

Актуальность. Бактериальные экзополисахариды (БЭПС) используются для увеличения нефтедобычи, упаковки продуктов питания, в составе косметических средств, для капсулирования лекарственных препаратов и биоактивных компонентов (антиоксиданты, витамины, пробиотики и т.д.) с целью сохранения их свойств. Перспективно также применение БЭПС в области кормления животных в качестве пребиотиков, носителей биологически активных веществ (БАВ) [1, 2]. Перспектива промышленного применения БЭПС обуславливает необходимость исследований в области биосинтеза бактериальных экзополисахаридов, которые посвящены изучению их состава, структуре, функциональным свойствам и микроорганизмам-продуцентам [3, 4, 5, 6].

Классификация. Внеклеточные БПС могут быть объединены в 4 группы: полисахариды, неорганические полиангидриды, полиэферы и полиамиды [7]. В настоящей работе рассмотрен биосинтез полисахаридов молочнокислых бактерий с перспективой применения их в кормлении сельскохозяйственных животных. Бактериальные внеклеточные полисахариды или экзополисахариды являются самыми распространенными компонентами внеклеточных биополимеров, выполняя различные функции. Согласно функциональным признакам БЭПС классифицируются на несколько категорий: структурные, сорбционные, поверхностно-активные, информационные, с окислительно-восстановительной активностью и нутриционные [8, 9]. С точки зрения химического состава различают гомо- и гетерополисахариды (ГеПС). Глюканы (α -D и β -D), фруктаны и галактаны - основные мономеры в гомополисахаридах, связанных, как правило, β -1,4 или β -1,3 и α -1,2 или α -1,6 связями. Первые наделяют полимеры свойствами жесткости, вторые обеспечивают гибкость молекул. Гетерополисахариды образованы D-глюкозой, D-галактозой, L-рамнозой, например, в случаях N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc) или глюкуроновой кислоты (GlcA). Основные связи мономеров представлены теми же связями, что и гомополисахаридов. Научный и практический интерес представляют биополимеры, ассоциируемые с колониями бактерий и клетками, объединенные термином биопленка [8]. Понятие биопленка объединяет в себе биополимеры, секретируемые клеткой. Основные функции биопленки - адгезия клеток, защитные функции, способность к миграции, жизнь в сообществе с другими клетками (коллективное чувство) [9, 10]. Формирование биопленки зависит от свойств бактериальной клетки, свойств поверхности и состава питательной среды. Биопленки имеют большое значение в различных промышленных процессах, таких как производство бумаги, пищевой промышленности, медицине [11, 12]. Полисахариды молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии (МКБ) - грамм положительные палочки или кокки, неспорообразующие, кислототолерантные, анаэробные или микроаэрофильные бактерии. Широко известные МКБ - *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. Менее известные - *Aerococcus*, *Carnobacterium*,

