

魏斯氏菌生產胞外多醣體之策略

鄭宇軒、林子涵、王威程、*陳柏庭

南臺科技大學生物與食品科技系

*ptchen@stust.edu.tw

摘要

多醣體 (polysaccharides) 是由單醣類聚合而成的高分子，其分子量分布廣泛。乳酸菌胞外多醣體是乳酸菌在生長時會分泌到胞外的一種糖類複合物。因其具有抗氧化、抑菌等特性，可作為保健品、保濕劑、穩定劑、增稠劑、凝膠劑外和醫療用血漿替代品等。魏斯氏菌所生產之胞外多醣體主要成份為右旋醣酐 (dextran)，在食品、生醫與化妝品產業中具有高度商業應用價值。為能提升胞外多醣體生產量，本研究以回應曲面法分別探討菌種生產胞外多醣體的培養條件與培養基組成。藉由中心混成法的進行最適化設計研究，結果顯示將菌株使用最適化培養基 (酵母萃取物 8.4% 和蔗糖 11.2%) 靜置培養於 24.5 °C 和 pH 6.45 的環境，其胞外多醣體產量可達 64.79 ± 0.24 g/L。總體而言，本研究成功以最適化培養環境和簡單培養基提升魏斯氏菌的胞外多醣體產量。

關鍵詞：胞外多醣體、魏斯氏菌、回應曲面法、中心混成法

Strategy for Exopolysaccharides Production by *Weissellacibaria*

Yu-Xuan Zheng, Tzu-Han Lin, Wei-Cheng Wang, Chia-Yu Lin, *Po Ting Chen

Department of Biotechnology and Food Technology, Southern Taiwan University of Science and Technology

Abstract

Polysaccharides (EPS) are polymers that are polymerized from monosaccharides and have a wide molecular weight distribution. Exopolysaccharide (EPS) from lactic acid bacteria (LAB) is a carbohydrate compound, which is synthesized and secreted to outside of the cell during the cell growth process. Due to its anti-oxidation, antibacterial, and other characteristics, EPS can be used as health care products, water-retaining agent, stabilizer, thickener, gel and medical plasma alternatives. The main component of EPS secreted from *Weissellacibaria 27* is dextran and has a high potential of commercial application value in the fields of food, cosmetics, and medical industries. To improve the production of EPS, the response surface methodology was used to study the culture conditions and medium composition. The research of optimization design was carried out by using the method of central composite design. The results showed that the yield of EPS could reach 64.79 ± 0.24 g / L when the strain was cultured in an environment of 24.5 °C and pH 6.45 using an optimized medium (8.4% of yeast extract and 11.2% of sucrose). Overall, the production of EPS was successfully improved by *W.cibaria27* with an optimized culture environment and simple medium.

Keywords: Exopolysaccharide, *Weissellacibaria*, Response Surface Methodology, Central Composite Design

壹、前言

生物性高分子是由活的生物體所生產出的聚合物，此類聚合物能以溶解或懸浮方式存在於溶液中而提升液體濃稠度。生物性聚合物來源相當多元[1]。多醣體 (polysaccharides) 是由單醣類聚合而成的高分子，其分子量分佈廣泛。自 1950 年代，科學家開始對於多醣的結構、物化特性與功能進行研究。由於這些的研究，使得細菌多醣體在化妝品、藥物、生物醫學等多個領域具有極大的市場潛力。許多細菌會生產多醣體，可幫助細菌在惡劣的環境下生存或抵抗宿主的免疫攻擊。多醣體在特性上將隨著醱酵菌種、單醣種類、分子量大小和鍵結位置不同而產生許多差異。一般來說，微生物所生產的多醣體可區分為三種：(1) 胞內多醣體 (intracellular polysaccharides)：供應微生物生長所需的碳源和能量來源；(2) 結構多醣體 (structural polysaccharides)：該類多醣體將構成微生物菌體的多醣基本型態；(3) 胞外多醣體 (extracellular polysaccharides; exopolysaccharides)：生產在微生物細胞外部的非結晶黏性物[2]。胞外多醣體 (exopolysaccharides, EPS) 是自然界中一些特定微生物在生長過程中分泌到胞外的水溶性多醣體，通常附著在細胞表面或者是分泌到培養基中。

