

Received: 2007.09.28
Accepted: 2007.12.03
Published: 2007.12.14

Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego – biosynteza i struktura

Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure and biosynthesis

Sabina Górska, Paweł Grycko, Jacek Rybka, Andrzej Gamian

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Grupa bakterii kwasu mlekowego (LAB) obejmuje cztery rodzaje: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Cechą charakterystyczną tych mikroorganizmów jest wytwarzanie kwasu mlekowego jako głównego produktu fermentacji węglowodanów. LAB odpowiedzialne są m.in. za fermentację produktów spożywczych, wytwarzają również wiele związków hamujących wzrost bakterii patogennych, między innymi egzopolisacharydy (EPS). Praca przedstawia istniejące rodzaje egzopolisacharydów LAB, omówione są również aktualne dane dotyczące ich struktury i biosyntezy.

Słowa kluczowe:

bakterie kwasu mlekowego • *Lactobacillus* • *Lactococcus* • *Streptococcus* • struktury egzopolisacharydów • biosynteza

Summary

The group of lactic acid bacteria (LABs) includes four genera: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Streptococcus*. The most characteristic feature of this group of microorganisms is the production of lactic acid as a main product of carbohydrate metabolism. LABs are responsible for the fermentation of alimentary products and they also produce a variety of agents, among them exopolysaccharides (EPSs), which inhibit the growth of pathogenic bacteria. In this article on the different types of EPSs produced by LABs, data concerning their structure and biosynthesis are presented.

Key words:

lactic acid bacteria • *Lactobacillus* • *Lactococcus* • *Streptococcus* • exopolysaccharide structures • biosynthesis

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11521.pdf

Word count: 2826

Tables: 7

Figures: 3

References: 96

Adres autora:

prof. dr hab. Andrzej Gamian, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław;
e-mail: rybka@iitd.pan.wroc.pl

Bakterie określane nazwą bakterii kwasu mlekowego (lactic acid bacteria – LAB) są pod względem fizjologicznym bardzo różnorodną grupą organizmów. Do LAB należą Gram-dodatnie niesporulujące pałeczki i ziarniaki. Cechą charakterystyczną tych mikroorganizmów jest wytwarzanie kwasu mlekowego jako głównego produktu fermentacji węglowodanów. Dotychczas grupa LAB obejmowała cztery rodzaje: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, od 1985 r. rodzaj *Streptococcus* podzielony jest na *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Vagococcus*.

LAB są odpowiedzialne za fermentację m.in. mleka, mięsa, warzyw czy zbóż. Wytwarzają wiele związków hamujących wzrost bakterii patogennych, takich jak dobrze już poznane bakteriocyny np. lantibiotyki; kwasy organiczne np. mlekowy, octowy czy propionowy; nadtlenek wodoru; dwutlenek węgla; związki aromatyczne; kwasy tłuszczowe. Od niedawna do grupy tej zalicza się także egzopolisacharydy wytwarzane przez bakterie kwasu mlekowego [69,70].

Egzopolisacharydy bakteryjne (EPS) to wielkocząsteczkowe, długolłańcuchowe liniowe biopolimery, często zawierające łańcuchy boczne, zbudowane z powtarzających się jednostek węglowodanowych połączonych wiązaniami α -i β -glikozydowymi. Są one związane z powierzchnią komórki, tworząc otoczkę (capsular exopolysaccharide – CPS), bądź są wydzielane na zewnątrz komórki w postaci śluzu (slime exopolysaccharide) [80]. Innym typem polisacharydów są tzw. WPS (cell wall polysaccharide – WPS), które w przeciwieństwie do egzopolisacharydów nie są wydzielane do otoczenia i są związane kowalencyjnie bądź jonowo z warstwą peptydoglikanu [16].

Egzopolisacharydy pełnią w komórce bakteryjnej różnorodne funkcje, m.in. stanowią ochronę przed niekorzystnym wpływem środowiska (wysoka/niska temperatura, wysokie/niskie pH i inne), ochronę przed czynnikami biologicznymi (bakteriofagi, odpowiedź immunologiczna organizmu gospodarza) czy też pomagają w zasiedleniu środowiska.

EGZOPOLISACHARYDY BAKTERII KWASU MLEKOWEGO

Szczepy bakterii kwasu mlekowego zdolne są do wytwarzania EPS w dużych ilościach. Prowadzone dotychczas badania strukturalne dotyczyły głównie EPS szczepów izolowanych z fermentowanych produktów spożywczych; jak dotąd tylko kilka opisanych struktur pochodzi od szczepów zasiedlających ludzki przewód pokarmowy [45,47].

Ze względu na skład cukrowy egzopolisacharydy LAB można podzielić na dwie grupy: homopolisacharydy (HoPS) i heteropolisacharydy (HePS).

Homopolisacharydy – składają się z monosacharydów jednego typu – D-glukopiranozy lub D-fruktofuranozy. Syntetyzowane są przez zewnątrzkomórkowe glikanosacharazy (glycansucrases) będące transferazami, wykorzystującymi sacharozę jako glikozydowy donor glukozy lub fruktozy. Wyróżnia się cztery typy homopolisacharydów LAB: α -D-glukany, β -D-glukany, fruktany oraz inne.

1. α -D-glukany

- Dekstrany – złożone z reszt glukozy połączonych głównie wiązaniami α -1,6 glikozydowymi z różnym stopniem rozgałęzienia (w zależności od gatunku, warunków hodowli) przy atomie węgla w pozycji 3, rzadko 2 czy 4. Dekstrany wytwarzane są przez rodzaj *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus*. Pierwszym poznany organizmem mającym właściwości żelujące wynikające z wytwarzania dekstranu był *Leuconostoc mesenteroides* (wyizolowany przez van Tieghema w 1878 r.). Dekstran wytwarzany przez *L. mesenteroides* NRRL B-512F jest liniowy i w 95% złożony z reszt D-glukozy połączonych wiązaniami α -1,6-glikozydowymi. Kontrolowana chemiczna hydroliza tego biopolimeru pozwala na otrzymanie określonych frakcji o ustalonej średniej masie cząsteczkowej, wykorzystywanych np. do produkcji złóż do chromatografii żelowej (np. Sephadex®), czy preparatów krwiozastępczych [29].
- Alternan – glukan składający się z reszt D-glukozy połączonych na przemian wiązaniami α -1,6 i α -1,3-glikozydowymi (*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, NRRL B-1501 i NRRL B-1498) [11,38,72].
- Mutan – nierozpuszczalny w wodzie biopolimer, składający się z reszt D-glukozy połączonych w większości wiązaniami α -1,3-glikozydowymi (*Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*) [34,54,55]. Mutan uczestniczy w adhezji mikroorganizmów flory jamy ustnej do powierzchni zębów, przyczyniając się w ten sposób do powstawania osadu nazębnego [34].