Enterococcus, Oenococcus, Teragenococcus, Vagococcus и Weissella. Различают гомоферментативные (катаболизм глюкозы по пути Эмбдена-Меергофа-Парнаса: Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus и lactobacilli, как L. acidophilus, L. delbrueckii, L. helveticus, L. salivarius) и гетероферментативные МКБ- (пентозофосфокетотазный путь с производством этанола и молочной кислоты: Leuconostoc, Oenococcus, Weissella и lactobacilli как L. brevis, L. buchneri, L. fermentum и L. reuteri) [13]. Экзополисахариды МКБ подразделяются на 2 гр: гомополисахариды (мономер D-глюкоза или D-фруктоза), как например, декстран, мутан, альтернан, реутеран, пуллулан, леван, инулин, курдлан и гетерополисахариды: геллан, ксантан, кефиран. Декстран образуется в результате гидролиза сахарозы Leuconostoc mesenteroides. Представляет собой гомополисахарид с α -1,6 гликозидной связью основной цепи и α -1,2, α -1,3 и α -1,4 связями боковых цепей. Леван - фруктан со связью β -2,6 основной цепи и β -2,1 боковыми цепями. Продуценты левана Streptococcus salivarius, Streptococcus mutans, Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F, Lactobacillus sanfranciscensis LTH 2590 и Lactobacillus reuteri LB 121. Инулин - фруктоолигосахарид со связью β -1,2. Lactobacillus johnsonii NCC 533 синтезирует высокомолекулярный инулин из сахарозы ферментом инулосахаразы. Также вырабатывается Streptococcus mutans JC2, Leuconostoc citreum CW28 и Lactobacillus reuteri 121. Альтернан. Штаммы производители альтернансахаразы - Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1355, NRRL B-1501 and NRRL B-1498. Альтернан содержит чередующиеся α -1,6 и α -1,3 связи, с α -1,3 ответвлениями. Альтернан обладает хорошей растворимостью, низкой вязкостью и устойчивостью к ферментативному гидролизу. Олигосахара альтернана, полученные деполимеризацией альтерназой используются как низкогликемические подсластители в кондитерском производстве и как пребиотики. Реутеран - водорастворимый глюкан, получаемый реутерансахаразой. С ММ 40 МДа, производится штаммом Lactobacillus reuteri strain LB 121, содержит 70 % α -1,4 и α -1,6 гликозидные связи. Биосинтез гетерополисахаридов происходит на различных стадиях роста МКБ. Выход и тип ГепС регулируется условиями роста. Структурно ГепС могут быть вязкими или слизистыми. Молекулярная масса ГепС в диапазоне 1.0×10^4 и 6.0×10^6 Da [14, 15]. Кефиран - водорастворимый гетерополисахарид, производимый Lactobacillus kefirianofaciens, L. kefirgranum, L. parakefir, L. kefir и L. delbrueckii subsp. bulgaricus. Содержит примерно одинаковое количество глюкозы и галактозы. Кефиран инкапсулирует МКБ, уксуснокислые бактерии и дрожжи, улучшает вязкостно-эластичные свойства кисломолочных гелей [16]. Экзополисахариды способны оказывать огромное влияние на обмен веществ в организме животных и человека, в частности на липидный обмен, концентрацию глюкозы, обмен минеральных веществ, на развитие собственной микрофлоры и др. Обладая большим воздействием на иммунную систему, БЭПС стимулируют выработку антител и формирование иммунного ответа. Показано, что БЭПС

молочнокислых бактерий оказывают положительное влияние на количество иммуноглобулинов и цитокинов [17]. Экзополисахариды молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 (101EP) и *Lactobacillus plantarum* NTU 102 (102EP) стимулируют макрофаги к выработке цитокинов (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) в количестве 5-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Также эти штаммы демонстрируют антиоксидантные свойства: связывание радикалов, хелатирование ионов железа, ингибирование окисления линолевой кислоты [18]. Отмечен положительный эффект БПС кефирных грибков (кефирана) на липидный обмен, артериальное давление, содержание глюкозы в крови [19]. Курдланы и гелланы ингибируют метаболизм липидов, влияют на кишечное брожение и экскрецию жирных кислот у крыс [20]. БЭПС оказывают терапевтическую роль в лечении заболеваний пищеварительной системы [21]. Бета-глюканы бактериального происхождения (*P. Parvulus*) способны стимулировать рост и развитие пробиотических молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, демонстрируя симбиотический эффект. В присутствии БЭПС молочнокислые бактерии вырабатывают ферменты, способные их расщеплять [22]. БЭПС усиливают адсорбцию молочнокислых бактерий к эпителиальным клеткам кишечника [23]. Некоторые виды микроорганизмов, как например, *Bacillus licheniformis* способны продуцировать так называемые анти-биопленки, которые ингибируют формирование биопленки у многих патогенных и непатогенных бактерий [24]. Экзополисахариды молочнокислых бактерий (МКБ) обладают антиопухолевыми, иммуностимулирующими свойствами, снижают содержание и активность холестерина в крови [25]. БЭПС способствует колонизации кишечника пробиотическими бактериями как *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*, усиливают иммунитет против патогенов, снижают содержание мутагенных ферментов, таких как бета-глюкоуронидазу, нитроредуктазу, и хологлицин гидролазу [26]. Кроме того, МКБ вырабатывают бактериоцины, ингибирующие грамположительные патогенные и спорообразующие бактерии. Все эти свойства делают БЭПС микробного происхождения и особенно БЭПС молочнокислых бактерий потенциальными кандидатами для производства функциональных полисахаридов и олигосахаров, привлекая огромный практический интерес. Несколько подробнее рассмотрим основные пути биосинтеза БЭПС клеткой и технологические особенности промышленного производства БЭПС.