乳酸菌 (Lactic acid bacteria; LAB) 是一種能夠生產乳酸之兼性厭氧菌，該族群均屬於革蘭氏陽性菌，無孢子與無遷移特性[3]。乳酸菌的應用相當廣泛且大部分的乳酸菌屬於 GRAS (generally regarded as safe) 安全菌株。他們所生產許多高價值二次代謝產物普遍應用於各種領域，如乳酸、抗菌成份以及胞外多醣體等[4]。乳酸菌的胞外多醣體是乳酸菌在生長時，分泌到胞外的一種多醣物質，主要可分為會附著在細菌表面的莢膜多醣體 (capsular; CPS) 和生產到胞外但並未與細胞膜產生連結的黏絲型多醣體 (ropy EPS) 或非黏絲型多醣體 (non-ropy EPS) [2, 5]。產自食用級乳酸菌的胞外多醣體用乳製品的製作上可改變乳製品的質感、增加黏性和其他性質[5-8]。按照多醣鍵結位點和鍵結方式的不同，胞外多醣會因菌種不同而在不同生長階段或環境條件產生[9]。因此，有許多研究專注在將乳酸菌胞外多醣體的特性分析與醱酵生產[7, 10-13]。乳酸菌所生產的多醣體，依照其組成成份可大致分成同質多醣體和異質多醣體兩種，均屬於單醣或其衍生物所組成的高分子結構[5, 14]。同質多醣體是僅由一種類型的單醣 (葡萄糖或果糖) 所組成的巨分子物質，依照其結構上的差異性，可歸納成四種類型：(1) α -D-葡聚醣，此型態的多醣體以 α -(1→6) 糖苷鍵結方式構成高分子結構[13, 15]；(2) β -D-葡聚醣，此類多醣體通常以 β -(1→3) 糖苷鍵結方式組成高分子結構[16-18]；(3) 果聚醣，此類型的胞外多醣體主要為左聚醣所組成；(4) 其他類型多醣體，如半乳聚醣[9]。在異質多醣體方面，通常是由兩種以上單醣所組成的高分子[12]。胞外多醣體可溶解或分散在水中，以增加黏稠度或膠凝性能且研究指出它也具有抗腫瘤、抗氧化、自由基移除與提升免疫力等功能，在保健食品上具有高度發展潛力[2]。目前社會上崇尚天然製品的浪潮中，多醣體所衍生的相關原料與產品，逐漸廣泛被應用於各項商業用途中，如食品、製藥、醫療和化妝品等產業。

魏斯氏菌屬 (*Weissella* sp.) 屬於革蘭氏陽性菌、無孢子型態的球狀或桿狀乳酸菌可生產出胞外多醣體、乳酸和乙酸等二次代謝物[12-13]。目前已知的魏斯氏菌屬大部分從食物相關的發酵物中分離出來[16, 19]。此外，魏斯氏菌可提供各式傳統食品，如泡菜、醱酵乳製品、乳酪或其他醱酵食品特殊風味，此可提升醱酵食品獨特性[20]。此外，魏斯氏菌也具有潛在的益生功能，可用於牙周病、預防齲齒等疾病的預防並可作為飲品，因此近年來在研究上受到矚目[12-13, 16, 19, 21]。此外，來自 *W. cibaria* 的多醣體也應用在臨床與化妝品產業開發成維持體重與保濕劑等相關商品。

本實驗室從傳統醱製泡菜中成功篩選到一株可分泌胞外多醣體的魏斯氏菌，經菌種鑑定後，命名為 *W. cibaria* 27。該菌株在含有蔗糖的環境下會生產胞外多醣，其所生產之 EPS 經 1D NMR 與 2D NMR 分析，確認其結構為 α -(1→6)-葡聚醣[22]。與其他乳酸菌相較，魏斯氏菌屬可生產出較高產量的胞外多醣體，如 *W. confusa* Cab3[23] 和 *W. cibaria* MG1[24] 的胞外多醣體的生產量可達 29 和 36 g/L[25]。由於魏斯氏菌屬所分泌的胞外多醣體方面在食品、生醫與化妝品產業中具有商業應用價值。為使其胞外多醣體生產量可達商業用途之目的，我們以回應曲面法來進一步提升 *W. cibaria* 27 胞外多醣體生產量。