2. β -D-glukany

Składają się z reszt glukozy połączonych wiązaniami β -1,3-glikozydowymi (*Pediococcus damnosus* 2.6, *Lactobacillus* spp. G-77) [19,20] np. kurdlan.

3. Fruktany

- Lewan – zbudowany z reszt D-fruktozy połączonych wiązaniami β -2,6-glikozydowymi (*Streptococcus salivarius* [25], *Streptococcus mutans* [74], *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F) [18,44].
- Fruktan typu inuliny – zbudowany z reszt D-fruktozy połączonych wiązaniami β -2,1-glikozydowymi (*Lactobacillus reuterii* LB121) [87].

4. Inne HoPS

Do innych HoPS należą np. poligalaktany (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H414) [30].

Przykładowe struktury homopolisacharydów LAB przedstawiono na ryc. 1.

Heteropolisacharydy są zbudowane z powtarzających się podjednostek składających się z różnych monosacharydów lub ich pochodnych, mogą zawierać łańcuchy boczne lub tworzyć liniową strukturę, która obejmuje od 3 do 8 reszt węglowodanowych.

Monosacharydy mogą występować jako anomery α lub β w konfiguracji piranozowej lub furanozowej. Masa cząsteczkowa tych biopolimerów waha się w przedziale 1×10^4 – 6×10^6

Tabela 1. c.d. HePS wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*

Szczep	Masa cząsteczkowa	Skład chemiczny				Literatura	
		Glc	Gal	Rha	Inne		
<i>Lb. helveticus</i> K16	–	4	2			[95]	
	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ \beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow \end{array}$						
<i>Lb. casei</i> CG11	–	17	1	3		[10]	
<i>Lb. casei</i> NCIB 4114	–	5	2,5	1		[9]	
<i>Lb. casei</i> CRL 87	$7,9 \times 10^5$	1		1,1		[56]	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 416, CNRZ 737	$4,9 \times 10^5$	1	4	1		[7]	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 1187	–	9	14		1Man	[3]	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CRL 420	$2,0 \times 10^5$	1			2Fru	[49]	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772	$1,5 \times 10^5$	1	6,8	0,7		[28]	
<i>Lactobacillus delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i> EU23	–	3		3		[35]	
					$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Rhap} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \\ \rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow \end{array}$		
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> OLL1037R-1	$1,2 \times 10^6$	2	3			[81]	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	–		3	1	1GlcNAc	[45]	
					$\begin{array}{c} \rightarrow\text{-D-Galf} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$		
<i>Lb. paracasei</i>	–	1	2	2	1GlcNAc	[82]	
					$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Galp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \\ \downarrow \\ 3 \\ \downarrow \\ 1 \\ \alpha\text{-L-Rhap} \end{array}$		
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>kefirifaciens</i> K1	$1,0 \times 10^6$	0,9	1,1			[57]	
<i>Lb. helveticus</i> Lb161	–	5	2			[77]	
					$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \\ \rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow \end{array}$		

Tabela 1. c.d. HePS wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*

Szczep	Masa cząsteczkowa	Skład chemiczny				Literatura
		Glc	Gal	Rha	Inne	
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 24, 25	–	1	5	1		[52]
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> RR						[31]
\rightarrow -D-Galp \downarrow 1 \downarrow 3 \rightarrow 2)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	β -D-Galp \downarrow 1 \downarrow 4	α -L-Rhap \downarrow 1 \downarrow 3				
<i>Lb. helveticus</i> TY 1-2	1,6 \times 10 ⁶	3	2,5		1GlcANc	[92]
	β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp \downarrow 1 \downarrow 6 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcpNac-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow					
	\uparrow 6 \uparrow 1 (α -D-Galp) _{0,5}					
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> NCFB2074	–	3	4			[36]
	α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp \downarrow 1 \downarrow 3 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	α -D-Galp \downarrow 1 \downarrow 6				
	\uparrow 2 \uparrow 1 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp					
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2483	–	1	5	0,6	0,5Man	[26]
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 9595M	-	2	1	3,7		[21]

Glc – glukoza; Gal – galaktoza; Rha – ramnoza; Man – mannoza; Fru – fruktoza; GalNac – N-acetylogalaktozamina; G3P – *sn*-glicerylo-3-fosforan; Galp – galaktopiranoza; Glcp – glukozopiranoza; Galf – galaktozofuranoza; GlcA – glukozamina; GlcNac – N-acetyloglukozamina.

dy identyczne pod względem strukturalnym, różniące się jednak masą cząsteczkową, co przekładało się na różnice w ich lepkości.

W tabeli 3 zestawiono dane dotyczące składu cukrowego i struktury EPS bakterii z rodzaju *Streptococcus*.

SYNTEZA EGZOPOLISACHARYDÓW

Homopolisacharydy syntetyzowane są przez zewnątrzkomórkowe glikanosacharazy, należące do grupy transferaz. Enzymy te, zwane również glikozylotransferazami sacharozo-glikanowymi, katalizują hydrolizę cząsteczki sacharozy i przyłączenie jednej z powstałych reszt monosacharydowych do rosnącego łańcucha akceptora glikanowego. Energia potrzebna do tego procesu pochodzi z rozpadu wiązania glikozydowego sacharozy. Na przykład w procesie syntezy glukanów reszta glukozy pochodząca z sacharozy dołączana jest do łańcucha glukanowego, stąd enzymy katalizujące tę reakcję nazwano glukozylotransferazami sacharozo-glukanowymi lub glukanosacharazami.

mi. Transferazy należące do tej grupy to np. mutanosacharaza czy dekstranosacharaza. Z kolei lewanosacharaza przenosi resztę fruktozy na rosnący polimer fruktozowy, czyli fruktan.

