت محور تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: لبنیات محلی، اگزوپلی ساکارید، لاکتوکوکوس لاکتیس، لاکتوکوکوس فاسیوم

استناد: زهرا خدایی، شهلا سلطانی نژاد، جداسازی، شناسایی و تعیین ماهیت اگزوپلی ساکارید تولیدشده توسط باکتری‌های

موجود در لبنیات محلی کرمان، کیفیت و ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، (۱۴۰۴)، دوره ۵، شماره ۲،

صفحات: ۱۷-۲۹.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1221670>

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، ایران

© نویسندگان



* نویسنده مسئول: شهلا سلطانی نژاد، پست الکترونیک: soltanibiotech@iau.ir

مقدمه

به‌عنوان عوامل ویسکوزیته‌کننده، ژله‌ای‌کننده و قوام‌دهنده استفاده می‌شوند. این ترکیبات در حذف فلزات سنگین و در صنایع داروسازی به‌عنوان عوامل انتقال دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند. از اثرات بیولوژیکی آن‌ها می‌توان به خواص ضدسرطانی، ضدویروسی، ضدالتهابی، کاهش‌دهنده کلسترول خون و کاهش‌دهنده قندخون اشاره کرد. همچنین می‌توانند در دستگاه گوارش پایدار مانده و اثر پری‌بیوتیکی داشته باشند (۱۱، ۱۲، ۱۳). هرکدام از اگزوپلی‌ساکاریدهای باند شده و رهاسده در محیط، دارای مزایای منحصربه‌فردی هستند (۱۴، ۱۵). هدف از این پژوهش بررسی توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید در سویه‌های جدا شده از لبنیات محلی استان کرمان و تعیین ماهیت اگزوپلی‌ساکارید تولیدی می‌باشد.

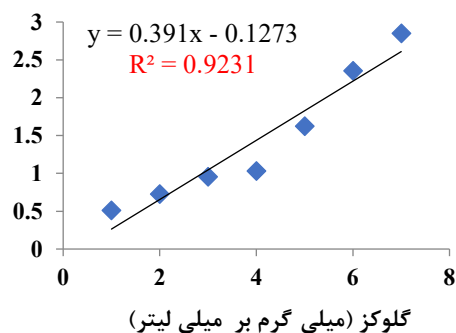
روش کار

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌های

پروبیوتیک

دستیابی به مناطقی که محصولات لبنی بومی در آن حفظ شده باشد، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. بنابراین برای نمونه‌برداری، مناطقی انتخاب گردید که کاملاً بکر باشند. فراورده‌های لبنی بومی (ماست، شیر، پنیر، کشک و اسپار) از روستاهای ماهان، لنگر، شهر بابک، زرنه، راین، لاله‌زار، باغین، راور، بافت و رابر در استان کرمان جمع‌آوری و نمونه‌ها در شرایط استریل روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. در ابتدا ۵ گرم از هر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی استریل به‌صورت همگن درآمد. سپس رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} از هر نمونه فراهم شده، جهت جداسازی سویه‌های پروبیوتیک در محیط کشت ام.آراس آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد (۱۶). پس از گرمخانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت از نظر خواص مورفولوژیکی و میکروسکوپی به روش رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز بررسی شدند (۱۷، ۱). در ادامه ۲۰ جدایه جهت بررسی بیشتر انتخاب گردید.

باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل، در شیرهای تخمیر شده سنتی، فرایندهای صنعتی و در صنایع لبنی به‌عنوان کشت‌های آغازگر استفاده می‌شوند. برخی از آن‌ها اسیدلاکتیک، ترکیبات طعم‌دار و باکتریوسین تولید می‌کنند. چندین سویه هم توانایی ترشح اگزوپلی‌ساکارید دارند (۱). این باکتری‌ها ممکن است منبع عالی پلی‌ساکاریدهای غذا باشند. اکثر سویه‌ها از محصولات لبنی ایزوله شده‌اند، اما گوشت تخمیر شده هم می‌تواند منبع باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید باشد (۲). دلایل گستردگی باکتری‌های اسیدلاکتیک، پایداری و بهبود عطر و طعم، ظاهر و بافت مواد غذایی است. از طرف دیگر تقاضا برای مواد غذایی با اثرات مفید، رو به افزایش است. اکثر باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید، متعلق به گونه‌های *استرپتوکوکوس*، *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لوکونوستوک* و *پدیکوکوکوس* هستند. بعضی از سویه‌های بیفیدوباکتر نیز توانایی تولید این اگزوپلی‌ساکاریدها را از خود نشان داده‌اند (۳). اگزوپلی‌ساکاریدها گروه‌های پلی‌مری بسیار متنوعی هستند. مشخصات ساختاری آن‌ها مانند وزن مولکولی، تعداد و اتصالات ساکاریدی نقش مهمی در کاربرد وسیع آن‌ها در صنایع مختلف دارد (۴، ۵). بسیاری از پلی‌ساکاریدهای مشتق‌شده از گیاهان مانند نشاسته، پکتین و صمغ به‌عنوان قوام‌دهنده و ژله‌ای‌کننده مورد استفاده قرار می‌گیرند، در دهه‌های اخیر اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی جایگزین پلی‌ساکاریدهای گیاهی شده‌اند که از خواص فوق‌برخوردار بوده و به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به‌دست می‌آیند (۶، ۷). پلی‌ساکاریدهای میکروبی بسته به موقعیت قرارگیری آن‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند: گروه اول پلی‌ساکاریدهای کپسولی هستند که در سطح سلول قرار می‌گیرند و نقش مهمی در حفاظت میکروب‌ها در برابر حمله‌ی فاژها، فاگوسیتوز، ترکیبات سمی و آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۸، ۲). گروه دوم، اگزوپلی‌ساکاریدهایی می‌باشند که به خارج سلول ترشح می‌شوند. این پلی‌ساکاریدها خود به دو گروه (باند شده و رهاسده در محیط) تقسیم می‌شوند (۹، ۱۰). به علت خواص فیزیکی و شیمیایی، اگزوپلی‌ساکاریدها به‌طور گسترده در صنایع غذایی