Экзополисахариды молочнокислых бактерий. Биосинтез БЭПС. Большинство БЭПС синтезируется внутриклеточно, а затем выделяются в окружающую среду в виде макромолекул. Однако, некоторые БЭПС (в частности, декстран, леван) производятся внеклеточно ферментами, выделяемыми клетками, которые конвертируют субстрат в полимерные молекулы [27]. Бактериальный биосинтез включает потребление субстрата, центральные метаболические пути и синтез полисахаридов (рис.1) [14]. В зависимости от типа субстрата, клетка использует активную или пассивную систему транспортировки, с последующим

внутриклеточным фосфорилированием или прямым периплазматическим окислением. Переплазматическое окисление характерно только ограниченному числу бактерий. В цитоплазме происходит гликолиз субстрата с образованием метаболитов, которые выполняют функции прекурсоров для синтеза малых биомолекул (аминокислоты, моносахариды). Для синтеза полисахаридов необходим биосинтез активных прекурсоров, таких как энергонасыщенные моносахариды, главным образом НДФ-сахара (нуклеозиддифосфат), получаемые фосфорилированием сахаров. Ключевым промежуточным соединением, связывающим анаболические пути образования БЭПС и катаболические пути разложения сахаров, является глюкозо-6-фосфат, в котором поток углерода разветвляется на фруктозо-6-фосфат в сторону продуктов гликолиза, образования биомассы и АТФ и в сторону биосинтеза сахарных нуклеотидов - прекурсоров БЭПС. Фосфоглюкомутаза (ФГМ), участвующая в конверсии глюкозо-6-фосфат в глюкозо-1-фосфат играет важную роль в распределении потоков между катаболическими и анаболическими путями. Рис. 1 - Упрощенная схема конверсии лактозы, галактозы и глюкозы в ЭПС и гликолиза МКБ Глюкоза-1-фосфат является точкой ветвления между образованием УДФ - глюкоза (уридиндифосфат-глюкоза) и ТДФ - глюкоза (тирозиндифосфат-глюкоза) в результате действия УДФ - глюкозо пиррофосфорилазы и ТДФ - глюкозопиррофосфорилазы. Отметим, что эти нуклеосахара служат для формирования различных полисахаридов в клетке и ферменты, участвующие в их формировании являются общими («housekeeping enzymes»). Секреция БЭПС сложный процесс, в котором гидрофильные высокомолекулярные полимеры из цитоплазмы должны пройти сквозь клеточную стенку, не нарушив ее свойства. Несмотря на многообразие молекулярных структур БЭПС, пути биосинтеза и экспорта у большинства грамотрицательных бактерий осуществляются по одному из двух механизмов (рис.2): Wzx-Wzy-зависимый путь, при котором полимерные единицы располагаются на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны, а полимеризация происходит в периплазме и ABC-зависимый путь, в котором полимеризация осуществляется на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны [5, 7]. Рис. 2 - Механизм секреции биополимера а) Wzx-WZY-зависимый путь б) ABC-зависимый путь В Wzx-WZY-зависимой системе (а), повторяющиеся участки синтезируются последовательной передачей моносахаридов от НДФ-сахаров к полипренилфосфатным липидным носителям. Образованные повторяющиеся звенья транспортируются через внутреннюю мембрану, предположительно, на флиппазе (Wzx) в периплазматическую поверхность, где полимеризация протекает под действием полимераз (Wzy). У многих бактерий путь транслокации формируется с помощью полисахарид-сополимеразы (PCP на рисунке), которая определяет длину полимерной цепи и протеина (OPX на рисунке), который образует канал экспорта полисахарида через мембрану на наружную поверхность. В ABC-зависимой