SYNTEZA GLUKANÓW

Glukanosacharazy katalizują syntezę różnorodnych glukanów mających głównie wiązania glikozydowe typu α -1,6-, α -1,3-, α -1,4-, α -1,2-. Spośród bakterii kwasu mlekowego enzymy te wytwarzają szczepy należące głównie do rodzajów: *Streptococcus*, *Leuconostoc* czy *Lactobacillus*. Większość szczepów syntetyzuje więcej niż jeden typ glukanosacharaz, np. *S. mutants* 6715 (serotyp g) oraz *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-135 wytwarzają po trzy różne enzymy tego rodzaju [73,75] natomiast szczep *S. sobrinus* cztery [91]. Glukanosacharazy syntetyzowane są konstytutywnie, jak u bakterii z rodzaju *Streptococcus*, bądź synteza jest indukowana swoiście, gdy w pożywce pojawia się sacharoza, jak u bakterii z rodzaju *Leuconostoc* [40,41,59].

Tabela 2. HePS wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Lactococcus*

Szczep	Masa cząsteczkowa	Skład chemiczny				Literatura
		Glc	Gal	Rha	Inne	
<i>Lc. Lactis ssp. cremoris</i> NIZO B891	–	2	2		1GlcA	[83]
$\begin{array}{c} \text{(Ac)}_{0,5} \\ \downarrow \\ 6 \\ \beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow \end{array}$						
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> SBT 0495; NIZO B40; <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> ARH 53, ARH74, ARH84, ARH87 i B30	1,7×10 ⁶	2	2	1		[58,61] [85] [94]
$\begin{array}{c} \alpha\text{-L-Rhap} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 2 \\ \rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow \\ \downarrow \\ 3 \\ \\ \alpha\text{-D-Galp-1-O-P-O}^- \\ \\ 0 \end{array}$						
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> T ₅	–	1	1,2			[9]
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> SBT D495	–	1,5	1,8	1		[58]
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> MLS96	–	1	1			[9]
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> NIZO B39	–	2	3	2		[84]
$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ \rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow \end{array}$						
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> LC330	2,0×10 ⁶ 1,0×10 ⁶	6 6	3 4		2GlcNAc 1GlcNAc 1P	[50]
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> Ropy 352	–	58	29		13 Man	[43]

Dotąd nie poznano pełnego mechanizmu katalitycznego tych enzymów. Głównym etapem w transferze jednostek D-glukozylowych jest tworzenie kowalencyjnie połączonych związków pośrednich typu reszta cukrowa-enzym. Etap ten zachodzi w wyniku działania katalitycznej triady, w skład której wchodzi trzy reszty aminokwasowe enzymu: dwie reszty kwasu asparaginowego i jedna kwasu glutaminowego. Następnie reszty glikozyłowe mogą być przenieszone ze związku pośredniego: reszta cukrowa – enzym, na wiele akceptorów, np.:

- rosnący łańcuch dekstranu,
- akceptor węglowodanowy lub niewęglowodanowy, tworząc odpowiednio oligosacharyd lub glikokoniu-gat,

- cząsteczkę fruktozy, tworząc cząsteczkę leukrozy ($\alpha\text{-D-glukopiranozylo-1,5-D-fruktopiranoza}$) lub ponownie cząsteczkę sacharozy [39,71,96],
- cząsteczkę wody – co odpowiada hydrolizie cząsteczki sacharozy [68].

Znane są sekwencje ponad 30 genów kodujących glukano-sacharazy. W cząsteczkach wszystkich enzymów należą-cych do tej klasy występują 4 podobne domeny:

- konserwatywna 35 aminokwasowa domena N-końco-wa,
- wysoce zmienny region wewnętrzny, obejmujący 123-129 reszt aminokwasowych, który nie odgrywa znaczącej roli w aktywności enzymatycznej,

Tabela 3. HePS wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Streptococcus*

Szczep	Masa cząsteczkowa	Skład chemiczny				Literatura
		Glc	Gal	Rha	Inne	
<i>S. thermophilus</i> SFi32 (39), SY89 i SY102	>2,0×10 ⁶	2	2			[46,52]
$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp} \\ \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow \end{array}$						
<i>S. thermophilus</i> CNCMI 733,734,735; Sfi6 i SFi20; IMDO 01, IMDO 02, IMDO 03; NCFB 859, NCFB21	1,0×10 ⁶ 2,0×10 ⁶	1	2		1GalNAc	[17] [79] [60] [52]
$\begin{array}{c} \rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow \\ \\ 6 \\ \downarrow \\ 1 \\ \alpha\text{-D-Galp} \end{array}$						
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> CNRZ 389	–	4,8	11	1	3Man	[8]
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> CNRZ 1068	–	1	1,2			[8]
<i>S. macedonicus</i> Sc136	–	3	2		1GlcNAc	[90]
$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc} \\ \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \\ \rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow \end{array}$						
<i>S. thermophilus</i> SFi12	>2,0×10 ⁶	1	3	2		[46]
$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp} \\ \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ \rightarrow 2\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow \end{array}$						
<i>S. thermophilus</i> S3	–		3	2	1Gal(Ac)	[23]
$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galf2Ac0,4} \\ \\ 1 \\ \downarrow \\ 6 \\ \rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow \end{array}$						
<i>S. thermophilus</i> OR901; Rs; Sts	2,6×10 ⁶ 3,7×10 ⁶		5	2		[4] [24]
$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp} \\ \\ 1 \\ \downarrow \\ 4 \\ \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow \end{array}$						
<i>S. thermophilus</i> EU20	-	2	3	2		[51]
$\begin{array}{c} \rightarrow 6\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow \\ \\ 2 \\ \downarrow \\ 1 \\ \alpha\text{-L-Rhap} \end{array}$						

Tabela 3. HePS wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Streptococcus*

Szczep	Masa cząsteczkowa	Skład chemiczny				Literatura
		Glc	Gal	Rha	Inne	
<i>S. thermophilus</i> NCFB 2393	–	1	3	1	2GalNAc	[1]
<i>S. thermophilus</i> MR-1C	–		5	2	1Fuc	[48]
β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp ↓ 4	L-Fuc ↓ 3					
→3)- α -D-Galp-(1→3)- α -L-Rhap-(1→2)- α -L-Rhap-(1→2)- α -D-Galp-(1→3)- α -D-Galp-(1→						
<i>S. thermophilus</i> ST 111	>5×10 ⁶		2,5	1		[13]
<i>S. thermophilus</i> LY03	–	1	4			[15]
<i>S. thermophilus</i> SY	–	2	4,5	1		[63]

- wysoce konserwatywny region rdzeniowy – domena katalityczna, obejmująca 1000 reszt aminokwasowych tworzących triadę katalityczną centrum aktywnego; domena wykazuje strukturę cylindra typu (β/α)₈,
- domena C- końcowa (glucan binding domain – GBD) – złożona z powtarzających się jednostek, jest odpowiedzialna za wiązanie do syntetyzowanego glukanu, niezbędna do zachowania aktywności enzymatycznej.