شکل ۱- منحنی استاندارد گلوکز

جداسازی و شناسایی اگزوپلی ساکارید

رهاشده در محیط

برای جداسازی اگزوپلی ساکاریدهای آزاد شده در محیط کشت، مایع رویی به دست آمده از ۱۰ میلی لیتر نمونه، سانتریفیوژ و سپس با تری کلرواستیک اسید با غلظت ۲۰ درصد عمل آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گرمخانه گذاری گردید. در طی این مدت با یک همزن به آرامی هم زده شد. پروتئین های ته نشین شده پس از ۲۰ دقیقه از طریق سانتریفیوژ (۲۵۰۰۰g) جدا گردید. سپس به منظور رسوب اگزوپلی ساکارید باند شده، به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفیوژ، اتانل سرد اضافه شد. عمل رسوب سازی اگزوپلی ساکارید باند شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رسوب یافته، از سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. ته نشست حاوی اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط، پس از خشک شدن در محیط آزمایشگاهی برای سنجش با روش فنل/ اسیدسولفوریک در آب مقطر حل گردید. اگزوپلی ساکاریدهای رها شده در محیط طبق روشی که برای اگزوپلی ساکارید باند شده توضیح داده شد، سنجش گردید (۱).

تعیین الگوی رشد جدایه های منتخب

برای تعیین الگوی رشد، جدایه های منتخب در ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت ام.آر.اس برات کشت داده شدند. در فواصل زمانی معین هر ۶ ساعت نمونه برداری صورت گرفت و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر

غربالگری جدایه های تولیدکننده

اگزوپلی ساکارید

در این بررسی اگزوپلی ساکارید باند شده و رها شده به طور جداگانه استخراج و در مقایسه با منحنی استاندارد گلوکز تعیین مقدار شدند (۱۷). برای جداسازی اگزوپلی ساکارید باند شده به سلول، به ته نشست حاوی سلول های باکتریایی، ۵ میلی لیتر محلول سرم فیزیولوژی برای شستشو اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰xg) گردید. ته نشست دو بار در ۵ میلی لیتر اتیلن دی آمید تترا استیک اسید^۱ (۰/۰۵ مولار)، سوسپانسیون شده و ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گرمخانه گذاری گردید. سپس به منظور جدا کردن مواد نامحلول، سوسپانسیون در ۶۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. به منظور رسوب اگزوپلی ساکارید باند شده، به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفیوژ، اتانل سرد اضافه شد. عمل رسوب سازی اگزوپلی ساکارید باند شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رسوب یافته، از سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. در این مرحله مایع شفاف رویی دور ریخته شد و ته نشست حاوی اگزوپلی ساکارید باند شده، در محیط آزمایشگاه خشک شد (۱۷، ۹).

سنجش اگزوپلی ساکارید باند شده به روش

اسپکتروفتومتری

رسوب حاصل از مرحله قبل، در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و مقدار کربوهیدرات کل از طریق روش فنل/ اسیدسولفوریک و منحنی استاندارد گلوکز تعیین شد. در این روش روی ۰/۵ میلی لیتر ته نشست حاوی اگزوپلی ساکارید محلول در آب مقطر، ۰/۵ میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک غلیظ ریخته شد. با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر، جذب آن ها خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز (شکل ۱)، انتخاب برترین سویه تولیدکننده اگزوپلی ساکارید باند شده، انجام گرفت (۱۷).

¹Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب الگوی رشدی جدایه‌های مورد بررسی در زمان‌های مختلف تعیین گردید (۱۸).