貳、實驗材料與方法

一、菌種培養與培養基

W.cibaria 27 是從傳統手工泡菜中篩選而來[22]。從-80°C冰箱中取出 *W.cibaria* 27 之凍菌管，使用已滅菌的竹籤沾取凍菌管中菌液，在 MRS 固態培養基上劃四區畫線進行培養，培養於溫度 30°C 培養箱。待菌種生長至適當大小時，從 MRS 固態培養基上沾取單一菌落接入含有 MRS 液態培養基中（20 ml）的三角錐形瓶中（125 ml），接著放入 30°C 培養箱中進行 16 小時靜置培養，之後再將菌液用於後續實驗，菌液濃度使用分光光度計進行測定，測定波長為 600 nm。MRS 培養基每公升含有 5 克酵母萃取物、20 克葡萄糖、2 克磷酸氫二鉀、5 克醋酸鈉、0.05 克硫酸鎂、2 克檸檬酸銨、10 克牛肉萃取物、10 克蛋白胨。

二、胞外多醣體之純化與分析

胞外多醣體的純化程序依據先前文獻所提供的辦法經小部分修改後進行[25–26]。菌株 *W.cibaria* 27 在靜置培養 24 小時後，將三角錐形瓶中之培養菌液倒入 50 ml 離心管中，使用高速低溫離心機進行離心，離心條件為轉速 7100 xg，4°C，10 min，之後將離心後上清液取出並加入等被體積的三氯乙酸（10%）混合均勻後放入 4°C 冰箱中靜置 6 小時。隨後將靜置後液體以上述離心條件進行低溫高速離心將蛋白質去除，取得含有胞外多醣體的上清液。上清液加入兩倍體積之預冷 95% 乙醇進行充分混合，混合完成後將其放置在 4°C 環境進行酒精沉澱（24 小時）。將酒精沉澱後之樣品進行離心，離心條件為轉速 7100 xg，4°C，10 min。離心完成後將離心管上方之溶液去除，並使用超純水將沉澱物潤洗，潤洗 3~5 次後加入約 15 ml 超純水將多醣體回溶成液體，最後在以冷凍乾燥機（冷凍機溫度:-50°C，乾燥時間 72 小時）將多醣體進行冷凍乾燥和秤重。

三、使用中心混成法進行 EPS 產量最佳化

回應曲面法是進行最適化實驗設計的有用工具，它可以同時探討主要效應（main effect）和不同因子之間的交互作用。使用中心混成法（central composite design）在三個水準因子設定下使用兩個變量並在中央點進行三個重複實驗，進行 11 個實驗。在本實驗設計中，選擇 X_1 和 X_2 或作為因子，EPS 產量用 Y 表示。統計分析系統軟體 JMP5.1（SAS Institute Inc.）用於實驗組數設計與實驗數據的回歸分析。CCD 將變量表示為以下形式的二階多項式模型：

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$$

其中 β_0 是常數， β_0 和 β_2 是每次過程的主要效應變量， β_{12} 是變量之間的交互效應 β_{11} 和 β_{22} 是變量平方的效應， Y 是 EPS 產量， X_1 和 X_2 代表獨立變數因子， ε 是隨機誤差。使用軟體 JMP5.1 對結果進行分析方差（ANOVA）函數。回應曲面三維圖是使用統計分析軟體 STATISTICA 6.0（StatSoft Inc.）繪製。

參、結果與討論

一、初始接種量對 EPS 產量的影響

當微生物進行繼代培養，其接種濃度將會影響到菌體醱酵狀態和多醣體生產量。將菌株 *W.cibaria* 27 接種在 MRS 培養基中靜置隔夜培養（30°C、16 小時）。培養後菌液依照六組不同起始接種濃度設定分別接種入含有 2% 蔗糖的 MRS 培養基進行多醣體生產，培養時間為 24 小時，每個實驗均進行三重覆。實驗結果顯示（Table 1），當起始接種濃度為 0.03（OD₆₀₀）時，多醣體濃度可達到 8.37±0.18 g/L，但隨著接種量越來越高時，其多醣體的生產量也逐漸降低。因此，在後續實驗中 *W.cibaria* 27 的起始接種濃度設定為 0.03。

表 1 菌種起始接種濃度對於 EPS 生產量之評估

實驗組別	初始接種濃度 (OD ₆₀₀)	EPS 生產量 (g/L)
1	0.01	7.65±0.12
2	0.03	8.37± 0.18
3	0.05	7.61± 0.21
4	0.08	6.81± 0.15
5	0.1	6.98± 0.23
6	0.3	4.96± 0.17