Dekstran i mutan są syntetyzowane przez zewnątrzkomórkową dekstrano- i mutanosacharazę (dextransucrase, mutansucrase, E.C. 2.4.1.5) katalizującą rozpad sacharozy na D-fruktozę i D-glukozę i przenoszącą później monomery węglowodanów na akceptory. Reakcja zachodzi według schematu:

sacharoza + akceptor ↔ dekstran lub mutan + D-fruktoza

Masa cząsteczkowa wyizolowanego produktu genu kodującego dekstranosacharazę wynosi 170 kDa, co odpowiada 1527 resztom aminokwasowym.

Alternan syntetyzowany jest przez alternanosacharazę (alternansucrase, E.C. 2.4.1.140). Gen kodujący ten enzym został zsekwencjonowany, sklonowany i ekspresjonowany w komórkach *E. coli* [2], jego produkt białkowy ma masę cząsteczkową 229 kDa (odpowiada to 2057 resztom aminokwasowym). Jest to największy enzym wśród glukanosacharaz.

Synteza fruktanów

Synteza fruktanów katalizowana jest przez fruktanosacharazę (fructansucrases). Jak dotąd proces ten nie został dokładnie poznany, przypuszcza się, że synteza zachodzi w wyniku dwuetapowego mechanizmu: grupy kwaśne i nukleofilowe enzymu są zaangażowane w reakcję przeniesienia reszt fruktozowych.

Lewan syntetyzowany jest przez zewnątrzkomórkowy enzym – lewanosacharazę (levansucrase, E.C 2.4.1.10) – katalizujący hydrolizę sacharozy oraz przeniesienie D-fruktozy na powstający łańcuch lewanu i jej przyłączenie

poprzez wiązanie β -2,6-glikozydowe. Reakcja zachodzi według schematu:

sacharoza + akceptor ↔ lewan + D-glukoza

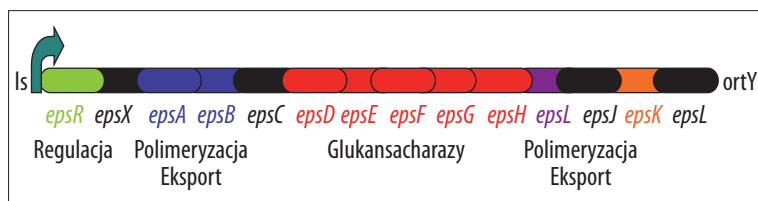
Lewanosacharazę wytwarzają szczepy należące do rodzaju *Streptococcus*, bytujące w jamie ustnej. Najlepiej poznany enzym, pochodzący ze szczepu *S. salivarius*, o masie 140 kDa, jest związany ze ścianą komórkową, jednak w obecności sacharozy w pożywce może być częściowo wydzielany na zewnątrz komórki [5,9,25,35]. Szczepy należące do rodzaju *Leuconostoc* np. *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, oraz *Lactobacillus* np. *Lactobacillus reuteri* również wytwarzają ten enzym, lecz jego aktywność jest związana z aktywnością glukanosacharazy.

SYNTEZA HETEROPOLISACHARYDÓW

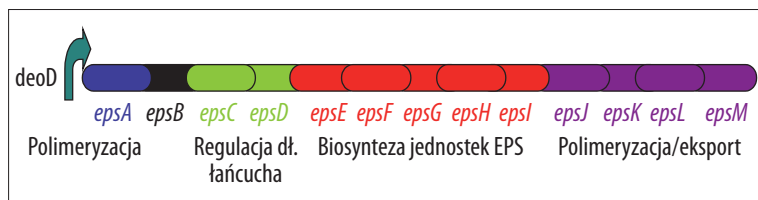
Heteropolisacharydy powstają w wyniku polimeryzacji powtarzających się podjednostek prekursorowych wytwarzanych w cytoplazmie. W biosyntezę i wydzielanie heteropolisacharydów zaangażowanych jest wiele enzymów i innych białek, odpowiedzialnych za aktywację reszt cukrowych przez tworzenie pochodnych nukleotydu, modyfikacje ich struktury przez epimeryzację, dekarboksylację oraz dehydrogenację, tworzenie podjednostek oligosacharydowych, ich polimeryzację i transport na zewnątrz komórki [14].

Geny kodujące te enzymy i białka regulatorowe u bakterii mezofilnych umiejscowione są na plazmidzie, np. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 na plazmidzie pNZ4000 o wielkości 40 kb ma 14 genów odpowiedzialnych za syntezę EPS obejmujących 12 kb (ryc. 2) [88]. U bakterii termofilnych geny te znajdują się na chromosomie, np. u *Streptococcus thermophilus* Sf16 13 genów kodujących enzymy syntezy EPS ma wielkość 14,5 kb (ryc. 3) [79].

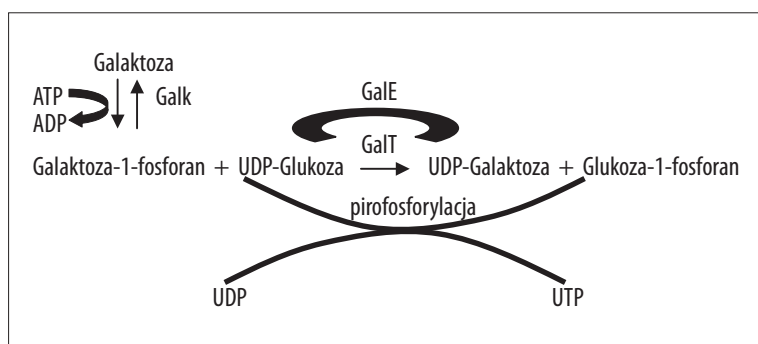
W szlaku biosyntezy heteropolisacharydów wyróżnić można cztery główne etapy: transport cukrów do wnętrza cytoplazmy, syntezę 1-fosforanów cukru, polimeryzację jednostek cukrowych oraz eksport polimeru na zewnątrz komórki.