تعیین الگوی تولید اگزوپلی ساکارید

برای تعیین الگوی تولید اگزوپلی ساکارید، هم‌زمان با تعیین الگوی رشد باکتری موردنظر در ساعت‌های متوالی، ۲ میلی‌لیتر از نمونه‌ها را در هر ساعت جمع‌آوری نموده و سپس با روش فنل / سولفوریک اسید مقدار اگزوپلی ساکارید تولید شده در هر ساعت تعیین و به کمک منحنی استاندارد گلوکز میزان کربوهیدرات تولید شده در هر ساعت اندازه‌گیری شد. به کمک نرم‌افزار اکسل منحنی مربوط به الگوی تولید اگزوپلی ساکارید رسم گردید (۱۹،۲۰).

بررسی اثر عوامل محیطی دما و اسیدیته بر

میزان اگزوپلی ساکارید تولید شده

بر اساس میزان تولید اگزوپلی ساکارید دو جدایه C-7 و C-10 انتخاب شدند که تأثیر دما، در ۴ دمای (۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲) درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت (۴). برای بررسی اسیدیته به محیط‌های ام. آر. اس. برات که اسیدیته آن‌ها (۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸) تنظیم شده بود، از سویه‌های C-7 و C-10 منتقل کرده، پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، با روش فنل / سولفوریک جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شده و مقدار تولید اگزوپلی ساکارید در اسیدیته‌های مختلف اندازه‌گیری گردید (۱۱،۲۱،۲۲).

شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و

مولکولی جدایه‌های منتخب

از تست‌های اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل و رنگ کلونی، کاتالاز، اکسیداز و همولیز استفاده شد (۲۳). جهت شناسایی مولکولی، DNA ژنومی به کمک کیت استخراج DNA، (Accu Prep Bioneer)، ساخت کشور کره جنوبی، (Cat. No: K-3032) استخراج گردید. دو پرایمر مورد استفاده برای تکثیر ژن rRNA ۱۶S عبارتند از: ۸F با توالی 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و ۱۵۴۱R با توالی

3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5'. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۳۰ چرخه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) به این شکل انجام شد: جداسازی اولیه دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، باز شدن دو رشته در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه، طولیل شدن رشته هدف در ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و مرحله طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد جداسازی شده و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. توالی ژن‌ها توسط شرکت بیونیر کره جنوبی تعیین گردید. این توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای مختلف از جمله Finch TV، BioEdit، Gene Runner تجزیه و تحلیل شد. نتایج حاصل از بلاست توالی‌های موردنظر در سایت‌های NCBI^۱ و EBI^۲ بررسی شده و توسط نرم‌افزار MEGA تحلیل گردید. درخت فیلوژنی به روش Neighbor joining ترسیم شده، در نهایت توالی ژن‌ها توسط نرم‌افزار sequin در بانک ژن ثبت شد (۱۸).

بررسی طیف FTIR اگزوپلی ساکارید

خالص شده

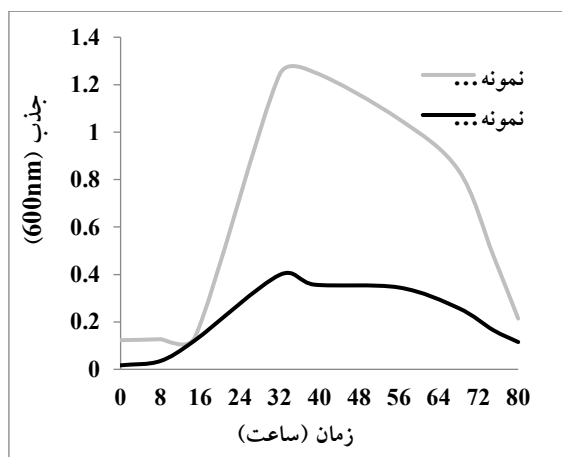
از رسوب‌های جمع‌آوری شده در مراحل قبل، برای بررسی ماهیت اگزوپلی ساکارید توسط طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده گردید. متداول‌ترین روش آماده‌سازی نمونه‌های جامد، قرص‌سازی با KBr (یا سایر هالیدهای فلزات قلیایی) می‌باشد. نمک‌های هالیدی خاصیت جریان سرد را دارند و چنانچه پودری از آن‌ها تحت تأثیر فشار کافی قرار بگیرد، به صورت یک قرص شیشه‌ای شفاف یا مات درمی‌آید که نسبت به مادون قرمز شفاف است. می‌توان از این خصلت برای آماده‌سازی نمونه‌های جامد استفاده نمود. بدین ترتیب که مقدار بسیار ناچیز از نمونه جامد (حدود یک میلی‌گرم یا کمتر) را که کامل پودر شده، با نسبت ۱ به ۱۰۰ با KBr کاملاً خشک مخلوط کرده و سپس مقداری از آن‌ها را در قالب فلزی مخصوص ریخته و با دستگاه پرس هیدرولیک تحت فشار (۵ تا ۸ تن بر