二、培養溫度與 pH 最適化之探討

除培養基組成外，乳酸菌的培養環境也是影響多醣體生產量的重要因素，如初始 pH 值、培養溫度都會影響多醣體的生產量。為探討最適化培養環境，我們選擇培養溫度和初始 pH 值作為環境因子並分別設定了三個水準因子來進行設評估（表 2）。使用中心混成實驗設計法（Central Composite Design; CCD）設計 11 組實驗組別來生產胞外多醣體（表 3）。將經隔夜培養的菌液以初始菌液濃度為 0.03（OD₆₀₀）轉入 11 支含有 2% 蔗糖的 MRS 培養基（30 mL）的 125 mL 三角錐形瓶中。再依照實驗組別設計分別放入不同環境設計的培養箱中進行靜置培養 24 小時，之後將樣品進行多醣體純化程序並把分析數據帶入表 3 並使用統計軟體 JMP5.1 進行統計分析，得到方差分析表（Analysis of Variance, ANOVA）（表 4）並依據變異數參數數據（表 5）得到二階多項式模型如下：

$$Y = 6.97 - 3.86X_1 - 3.63X_2 - 1.52X_1^2 - 2.72X_2^2 - 0.58X_1X_2$$

其中，溫度（ X_1 ）和二階初始 pH 值（ X_2^2 ）的參數具有顯著意義（ P value<0.05），但溫度與初始 pH 值間並無顯著的交互作用（ X_1X_2 ， P value=0.4576）。將溫度與初始 pH 值的回歸模型繪製成回應曲面三維圖（圖 1），結果顯示，胞外多醣體的最高產量有局限在本次實驗範圍中。本次實驗數據在決定係數（coefficient of determination; R^2 ）為 $R^2=0.92$ 的水平下預測溫度為 24°C 和 pH 6.45 的培養環境下 EPS 可達到最大產量為 10.19 g/L。將此預測條件進行多醣體生產測試，實驗結果為 9.82 ± 0.23 g/L，與預測多醣體產量誤差約為 3.6%，該結果相當接近預測值，代表此次實驗模型具有合理性。本次實驗結果與先前研究使用 *W. cibaria* 27 生產 EPS 的培養條件接近（22°C、pH 6.2）[22]。因此，後續實驗便依照實驗結果的培養條件（24°C、pH 6.45）來進行探討多醣體生產培養基。

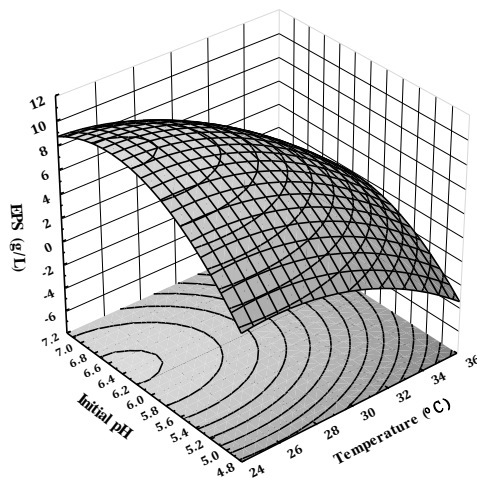
圖 1 回應曲面圖呈現培養溫度和初始 pH 值對 *W.cibaria* 27 胞外多醣體產量的影響

表 2 用於 CCD 之環境篩選因子設計基準

環境因子	水準因子設定		
	-1	0	+1
溫度 (°C) (X ₁)	25	30	35
初始 pH 值 (X ₂)	5	6	7

表 3 使用 CCD 進行培養環境最適化結果

實驗組別	培養溫度 (°C)(X ₁)	初始 pH 值(X ₂)	多醣體生產量(g/L)(Y)
1	25	6	9.27
2	25	5	5.44
3	30	6	8.33
4	35	6	1.947
5	30	6	8.31
6	30	5	1.14
7	35	5	0.447
8	25	7	8.75
9	30	6	8.5
10	35	7	1.427
11	30	7	7.68

表 4 溫度與 pH 之模型回歸方差分析表 (ANOVA)

Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-Ratio	Prob>F
Model	117.66	5	23.53	11.239	0.0095
Error	10.48289	5	2.10		
Lack of fit	10.46	3	3.49	319.91	
Pure error	0.02	2	0.01		
C. Total	128.14	10			

表 5 溫度與 pH 之模型回歸參數估計

Factor	Estimate	Standard error	P value
Intercept	6.97	1.03	0.0011
X ₁	-3.86	0.93	0.0091
X ₂	-3.63	1.91	0.1161
X ₁ ²	-1.52	0.91	0.1556
X ₂ ²	-2.72	0.91	0.0305
X ₁ X ₂	-0.58	0.72	0.4576

三、多醣體生產培養基質配方最適化

先前測試顯示 (data not shown)，蔗糖 (sucrose) 與酵母萃取物 (yeast extract) 是影響多醣體生產的關鍵營養因子。將此兩營養成分設定出三個不同濃度的水準因子 (表6)，再使用中心混成實驗設計法設計10組不同培養基組成 (表7)。將經隔夜培養的菌液以初始濃度為0.03 (OD₆₀₀) 分別轉入10支含有不同培養基組成設計 (30 mL) 的125 mL三角錐形瓶中進行靜置培養 (24小時)，培養溫度為24°C和初始pH為6.45，經靜置培養後菌液以離心機進行菌液分離和後續多醣體純化程序。將分析後數據帶入表7使用統計軟體JMP5.1進行統計分析，得到方差分析表 (表8) 並依據變異數參數數據 (表9) 得到二階

多項式模型如下：

$$Y = 63.74 + 7.40X_1 + 5.09X_2 - 17.18X_1^2 - 8.92X_2^2 + 3.15X_1X_2$$

其中，蔗糖 (X_1)、酵母萃取物 (X_2)、二階蔗糖 (X_1^2) 和二階酵母萃取物 (X_2^2) 的參數具有顯著意義 (P value<0.05)，但蔗糖與酵母萃取物彼此之間的交互作用並不顯著 (X_1X_2 , P value=0.1161)。將蔗糖與酵母萃取物的回歸模型繪製成回應曲面三維圖 (圖2)，結果顯示，胞外多醣體的最高產量有局限在本次實驗範圍中。依據本次統計分析結果，預測當蔗糖與酵母萃取物的濃度分別達到11.2%和8.4%時，多醣體產量可達65.01 g/L的回應預測數據依照上面預測建議條件進行多醣體生產評估，實驗結果顯示多醣體產量為64.79 ± 0.24 g/L與預測值相當接近，誤差僅有0.33%。將此結果對應至本次實驗數據決定係數 (R^2)，在 $R^2=0.98$ 的統計水平下，顯示本次實驗具有合理性。先前研究中，使用 *W. cibaria* 菌株都使用 MRS 添加蔗糖來探討 EPS 生產，產量分別為 9.8 (*W. cibaria*)，25.66 (*W. cibaria* 27) 和 36.4 (*W. cibaria* MG1) g/L 之間，培養環境也不相同，如表 10 所示。然而，MRS 的組成複雜且成本昂貴，但若作為 EPS 生產培養基將不具有經濟效應。本研究中，我們使用 *W. cibaria* 27 以最適化培養基來生產 EPS，除產量可提升至 64.79 ± 0.24 g/L 與使用先前文獻使用含有 6% 蔗糖的 MRS 培養基相比，產量可高出約 2.5 倍 (表 10)。若再與 *W. cibaria* MG1 和 *W. cibaria* 相較，產量分別約可高出 1.77 和 6.6 倍，培養基也僅需要酵母萃取物和蔗糖作為營養源，其培養基組成簡單且成本相對也低廉。