Ryc. 2. Układ genów zlokalizowanych na plazmidzie kodujących biosyntezę EPS u *Lc. lactis* ssp. *cremosis* NIZO B40 [88]



Ryc. 3. Układ genów zlokalizowanych na chromosomie kodujących biosyntezę EPS u *S. thermophilus* Sfi6 [79]



Ryc. 4. Przekształcenie galaktozy w UDP-galaktozę z udziałem enzymów szlaku Leloir'a (GalK – galaktokinaza, GalT – urydylotransferaza 1-P-galaktozowa, GalE – 4-epimeraza UDP-galaktozowa, ATP – adenozyntrifosfosforan, ADP – adenozydodifosfosforan, UDP – urydynodifosforan, UTP – urydynotrifosforan, UDP-galaktoza – difosfourydynogalaktoza, UDP-glukoza – difosfourydynogluukoza)

Transport węglowodanów do wnętrza komórki

Jak się obecnie przyjmuje, transport węglowodanów (ryc. 7), głównie monosacharydów i disacharydów jest procesem regulowanym, głównie poprzez bakteryjny system PEP-PTS (fosfoenolopirogronian-fosfotransferaza cukrów). System ten zawiera dwie grupy białek odpowiedzialnych za łączenie reszt cukrowych z nośnikami, ich transport przez błonę oraz fosforylację substratów cukrowych. Pierwsza grupa obejmuje tzw. enzym I, białko HPr (histidine-containing phosphocARRIER protein) transportujące fosforan oraz kompleks permeaz swoistych dla węglowodanów (tzw. enzym II) powodujących fosforylację białek w cytoplazmie. Proces inicjowany jest przez przeniesienie grup fosforanowych z PEP na enzym I, który z kolei fosforyluje resztę histydyny białka HPr tworząc w ten sposób HPr(His-P). W tym samym czasie białka kompleksu enzymu II wiążą węglowodany, przenoszą je przez błonę i katalizują przeniesienie na nie grup fosforanowych z HPr(His-P).

Druga grupa białek reguluje procesy gromadzenia składników odżywczych poprzez aktywację lub represję systemu PEP-PTS, lecz także transportu niezależnego od fosfotransferaz (non-PTS uptake) [32,33].

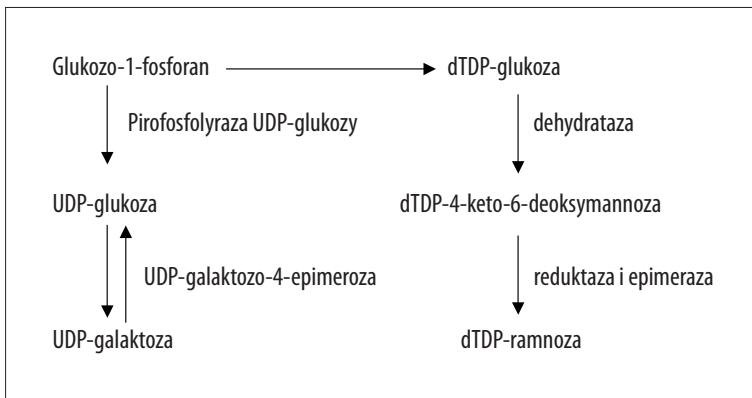
Synteza 1-fosforanów cukrów

W cytoplazmie o dalszym losie fosforylowanych cukrów decyduje miejsce fosforylacji: 6-fosforany cukrów są konsumowane w szlaku katabolicznym, podczas gdy 1-fosforany biorą udział w syntezie polisacharydów. Przyjmuje się, że fosfoglukomutazy (PGMs) łączą szlaki katabolizmu

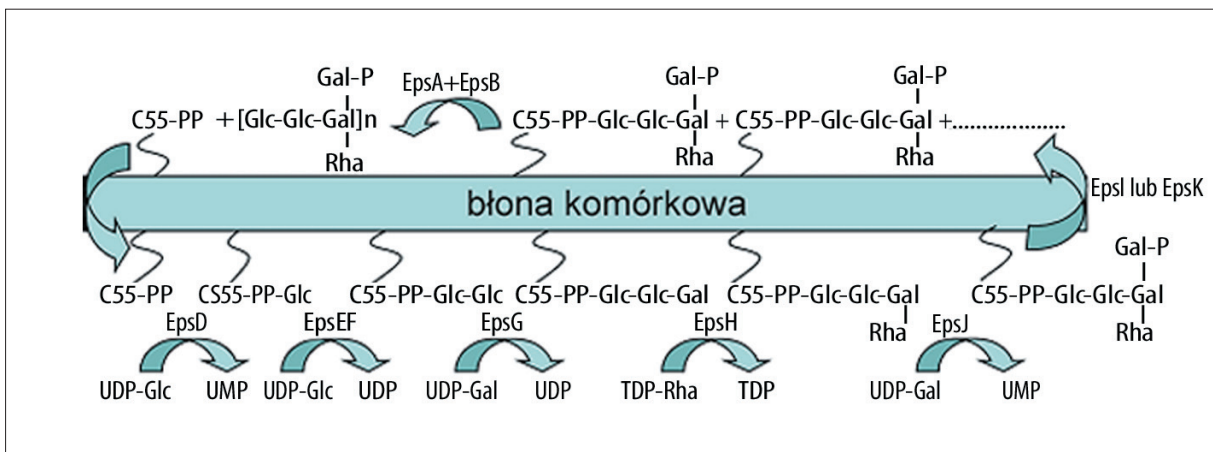
i anabolizmu węglowodanów: β -PGM katalizuje przemianę β -1-fosforanu cukru w 6-fosforan, natomiast α -PGM katalizuje przejście 6-fosforanu cukru w α -1-fosforan (ryc. 7). W zależności jednak od składu podłoża α -1-fosforan cukru może powstawać w odmiennym szlaku metabolicznym. Jeśli w podłożu obecna jest fruktoza *Lb. bulgaricus* transportuje ten cukier do wnętrza komórki za pomocą systemu PEP-fruktoza-PTS, gdzie przekształcany jest on w fruktozo-1-fosforan. W reakcji katalizowanej przez 1-fosfofruktokinazę powstaje fruktozo-1,6-bisfosforan. Jest on przekształcany z kolei we fruktozo-6-fosforan i kolejno w glukozo-6-fosforan oraz glukozo-1-fosforan [27].