^۱ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

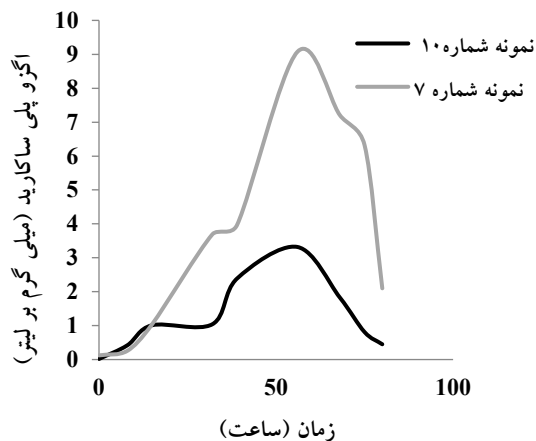
^۲ <http://www.ebi.ac.uk>

تعیین الگوی رشد و الگوی تولید اگزوپلی ساکارید جدایه‌های منتخب

با مقایسه منحنی رشد سویه‌ها (شکل ۲) و منحنی تولید اگزوپلی ساکارید (شکل ۳) می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های منتخب (C-7 و C-10) بیشترین تولید اگزوپلی ساکارید را در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون داشته و پس از آن میزان تولید کاهش یافته است.



شکل ۲- الگوی رشد جدایه‌های منتخب



شکل ۳- الگوی تولید اگزوپلی ساکارید توسط
جدایه‌های منتخب

تأثیر دما بر میزان تولید اگزوپلی ساکارید

اثر چهار دمای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد بر تولید اگزوپلی ساکارید توسط دو جدایه موردنظر با روش فنل/سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد. در این بررسی بیشترین میزان تولید برای جدایه C-10 در دمای

سانتی‌مترمربع) قرار می‌گیرد تا یک قرص شفاف به‌دست آید. بهترین قرص‌ها (در نتیجه بهترین طیف‌ها) زمانی به‌دست می‌آیند که KBr استفاده شده و ماده جامد موردنظر کاملاً خشک باشند و فرایند قرص‌سازی تحت خلاء انجام شود. این روش بهترین طیف‌ها را در طیف‌سنجی مادون‌قرمز ایجاد می‌کند که در این تحقیق استفاده گردید (۱۱، ۲۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه با تکرار مساوی استفاده شد. سپس برای تعیین نمونه‌هایی که دارای اختلاف میانگین معناداری می‌باشند، از آزمون توکی با سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید.

نتایج

جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های تولیدکننده اگزوپلی ساکارید

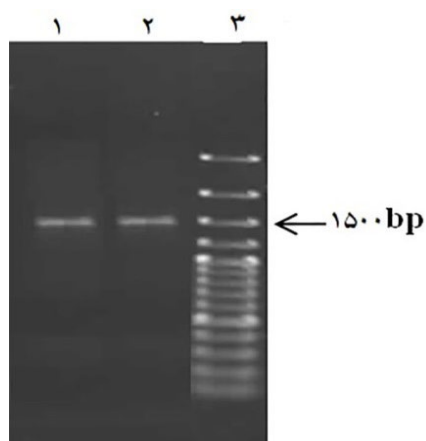
از ۴۶ نمونه مورد بررسی، ۲۰ جدایه خالص‌شده انتخاب گردید. رنگ کلونی‌ها سفید، از نظر شکل به‌صورت اجتماعی از کوکسی‌ها، زنجیره‌ای، دوتایی، بدون حرکت، کاتالاز و اکسیداز منفی و از نظر همولیز دارای همولیز آلفا و نیز گرم مثبت بودند. از بین ۲۰ جدایه خالص‌شده‌ی اولیه دو جدایه C-7 و C-10 بر اساس میزان تولید اگزوپلی ساکارید بیشتر جهت ادامه پژوهش انتخاب شدند. در ادامه نتایج مقادیر تولید اگزوپلی ساکارید ذکر شده است.

اندازه‌گیری میزان اگزوپلی ساکاریدهای باند شده به سلول باکتریایی و رهاسده در محیط

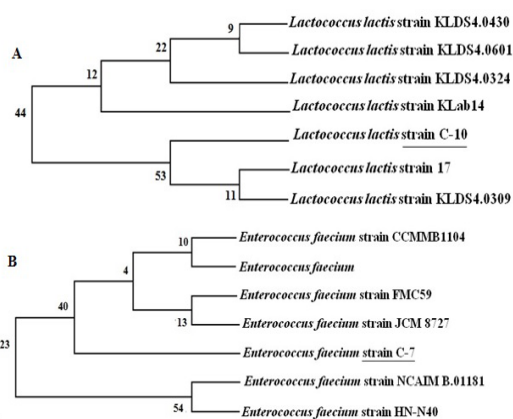
از ۲۰ جدایه مورد بررسی بیشترین میزان اگزوپلی ساکارید باند شده مربوط به نمونه C-7 و سپس C-10 که به ترتیب مقدار ۲۱ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر و بازه تولید اگزوپلی ساکارید باند شده (۰/۳-۲۱) میلی‌گرم بر لیتر گزارش گردید. در مورد اگزوپلی ساکارید رهاسده، بیشترین مقدار مربوط به جدایه‌های شماره C-7 و C-10 که نمونه C-7، ۱۴ میلی‌گرم بر لیتر و C-10، ۱۱ میلی‌گرم بر لیتر و بازه تولید اگزوپلی ساکارید رهاسده، (۰/۰۱-۲۳) میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر

وابستگی فیلوژنتیکی جدایه‌های برتر، به وسیله آنالیز توالی ژن *SrRNA* ۱۶ مشخص گردید. طول کامل این ژن حدود ۱۵۰۰ جفت باز (شکل ۶) تعیین توالی شده و درخت فیلوژنی رسم شد. شکل (۷)، ارتباط فیلوژنتیکی این جدایه‌ها را با باکتری‌های دیگر نشان می‌دهد. بر اساس شناسایی مولکولی سویه C-7 به *نتروکوکوس فاسیوم* و سویه C-10 به *لاکتوکوکوس لاکتیس* نسبت داده شد.