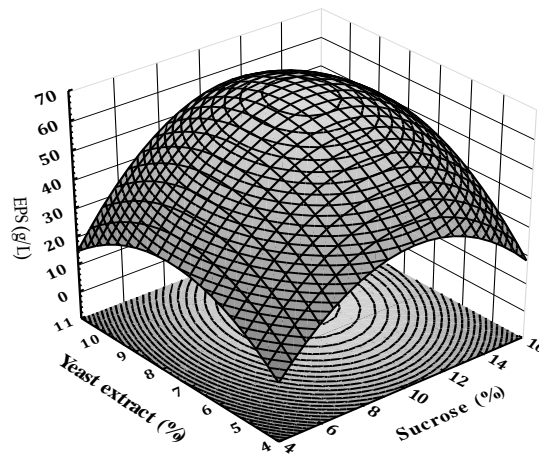


圖 2 回應曲面圖呈現蔗糖和酵母萃取物對 *W.cibaria* 27 胞外多醣體產量的影響

表 6 用於 Central Composite Design 之營養因子設計基準

營養因子	營養因子設定		
	-1	0	+1
蔗糖 (%) (X_1)	5	10	15
酵母萃取物 (%) (X_2)	5	7.5	10

表 7 使用 CCD 進行培養環境最適化結果

實驗組別	蔗糖 (%) (X_1)	酵母萃取物 (%) (X_2)	多醣體生產量 (g/L)
1	15	5	35.31
2	5	5	28.71
3	5	7.5	35.99
4	10	7.5	64.24
5	15	10	54.13

(下頁續)

實驗組別	蔗糖(%)(X ₁)	酵母萃取物(%)(X ₂)	多醣體生產量(g/L)
6	10	7.5	65.74
7	10	10	56.31
8	15	7.5	54.62
9	10	5	50.82
10	5	10	34.94

表 8 培養基之模型回歸方差分析 (ANOVA)

Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-Ratio	Prob>F
Model	1545.12	5	309.03	31.21	0.0027
Error	39.61	4	9.90		
Lack of fit	38.49	3	12.83		
Pure error	1.125	1	1.13		
C. Total	1584.73	9			

表 9 培養基之模型回歸參數估計

Factor	Estimate	Standard error	P value
Intercept	63.74	1.88	<0.0001
X ₁	7.40	1.28	0.0045
X ₂	5.09	1.28	0.0166
X ₁ ²	-17.18	2.06	0.0011
X ₂ ²	-8.92	2.06	0.0124
X ₁ X ₂	3.15	1.57	0.1161

表10 文獻中 *W. cibaria* 菌株在不同條件下所生產的胞外多醣體產量

菌種	溫度(°C)	pH	培養基	EPS 產量(g/L)	文獻
<i>W. cibaria</i> 27	24	6.45	8.4% 酵母萃取物+11.2% 蔗糖	64.79	本研究
<i>W. cibaria</i> 27	22	6.2	MRS+6% 蔗糖	25.66	[22]
<i>W. cibaria</i> MG1	30	ND	MRS+10% 蔗糖	36.4	[24]
<i>W. cibaria</i>	37	7.3	MRS+8% 蔗糖	9.8	[12]

肆、結論

多醣體的應用廣泛，可運用在食品、醫療和化妝品等產業。*W. cibaria* 27 是一株可藉由蔗糖來誘導生產多醣體的乳酸菌。為了提升胞外多醣體生產量，我們採用中心混成實驗設計法將 *W. cibaria* 27 的 EPS 生產條件與產量進行最適化測試與評估。實驗結果顯示 *W. cibaria* 27 最佳生產 EPS 條件為溫度 24°C 和初始 pH 6.45。而當培養基組成為蔗糖 11.2% 和酵母萃取物 8.4% 時，多醣體產量可達 64.79 ± 0.24 g/L。與先前文獻魏斯氏菌數最高產量相比 (*W. cibaria* MG1; 36 g/L) [25]，產量高出 1.77 倍。結果說明，使用中心混成實驗設計法可以推估出最佳的培養環境和培養基組成。最終，本研究策略說明乳酸菌 *W. cibaria* 27 結合多醣體生產策略可大幅提升多醣體生產量，使其可達到工業化之應用潛力。