Na podłożu bogatym w glukozę jej transport do wnętrza komórki odbywa się z udziałem systemu PEP-glukoza-PTS, powstaje glukozo-6-fosforan, który bezpośrednio zamieniany jest w glukozo-1-fosforan [27]. Z kolei szczep *Lc. lactis* rosnący na podłożu bogatym w laktozę, transportuje ją poprzez system laktozoswoistych fosfotransferaz, a następnie przeprowadza disacharyd w laktozo-6-fosforan. Część ta jest następnie hydrolizowana przez fosfo- β -galaktozydazę do galaktozo-6-fosforanu i cząsteczki glukozy, która z udziałem glukokinazy jest przekształcana w glukozo-6-fosforan [12,62].

Możliwa jest również przemiana galaktozy z udziałem enzymów szlaku Leloir'a, gdzie galaktoza przekształcana jest w α -galaktozo-1-fosforan w reakcji katalizowanej przez galaktokinazę (enzym GalK), następnie w UDP-galaktozę z udziałem urydylotransferazy 1-P-galaktozy (GalT) i wreszcie w UDP-glukozę w reakcji katalizowanej przez 4-epimerazę UDP-Gal (GalE) (ryc. 4) [37].



Ryc. 5. Schemat powstawania nukleotydów cukrów biorących udział w tworzeniu podjednostek EPS

Ryc. 6. Szlak biosyntezy powtarzających się podjednostek EPS u *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 [88]

SYNTEZA NUKLEOTYDÓW CUKRÓW I TWORZENIE PODJEDNOSTKI EPS

Geny kodujące białka biorące udział w syntezie EPS podzielono na dwie grupy: geny wymagane do syntezy nukleotydów cukru i geny EPS-swoiste. Są one fizycznie odseparowane w genomie.

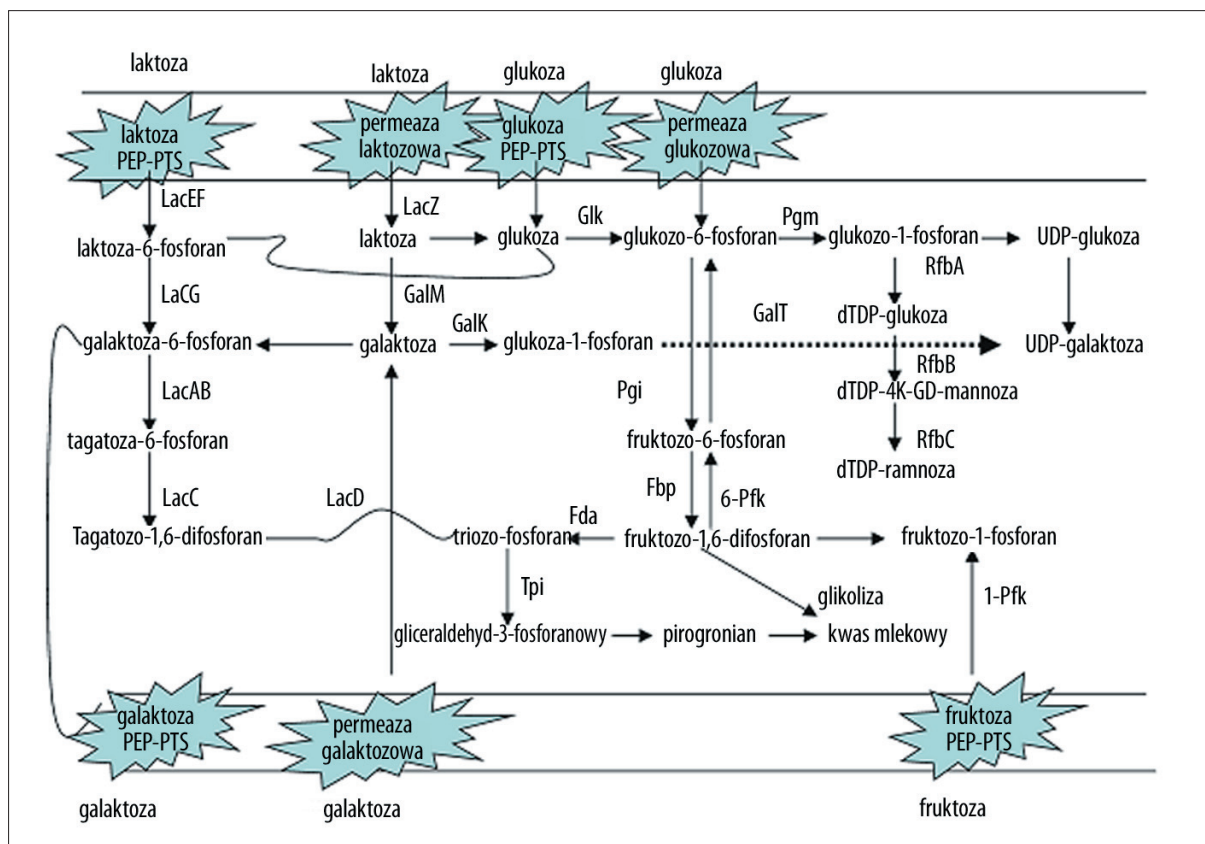
W skład pierwszej grupy wchodzi geny kodujące enzymy i białka wymagane do syntezy nukleotydowych pochodnych cukrów, z których są budowane podjednostki EPS. Nukleotydy cukrów nie są swoiste dla biosyntezy EPS, w syntezie większości struktur EPS biorą udział UDP-glukoza, UDP-galaktoza i dTDP-ramnoza. Bardzo dobrze poznano geny kodujące enzymy wymagane do ich syntezy z glukozy-1-fosforanu (*galU*, *galE*, *rfaA*, *rfaB*, *rfaC* i *rfaD*) [42]. Pierwszym enzymem jest GalU, będący pirofosforylaza UDP-glukozy. Przyjmuje się, że UDP-Gal jest tworzony z UDP-Glc poprzez GalE katalizujący wewnętrzną zamianę tych dwóch UDP-cukrów. Enzymy RfaA, RfaB, RfaC i RfaD zamieniają α -glukozy-1-fosforan w dTDP-glukozę a następnie w 4-keto-6-deoksymannozę, która jest prekursorem dTDP-ramnozy (ryc. 5).