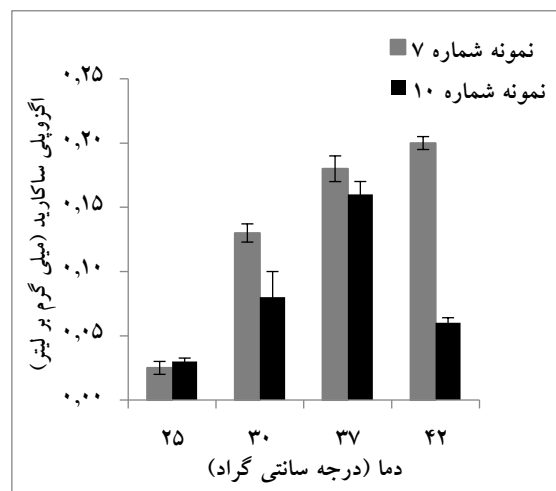


شکل ۶- الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *SrRNA* ۱۶، ۱- سویه C-7، ۲- سویه C-10، ۳- مارکر DNA



شکل ۷- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن *SrRNA* ۱۶ که وابستگی سویه *Lactococcus lactis* strain C-10 (شماره دستیابی: KY348702) و *Enterococcus faecium* strain C-7 (شماره دستیابی: KY348701) را با سویه‌های دیگر نشان می‌دهد.

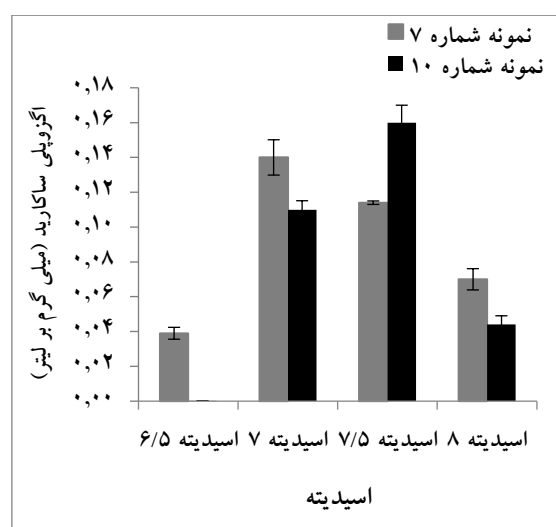
۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای جدایه C-7 در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گزارش گردید (شکل ۴).



شکل ۴- اثر تغییرات دما بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط جدایه‌های منتخب

تأثیر اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید

اثر ۴ اسیدیته ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ بر تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط جدایه‌های منتخب بررسی گردید. بیشترین میزان تولید در اسیدیته ۷ و ۷/۵ مشاهده شد. بین میزان تولید در این دو اسیدیته اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. کمترین مقدار تولید در اسیدیته ۶/۵ گزارش گردید (شکل ۵).



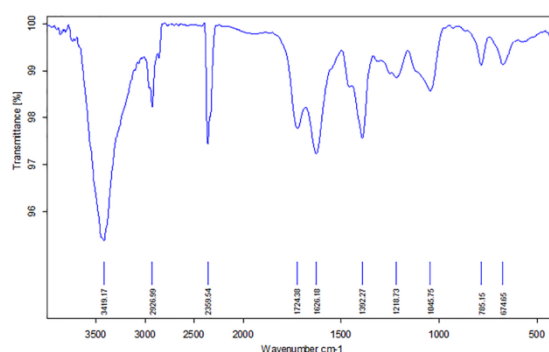
شکل ۵- اثر تغییرات اسیدیته بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید

¹Polymerase Chain Reaction

آگار جداسازی و شناسایی شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که تمام جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید اگزوپلی ساکارید (باند شده و رها شده) را دارند که برای اولین بار جداسازی اگزوپلی ساکارید از چند محصول لبنی محلی استان کرمان گزارش شد. تولید اگزوپلی ساکارید سنتز شده زمانی که باکتری‌ها در شرایط رشد بهینه نیستند، بین ۰/۰۴۵ تا ۰/۳۵ میلی گرم بر لیتر است (۲۵). در مطالعه‌ای که توسط تالون و همکاران (۲۰۰۳) صورت گرفت، میزان اگزوپلی ساکارید حاصل از لاکتوباسیلوس پلانتاروم^۱ (۱۳۵-۱۴۰) میلی گرم بر لیتر گزارش شد (۱۷). بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه تولید اگزوپلی ساکارید، بر روی یک سویه مشخص انجام شده است. برای مثال از دانه کفیر فقط یک سویه تولیدکننده اگزوپلی ساکارید (کفیران) را جدا کردند (۱۶). در بررسی دیگر فقط از یک سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم که از ذرت جدا شده بود، دو نوع اگزوپلی ساکارید جداسازی شد (۱۷). اگزوپلی ساکاریدها در آب حل شده و خواص ژله‌ای و قوام‌دهندگی ایجاد می‌کنند. همچنین در مواد غذایی به عنوان امولسیون‌کننده، پایدارکننده، سوسپانسیون ذرات، کنترل کریستالیزاسیون، تشکیل فیلم و انکپسوله کردن به کار می‌روند (۲۴). در بررسی آدایوتائو^۲ و همکاران (۲۰۲۴)، نشان داده شد که اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط پدیدکوکوس/اسیدی لاکتیسی^۳ از نوع هتروپلمیری بوده و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی مطلوبی است. باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان تولیدکنندگان اگزوپلی ساکارید، از پتانسیل بالایی به عنوان استارترهای کاربردی در فرآورده‌های تخمیری برخوردار هستند و این سویه نیز به عنوان یک کشت آغازگر مناسب برای تولید محصولات تخمیری غنی شده با اگزوپلی ساکارید، معرفی گردید. نتایج آنالیز ترکیب معدنی نشان داد که مقادیر کلسیم، منیزیم و پتاسیم در طول دوره نگهداری دچار نوسان بوده که بیانگر ماهیت پویای این محصولات تخمیری است. در مجموع، این فرآورده‌ها دارای ویژگی‌های تغذیه‌ای مطلوب بوده و می‌توانند به عنوان غذاهای فراسودمند و طبیعی برای افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز و همچنین افراد حساس به فرآورده‌های لبنی مورد

نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز

در طیف مادون قرمز پیک ۱۷۲۴ مربوط به گروه عاملی آلدئید مشاهده شده که می‌تواند مربوط به عامل قندی باشد (شکل ۸). سایر گروه‌های عاملی مشاهده شده حاصل از اگزوپلی ساکارید خالص شده شامل گروه هیدروکسیل (OH) پیک مشاهده شده در ۳۴۱۹ و گروه نیتریل یا آلکینی در ۲۳۵۹ می‌باشند. همچنین پیک‌های مربوط به هیدروژن‌های آلکانی در ۲۹۲۶ مشاهده گردید.



شکل ۸- طیف‌سنجی مادون قرمز اگزوپلی ساکارید خالص شده

بحث

در این پژوهش از ۴۶ نمونه از محصولات لبنی سنتی، پس از خالص‌سازی و بررسی خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی، ۲۰ جدایه انتخاب گردیده و تولید اگزوپلی ساکارید اندازه‌گیری شد. اگزوپلی ساکاریدها توسط باکتری‌ها بر حسب وضعیت خارج سلولی یا داخل سلولی به دو روش سنتز می‌شوند. فرایند بیوسنتز تعداد کمی از هموپلی ساکاریدها مثل دکستران، موتان، آلترنان و لوان، خارج سلولی است و نیازمند سوسترای ساکارز می‌باشد که آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز در واکنش پلیمریزاسیون درگیرند. انرژی مورد نیاز برای پلیمریزاسیون از هیدرولیز ساکارز تأمین می‌شود. این هموپلی ساکاریدها در خارج از سلول توسط گلیکان سوکراز خارج سلولی متعلق به رده گلیکوترانسفرازها سنتز می‌شود. هتروپلی ساکاریدها در اثر پلیمریزاسیون پیش‌سازهای واحدهای تکراری در سیتوپلاسم تشکیل می‌شوند (۲۴، ۲۰۱). در این تحقیق باکتری‌های اسید لاکتیکی موکوئیدی و طنابی شکل از شیر و ماست گوسفندی با کشت بر روی محیط ام. آراس

¹ *Lactobacillus plantarum*

² Adebayo-Tayo

³ *Pediococcus acidilactici*

بیشترین مقدار تولید در نمونه‌ها مشاهده گردید. نتایج حاصل از این پژوهش بیان می‌دارد که بیشترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید میکروبی توسط باکتری‌ها ممکن است در فازهای مختلف چرخه رشد اتفاق بیفتد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که لاکتوباسیل‌ها در زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در مرحله رشد لگاریتمی می‌باشند. پاور^۱ و همکاران (۲۰۱۷) بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند (۳۱). بر اساس نتایج این تحقیق هر چه اسیدیته به حالت قلیایی و اسیدی نزدیک‌تر می‌شود، میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید کاهش می‌یابد. پاور و همکاران (۲۰۱۷) نیز ثابت کردند که میزان اگزوپلی‌ساکارید در باکتری‌هایی که از خاک‌های نمکی استخراج کردند، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۷/۵ بیشترین مقدار را داشته است (۳۱). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، سویه‌هایی که در محدوده اسیدیته ۵/۷ تا ۷ قرار دارند، از توانایی بالاتری در تولید اگزوپلی‌ساکارید برخوردار هستند.

نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع محدود مطالعات مرتبط در ایران در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید، این پژوهش به شناسایی باکتری‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی استان کرمان و تعیین ویژگی‌های اگزوپلی‌ساکاریدهای تولیدی توسط آن‌ها منجر شد. یافته‌های به دست آمده نشان‌دهنده پتانسیل کاربردی این سویه‌های باکتریایی به عنوان منابع طبیعی گروپلی‌ساکارید در صنایع غذایی است؛ به ویژه به عنوان پایدارکننده‌های زیستی و ترکیباتی با خواص سلامت‌بخش، از جمله اثرات پری‌بیوتیکی. در ادامه، بررسی مولکولی ژن‌های مؤثر در بیوسنتز اگزوپلی‌ساکارید در سویه‌های منتخب و امکان کلون‌سازی و بیان این ژن‌ها در میزبان‌های باکتریایی مناسب، به عنوان دستورالعمل‌های پیشنهادی برای تحقیقات آتی ارائه می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

استفاده قرار گیرند (۲۶). برخی از مطالعات نشان داده که تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری‌های اسید لاکتیک ممکن است تحت تأثیر شرایط محیط کشت (منبع کربن و منبع نیتروژن) و شرایط گرمخانه‌گذاری قرار داشته باشد (۲۷، ۲۸، ۲۹). در این مطالعه از محیط کشت ام.آ.راس برات استفاده شد تا فنوتیپ‌های تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید افزایش یابد. مطالعات انجام شده در اکثر کشورها فقط در زمینه تولید اگزوپلی‌ساکارید متمرکز بوده و نوع و ماهیت آن مشخص نشده است. به عنوان مثال در نیجریه سویه‌های باکتری‌های لاکتیک‌اسید را از برخی محصولات لبنی تخمیری و غیرلبنی تخمیری برای تولید اگزوپلی‌ساکارید غربال کردند. این محققان به جز لاکتوباسیل‌ها میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط لکونوستوک‌ها را بررسی نمودند (۷). همین‌طور از داهی (محصول تخمیری لبنی هندی) و شیر تخمیر شده در هند چندین باکتری اسیدلاکتیک تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید جداسازی شد که نوع آن مشخص نبود و تماماً لاکتوباسیل نبودند، بلکه برخی از سویه‌های لکونوستوک و / انتروکوکوس تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید نیز جداسازی گردید (۳۰). پاتیل و همکاران (۲۰۱۵) اگزوپلی‌ساکاریدها را از محصولات لبنی جداسازی نموده، دو گونه لاکتوباسیلوس را شناسایی کردند، ولی میزان اگزوپلی‌ساکارید بررسی نشد (۱۳). در این پژوهش نوع، میزان تولید و ماهیت اگزوپلی‌ساکارید توسط هر سویه مشخص گردید. در این پژوهش، سویه‌های منتخب بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون داشته و پس از آن میزان تولید کاهش یافته است. محققین دیگری دریافته‌اند که تولید اگزوپلی‌ساکارید در بیشتر باکتری‌ها بعد از توقف رشد افزایش می‌یابد (۲۵). از سوی دیگر پژوهشگران دیگری گزارش نمودند که بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید در فاز سکون بوده، زمانی که پارامترهای فیزیولوژیکی مانند (اکسیژن و اسیدیته) برای تولید بیومس در بالاترین مقدار خود بوده است (۲۱). در این تحقیق با توجه به شرایط ایجاد شده، تولید اگزوپلی‌ساکارید در دو سویه موردنظر از ابتدای فاز لگاریتمی شروع شده و در فاز سکون به بیشترین مقدار خود رسیده است که در بازه زمانی (۶۰-۲۰ ساعت)، تولید اگزوپلی‌ساکارید روند افزایشی داشته و پس از آن کاهش تولید و در زمان (۵۶-۳۲)