參考文獻

- [1] S. E. Harding, M. P. Tombs, G. G. Adams, B. S. Paulsen, K. T. Inngjerdigen and H. Barsett. (2017). *An introduction to polysaccharide biotechnology* (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- [2] A. D. Welman and I. S. Maddox. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.*, 21, 269–274.
- [3] K. Hofvendahl and B. Hahn–Hägerdal. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 87–107.
- [4] R. Mazzoli, F. Bosco, I. Mizrahi, E. A. Bayer and E. Pessione. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol. Adv.*, 32, 1216–1236.
- [5] H. L. Rawson and V. M. Marshall. (1997). Effect of ‘ropy’ strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *Int. J. Food Sci.*, 32, 213–220.
- [6] G. W. Robijn, R. G. Gallego, D. J. van den Berg, H. Haas, J. P. Kamerling and J. F. Vliegthart. (1996). Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydr. Res.*, 288, 203–218.
- [7] I. Ayala-Hernández, A. Hassan, H. Goff, R. M. de Orduña and M. Corredig. (2008). Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. *Int. Dairy J.*, 18, 1109–1118.
- [8] A. Hassan, J. Frank, K. Schmidt and S. Shalabi. (1996). Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *Int. J. Dairy Sci.*, 79, 2091–2097.
- [9] P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz and P. Zoon. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 12, 163–171.
- [10] P. Kanmani, N. Yuvaraj, K. Paari, V. Pattukumar and V. Arul. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresour. Technol.*, 102, 4827–4833.
- [11] E. Zannini, D. M. Waters, A. Coffey and E. K. Arendt. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 1121–1135.
- [12] D. S. Vasanthakumari, S. Harikumar, D. J. Beena, A. Pandey and K. M. Nampoothiri. (2015). Physicochemical characterization of an exopolysaccharide produced by a newly isolated *Weissella cibaria*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 176, 440–453.
- [13] R. Z. Ahmed, K. Siddiqui, M. Arman and N. Ahmed. (2012). Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGDEX3. *Carbohydr. Polym.*, 90, 441–446.
- [14] P. Ryan, R. Ross, G. Fitzgerald, N. Caplice and C. Stanton. (2015). Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct.*, 6, 679–693.
- [15] D. Das and A. Goyal. (2014). Characterization and biocompatibility of glucan: A safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. *J. Sci. Food Agric.*, 94, 683–690.
- [16] M. J. Kim, H. N. Seo, T. S. Hwang, S. H. Lee and D. H. Park. (2008). Characterization of exopolysaccharide (EPS) produced by *Weissella hellenica* SKkimchi3 isolated from kimchi. *J. Microbiol.*, 46, 535–541.

- [17] M. Dols-Lafargue, H. Y. Lee, C. Le Marrec, A. Heyraud, G. Chambat and A. Lonvaud-Funel. (2008). Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 4079–4090.
- [18] G. Garai-Ibabe, M. T. Dueñas, A. Irastorza, E. Sierra-Filardi, M. L. Werning, P. López, A. L. Corbí and P. F. De Palencia. (2010). Naturally occurring 2-substituted (1, 3)- β -D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresour. Technol.*, 101, 9254–9263.
- [19] K. J. Björkroth, U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala and P. Vandamme. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 141–148.
- [20] V. Fusco, G. M. Quero, G.-S. Cho, J. Kabisch, D. Meske, H. Neve, W. Bockelmann and C. M. Franz. (2015). The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front. Microbiol.*, 6, 155.
- [21] E. Zannini, A. Mauch, S. Galle, M. Gänzle, A. Coffey, E. K. Arendt, J. P. Taylor and D. M. Waters. (2013). Barley malt wort fermentation by exopolysaccharide-forming *Weissella cibaria* MG1 for the production of a novel beverage. *J. Appl. Microbiol.*, 115, 1379–1387.
- [22] Y.-J. Yu, Z. Chen, P. T. Chen and I.-S. Ng. (2018). Production, characterization and antibacterial activity of exopolysaccharide from a newly isolated *Weissella cibaria* under sucrose effect. *J. Biosci. Bioeng.*, 126, 769–777.
- [23] S. Shukla, Q. Shi, N. H. Maina, M. Juvonen and A. Goyal. (2014). *Weissella confusa* *Cab3* dextranase: Properties and in vitro synthesis of dextran and glucooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 101, 554–564.
- [24] E. Zannini, A. Mauch, S. Galle, M. Gänzle, A. Coffey, E. K. Arendt, J. P. Taylor and D. M. Waters. (2013). Barley malt wort fermentation by exopolysaccharide-forming *Weissella cibaria* MG 1 for the production of a novel beverage. *J. Appl. Microbiol.*, 115, 1379–1387.
- [25] K. M. Lynch, E. Zannini, A. Coffey and E. K. Arendt. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annu Rev Food Sci Technol*, 9, 155–176.
- [26] I.-S. Ng and C. Xue. (2017). Enhanced exopolysaccharide production and biological activity of *Lactobacillus rhamnosus* ZY with calcium and hydrogen peroxide. *Process Biochem*, 52, 295–304.