транспортной системе (b) полисахарид полимеризуется на цитоплазматической поверхности внутренней мембраны путем последовательного добавления остатков сахаров на невосстанавливающий конец полимерной цепи. Полимер экспортируется через внутреннюю мембрану посредством ABC-транспортера с последующей его транслокацией через периплазму и наружную мембрану посредством РСР и ОРХ белков. Гены, участвующие в синтезе гетерогенных полисахаридов МКБ обычно организованы в кластеры, которые локализованы или в хромосомах (термофильные МКБ) или в плаزمидах (мезофильные МКБ). Гены ориентированы в одном направлении и транскрибированы как мРНК. Гены в кластерах сгруппированы в 4-х участках: в первом содержатся гены, которые ответственны за продукцию регуляторных белков; второй содержит гены, кодирующие белки, вовлеченные в полимеризацию; третий - содержит гены, кодирующие ферменты, участвующие в биосинтезе мономеров ГетПС и гены четвертого участка, кодируют белки, участвующие в транспорте и полимеризации [28]. Представлена организационная структура ключевых генов и оперонов, участвующих в биосинтезе БПС [7] и сравнение генных кластеров нескольких видов штаммов молочнокислых бактерий [29]. Манипулирование генами, вовлеченными в экспорт, полимеризацию полисахаридов позволяет находить пути повышения продуктивности штаммов, изменения структуры БЭПС. Одним из инструментов в достижении этих целей служат методы управления клеточным метаболизмом или инжиниринг метаболических путей клетки. Стратегия заключается в управление основными элементами, участвующими в синтезе БЭПС (доноры, акцепторы, ферменты - гликозилтрансферазы). Регенерация нуклеосахаров (уридиндифосфат, гуанозиндифосфат и др.), контролируемая глюкозилтрансферазами (зачастую, полученные рекомбинацией от других бактерий) занимает центральное место в данном способе. Акцепторы, участвующие в синтезе полисахаридов генерируются введением ответственных за их синтез ферментов или манипуляцией с оперонами их катаболизма [30]. Применение методов инжиниринга метаболических путей позволяет многократно увеличить продуктивность штаммов [31, 32] и легко воспроизводимы в промышленных масштабах. С целью изменения структуры полимеров применяют метод молекулярного моделирования, который, в частности, использован при конструировании конформационной модели гетерополисахарида и синтеза его бактерией *L. Helveticus* 766 [33]. Дизайн полисахаридов находится на начальном этапе и сводится пока только к контролю структуры БЭПС посредством глюкозилтрансфераз. Потенциал в контроле формирования структуры БЭПС заключен в вводе новых или существующих гликозилтрансфераз в гены МКБ. Например, два гена, *dsr S* и *dsrT5* *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, образующих декстрансахаразу были экспрессированы в *Escherichia coli*. Рекомбинированная *dsrT5* декстрансахараза продуцировала водонерастворимый