¹Pawar

References

1. Tajabadi Ebrahimi M, Khodabakhsh M, Sharifan A, Hashemi M, Hosseini E, bahrami H. Investigation of Exopolysaccharide production by isolated lactic acid bacterium from Iranian traditional cheese and yoghurt. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2014;3(12):37-45. [In Persian]
2. Abarquero D, Renes E, Fresno JM, Tornadijo ME. Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2022;57(1):16-26.
3. Zipori D, Brychey M, Weiss A, Schmidt H. Selection and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria as potential food starter cultures. *Food Microbiology*. 2025:104862.
4. Netrusov AI, Liyaskina EV, Kurgaeva IV, Liyaskina AU, Yang G, Revin VV. Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. *Microorganisms*. 2023;11(6):1541. doi: 10.3390/microorganisms11061541.
5. Liu W, Wei Y, Xiang R, Dong B, Yang X. Lactic acid bacteria exopolysaccharides unveiling multifaceted insights from structure to application in foods and health promotion. *Foods*. 2025;14,823
6. Nguyen HT, Pham TT, Nguyen PT, Le-Buanec H, Rabetafika HN, Razafindralambo HL. Advances in microbial exopolysaccharides: present and future applications. *Biomolecules*. 2024 Sep 16;14(9):1162.
7. Ma C, Zheng X, Zhang Q, Renaud SJ, Yu H, Xu Y, Chen Y, Gong J, Cai Y, Hong Y, Li H. A postbiotic exopolysaccharide synergizes with *Lactobacillus acidophilus* to reduce intestinal inflammation in a mouse model of colitis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025; 291:138931.
8. Singha TK. 2012. Microbial extracellular polymeric substances: production, isolation and applications. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2012; 2(2):81-271.
9. Madiedo P, Reyes-Gavilan CG. Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 2005;88: 843-856.
10. Xu X, Peng Q, Zhang Y, Tian D, Zhang P, Huang Y, Ma L, Qiao Y, Shi B. A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties. *Food and Nutrition Research*. 2020; 64:3744.
11. Troiano F, Vicini S, Gioventu E, Lorenzi PF, Improta CM, Cappitelli F. A methodology to select bacteria able to remove synthetic polymers. *Polymer Degradation and Stability*. 2014; 107: 321-327.
12. Pallavi J, Rohit S, Bhagwan S, Prakash SB. Microbial exopolysaccharide: natural modulators of dairy products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014;4(10): 105-109.
13. Patil P, Wadehra A, Munjal K, Behare P. Isolation of exopolysaccharides producing Lactic acid bacteria from dairy products. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. 2015; 34(4): 4-280.
14. Olasupo NA, Schillinger U, Narbad A, Dodd H, Holzapfel WH. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *International Journal of Food Microbiology*. 1999;53(2): 52-141.
15. Whitfield C. Bacterial extracellular polysaccharides. Springer Berlin Heidelberg. 1998; 34: 415-420.
16. Hamet MF, Piermaria JA, Abraham AG. Selection on EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *Food Science and Technology*. 2015; 25: 1-7.

17. Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Research in Microbiology. 2003;154(10): 705-712.
18. Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Zadi TM, Kuliyeve A, De Melo Franco BDG, Chobert JM, Haertlé T. Evaluation of antimicrobial activity probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control. 2013; 30:631-641.
19. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith V. Calorimetric Method for Determination of Sugars and Related substances. Analytical Chemistry. 1956; 28:350-356.
20. Han QH, Liu W, Li HY, He JL, Guo H, Lin S, Zhao L, Chen H, Liu YW, Wu DT, Li SQ, Qin W. Extraction Optimization, Physicochemical Characteristics, and Antioxidant Activities of Polysaccharides from Kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch). Molecules. 2019; 24:461.
21. Manca MC, Lama L, Improta R, Esposito E, Gambacorta A, Nicolaus B. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. Applied and Environmental Microbiology. 1996;62(9): 3265–3269.
22. Pawar ST, Bhosale AA, Gawade TB, Nale TR. Isolation, screening and optimization of exopolysaccharide producing bacterium from saline soil. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2017;3(3):24-31.
23. Wang J, Zhao X, Tian Z, He C, Yang Y, Yang Z. Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 from Tibet kefir. Polish Journal of Food Nutrition Sciences. 2015;65(4):269-280.
24. Bhandary T, Kurian C, Muthu M, Anand A, Anand T, Paari KA. Exopolysaccharides Derived from Probiotic Bacteria and their Health Benefits. Journal of Pure & Applied Microbiology. 2023;17(1).
25. Moreno J, Vargas-García C, López MJ, Sánchez-Serrano G. Growth and exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* in media containing phenolic acids. Journal of Applied Microbiology. 1999; 86:439-445.
26. Adebayo-Tayo BC, Ogundele BR, Ajani OA, Olaniyi OA. Characterization of lactic acid bacterium exopolysaccharide, biological, and nutritional evaluation of probiotic formulated fermented coconut beverage. International Journal of Food Science. 2024;2024(1): 8923217.
27. Jyoti K, Soni K, Chandra R. Optimization of the production of exopolysaccharide (EPS) from biofilm-forming bacterial consortium using different parameters. The Microbe. 2024; 4:100117.
28. Almalki MA. Exopolysaccharide production by a new *Lactobacillus lactis* isolated from the fermented milk and its antioxidant properties. Journal of King Saud University Science. 2020;32: 1272- 1277.
29. Li D, Li J, Zhao F, Wang G, Qin Q, Hao Y. The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium. Food Chemistry. 2016; 197:367-72.
30. Behare P, Singh R, Singh RP. Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free dahi—an Indian fermented milk. Journal of Dairy Research. 2009;76(01):7-90.
31. Pawar ST, Bhosale AA, Gawade TB, Nale TR. Isolation, screening and optimization of exopolysaccharide producing bacterium from saline soil. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2017;3(3):24-31.