Z powstałych nukleotydów cukrów syntetyzowane są podjednostki oligosacharydowe, które z kolei łączone są w polimer egzopolisacharydu. Proces ten katalizowany jest przez enzymy drugiej grupy, swoiste dla biosyntezy EPS. Kodujące je geny są umiejscowione na plazmidzie (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 [88]) bądź chromoso-

mie (*S. thermophilus* Sfi6 [79]). Organizacja klastrów genów jest podobna w obu przypadkach i składa się z czterech oddzielnych domen (ryc. 2 i 3).

POLIMERYZACJA JEDNOSTEK CUKROWYCH EPS I TRANSPORT DO ŚRODOWISKA OTACZAJĄCEGO KOMÓRKĘ

Dokładny mechanizm polimeryzacji i transportu EPS przez warstwę peptydoglikanu nie jest znany. Cząsteczka EPS powstaje przez polimeryzację od kilkuset do kilku tysięcy podjednostek oligosacharydowych. Odpowiednie pochodne dodawane są kolejno do rosnącego łańcucha polisacharydu, w którym pierwsza reszta cukrowa jest związana pirofosforanowym wiązaniem β -glikozydowym z fosforylowanym lipidem – fosforanem undekaprenylnego nośnika C55-P (undecaprenyl phosphate carrier, C55-P). Nośnik ten zakotwiczony jest w błonie cytoplazmatycznej. Przypuszcza się, że podjednostki związane z nośnikiem C55-P, po syntezie, podlegają przejściu przez błonę typu flip. Na zewnętrznej stronie błony następują – katalizowane przez swoiste enzymy – reakcje ich polimeryzacji oraz odcięcia od nośnika. Na ilość powstającego EPS ma wpływ zarówno wydajność etapu polimeryzacji podjednostek, jak i transportu zsintetyzowanego egzopolisacharydu. Na ryc. 6 przedstawiono prawdopodobny szlak biosyntezy powtarzających się podjednostek EPS u *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 [88]. Powstały EPS wydzielany jest do środowiska zewnętrznego bądź pozostaje związany z zewnętrznymi warstwami ściany bakteryjnej w postaci otoczki.



Ryc. 7. Schemat transportu węglowodanów do wnętrza komórki bakteryjnej oraz dróg katabolizmu laktozy i syntezy nukleotydów cukrów, wykorzystywanych do syntezy egzopolisacharydów

Każdy z etapów biosyntezy EPS: konwersja heksozy w fosforan heksozy, synteza nukleotydów cukrów, fosforylacja nośnika undekaprenyloвого C55, a także polimeryzacja i transport polisacharydu są procesami wymagającymi dostarczenia energii. Ze względu na beztlenowe warunki życia, wytwarzanie energii przez bakterie kwasu mlekowego jest

ograniczone, co wpływa na wytwarzanie EPS. Dodatkowo, w związku z tym, że nośnik lipidowy C55 zaangażowany jest w syntezę innych polimerów ściany komórkowej, tj. peptydoglikanu, kwasów tejchojowych czy lipopolisacharydów, w różnych fazach wzrostu komórki istnieje konkurencja w tworzeniu składników błony [62].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Almiron-Roig E., Mulholland F., Gasson M.J., Griffin A.M.: The complete cps gene cluster from *Streptococcus thermophilus* NCFB 2393 involved in the biosynthesis of a new exopolysaccharide. *Microbiol.*, 2000; 146: 2793–2802
- [2] Arguello-Morales M.A., Remaud-Simeon M., Pizzut S., Sarcabal P., Willemot R., Monsan P.: Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000; 182: 81–85
- [3] Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M.: Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *J. Dairy Sci.*, 1996; 79: 205–211
- [4] Bubb WA., Urashima T., Fujiwara R., Shinai T., Ariga H.: Structural characterization of the exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR 90150. *Carbohydr. Res.*, 1997; 301: 41–50
- [5] Cerning J.: Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1990; 7: 113–130
- [6] Cerning J.: Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 1995; 75: 463–472
- [7] Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M., London M.: Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.*, 1986; 8: 625–628
- [8] Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M., London M.: Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.*, 1988; 10: 255–260
- [9] Cerning J., Bouillanne C., London M., Desmazeaud M.: Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 1992; 75: 692–699
- [10] Cerning J., Renard C.M., Thibault J.F., Bouillanne C., London M., Desmazeaud M., Topisirovic L.: Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994; 60: 3914–3919
- [11] Cote G.L., Robyt J.F.: Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1 goes to 6), (1 goes to 3)-alpha-D-glucan. *Carbohydr. Res.*, 1982; 101: 57–74
- [12] de Vos W.M., Vaughan E.E.: Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994; 15: 217–237
- [13] De Vuyst L.: *Streptococcus thermophilus* ST 111 produces a stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium. *Int. Dairy J.*, 2004; 14: 857–864
- [14] De Vuyst L., Degeest B.: Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1999; 23: 153–177