декстран, в то время, как нативный декстран *L. mesenteroides* B-512F является водорастворимым. Нерастворимый декстран содержал 50 % α -1,6 связи и 40 % α -1,3, а также α -1,4 связь. Количество α -1,4 связей увеличивалось, когда декстрансахаразе, синтезирующей водорастворимый декстран, добавлялся усеченный фермент, без С-терминала, образующий водонерастворимый декстран [34]. Значительное внимание уделено исследованиям ферментов, участвующих в синтезе полисахаридов, среди которых большое практическое значение имеют ферменты, способные синтезировать БЭПС экзогенно, в частности глюкансахаразы (ГС) и фруктансахаразы (ФС) - трансгликозидазы, участвующие в синтезе альфа-глюканов и фруктанов. Согласно классификации к глюкансахаразам относится декстрансахараза (куда относятся также мутансахаразы и реутерансахаразы) и альтерансахараза; к фруктансахаразам соответственно инулосахараза и левансахараза [35]. Эти ферменты состоят из 4-х структурных доменов от N до С терминалов: 1. Сигнальные пептиды, вовлеченные в секрецию ферментов; 2. N-терминал неизвестного функционального назначения; 3. Каталитический домен, содержащий сахарозосвязывающий и сахарозорасщепляющий домены; 4. С-терминальный домен, который контролирует размер полимера [36]. Механизм действия глюкансахаразы рассмотрен на примере декстрансахаразы: декстран синтезируется из сахарозы под действием фермента декстрансахаразы посредством гликозильных остатков. В синтез вовлечены два нуклеофила активного участка фермента, которые атакуют молекулу сахарозы, образуя два β -гликозильных остатка. При этом из дальнейшего процесса исключается фруктоза, а ее место занимает водород от С6-ОН. С6-ОН остаток одной из групп атакует С1 остаток другой группы, образуя α -1,6 связь. Освободившийся нуклеофил атакует другую молекулу сахарозы, образуя новый гликозил, который С6-ОН группой атакует С1 атом изомальтозной молекулы на растущей декстрановой цепи. Гликозильный и дектранозильные остатки попеременно перемещаются между двумя нуклеофилами в процессе удлинения декстрановой цепи. Удлинение цепи останавливается акцепторной реакцией [37]. Введение другого сахара вместо сахарозы (например, мальтозы) приводит к тому, что декстрансахараза начинает синтезировать олигосахариды. При этом гликозильный остаток переносится с синтеза декстрана на свободную гидроксильную группу этих сахаров, которые называют акцепторами, с образованием олигодекстранов. Многие сахара являются акцепторами, наиболее эффективными и хорошо изученными из них является мальтоза и изомальтоза. Акцептор взаимодействует с ферментом, ковалентно связанным с гликозилем или дектранозилом с высвобождением глюкозы или декстрана от активного участка фермента, образуя ковалентную связь между глюкозой или декстраном и акцептором. Полимеризация завершается, когда акцептор замещает декстран с активного участка фермента. Большое число исследований направлено на

возможность синтеза декстрана определенной длины посредством акцепторного механизма. Образование ответвлений управляется действием второго каталитического домена в ферменте. Фермент, катализирующий декстраны с ответвлениями, содержит дополнительный домен, катализирующий α -1,2 связи [38]. Исследовалось образование декстрансахаразы шт. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F на средах с различными источниками углерода. Установлено, что фермент образуется независимо от источников углерода с одинаковыми свойствами и размерами молекул. мРНК декстрансахаразы были идентичны для различных условий роста клеток. Предположительно, фермент синтезируется путем транскрипции одинаковых генов. Повышение выхода фермента на среде с сахарозой, возможно, вовлекает феномен активации в механизм экспрессии гена [39]. Другим ферментом, способным синтезировать декстран является декстран-декстраназа (EC2.4.1.2) - трансгликозидаза, конвертирующая мальтодекстрины в олигодекстран, продуцируемая штаммами *Gluconobacter oxydans*. Фермент катализирует трансфер α -1,4 связанного гликозила с молекулы донора на акцептор, формируя α -1,6 связь с образованием высокомолекулярного декстрана из мальтодекстринов [40]. Выводы Растущая потребность в полисахаридах микробиологического происхождения требует развития новых способов и технологий производства. Это, в свою очередь, стимулирует углубление наших знаний в области не только синтеза полисахаридов, но и функционирования каждого элемента клетки. Развитие молекулярного моделирования позволяет создать уникальные конструкции, быстрая материализация которых, на наш взгляд, требует создания некоей клеточной «машины», сочетающей в себе различные компоненты клетки и искусственно созданные элементы.