- [15] De Vuyst L., Vanderveken F., Van de Ven S., Degeest B.: Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.*, 1998; 84: 1059–1068
- [16] Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P.: The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999; 76: 159–184
- [17] Doco T., Wieruszkeski J.M., Fournet B., Carcano D., Ramos P., Loones A.: Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydr. Res.*, 1990; 198: 313–321
- [18] Dols M., Simeon M.R., Willemot R.M., Vignon M.R., Monsan P.F.: Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase. *Carbohydr. Res.*, 1997; 305: 549–559
- [19] Duenas-Chasco M.T., Rodriguez-Carvajal M.A., Tejero-Mateo P., Espartero J.L., Irastorza-Iribas A., Gil-Serrano A.M.: Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydr. Res.*, 1998; 307: 125–133
- [20] Duenas-Chasco M.T., Rodriguez-Carvajal M.A., Tejero Mateo P., Franco-Rodriguez G., Espartero J.L., Irastorza-Iribas A., Gil-Serrano A.M.: Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydr. Res.*, 1997; 303: 453–458
- [21] Dupont I., Roy D., Lapointe G.: Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2000; 24: 251–255
- [22] Faber E.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291. *Carbohydr. Res.*, 2001; 331: 183–194
- [23] Faber E.J., van den Haak M.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. *Carbohydr. Res.*, 2001; 331: 173–182
- [24] Faber E.J., Zoon P., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydr. Res.*, 1998; 310: 269–276
- [25] Giffard P.M., Allen D.M., Milward C.P., Simpson C.L., Jacques N.A.: Sequence of the *gtfK* gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gtf* genes of oral streptococci. *J. Gen. Microbiol.*, 1993; 139: 1511–1522
- [26] Goh K.K., Haisman D.R., Singh H.: Development of an improved procedure for isolation and purification of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2483. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005; 67: 202–208
- [27] Grobgen G.J., Smith M.R., Sikkema J., de Bond J.A.: Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996; 46: 279–284
- [28] Grobgen G.J., Smith M.R., Sikkema J., de Bond J.A.: Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in the chemically defined medium. *J. Appl. Bacteriol.*, 1995; 79: 103–107
- [29] Groenwall A.J., Ingelman B.G.: Manufacture of infusion and injection fluids. *US Patent*, 1948; 2: 437–518
- [30] Gruter M., Leeflang B.R., Kuiper J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydr. Res.*, 1992; 231: 273–291
- [31] Gruter M., Leeflang B.R., Kuiper J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* rr grown in skimmed milk. *Carbohydr. Res.*, 1993; 239: 209–226
- [32] Gunnewijk M.G., Poolman B.: HPr(His approximately P)-mediated phosphorylation differentially affects counterflow and proton motive force-driven uptake via the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 34080–34085
- [33] Gunnewijk M.G., Poolman B.: Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 34073–34079
- [34] Hamada S., Slade H.D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, 1980; 44: 331–384
- [35] Harding L.P., Marshall V.M., Elvin M., Gu Y., Laws A.P.: Structural characterisation of a perdeuteriomethylated exopolysaccharide by NMR spectroscopy: characterisation of the novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* EU23. *Carbohydr. Res.*, 2003; 338: 61–67
- [36] Harding L.P., Marshall V.M., Hernandez Y., Gu Y., Maqsood M., McLay N., Laws A. P.: Structural characterisation of a highly branched exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2074. *Carbohydr. Res.*, 2005; 340: 1107–1111
- [37] Holden H.M., Rayment I., Thoden J.B.: Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 43885–43888
- [38] Jeans A., Haynes W.C., Williams C.A., Rankin J.C., Melvin E.H., Austin M.J., Cluskey J.E., Fisher B.E., Tsuchiya H.M., Rist C.E.: Characterization and classification of dextrans from ninety six strain of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954; 76: 5041–5052
- [39] Jung S.M., Mayer R.M.: Dextranucrase: donor substrate reactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981; 208: 288–295
- [40] Kim D., Robyt J.F.: Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranucrase. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994; 16: 1010–1015
- [41] Kim D., Robyt J.F.: Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucanucrases. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994; 16: 659–664
- [42] Kleerebezem M., van Kranenburg R., Tuinier R., Boels I.C., Zoon P., Looijesteijn E., Hugenholtz J., de Vos W.M.: Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999; 76: 357–365
- [43] Knoshaug E.P., Ahlgren J.A., Trempe J.E.: Exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Ropy352: evidence for novel gene organization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 897–905
- [44] Kobayashi M., Matsuda K.: Characterization of the multiple forms and main component of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980; 614: 46–62
- [45] Landersjo C., Yang Z., Huttunen E., Widmalm G.: Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules*, 2002; 3: 880–884
- [46] Lemoine J., Chirat F., Wieruszkeski J.M., Streckler G., Favre N., Neeser J.R.: Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997; 63: 3512–3518
- [47] Lipinski T., Jones C., Lemercinier X., Korzeniowska-Kowal A., Strus M., Rybka J., Gamian A., Hezko P.B.: Structural analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* strain KL37C exopolysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 2003; 338: 605–609
- [48] Low D., Ahlgren J.A., Horne D., McMahon D.J., Oberg C.J., Broadbent J.R.: Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; 64: 2147–2151
- [49] Manca de Nadra M.C., Strasser de Saad A.M., Pesce de Ruiz Holgado A.A., Oliver G.: Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft*, 1985; 40: 409–411
- [50] Marshall V.M., Cowie E.N., Moreton R.S.: Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC 330. *J. Dairy Res.*, 1995; 62: 621–628
- [51] Marshall V.M., Dunn H., Elvin M., McLay N., Gu Y., Laws A.P.: Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20. *Carbohydr. Res.*, 2001; 331: 413–422
- [52] Marshall V.M., Laws A.P., Gu Y., Levander F., Radstrom P., De Vuyst L., Degeest B., Vaningelgem F., Dunn H., Elvin M.: Exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria cluster into groups according to their EPS structure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2001; 32: 433–437
- [53] Milward C.P., Jacques N.A.: Secretion of fructosyltransferase by *Streptococcus salivarius* involves the sucrose-dependent release of the cell-bound form. *J. Gen. Microbiol.*, 1990; 136: 165–169
- [54] Montville T.J., Cooney C.L., Sinskey A.J.: *Streptococcus mutans* dextranucrase: a review. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1978; 24: 55–84
- [55] Mooser G.: Glycosidases and glucosyltransferases. *The Enzymes*, 1992; 20: 187–221
- [56] Mozzi F., Savoy de Giori G., Oliver G., Font de Valdez G.: Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft*, 1996; 51: 670–673

- [57] Mukai T., Toba T., Itoh T., Adachi S.: Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefirnofaciens* K1. *Carbohydr. Res.*, 1990; 204: 227–232
- [58] Nakajima H., Hirota T., Toba T., Itoh T., Adachi S.: Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Res.*, 1992; 224: 245–253
- [59] Naoko M., Masahiko Y., Kenichiro T., Makoto S.: Constitutive mutants for dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *J. Ferment. Bioeng.*, 1994; 77: 248–251
- [60] Navarini L., Abatangelo A., Bertocchi C., Conti E., Bosco M., Picotti F.: Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* SF120. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2001; 28: 219–226
- [61] Oba T., Doesburg K.K., Iwasaki T., Sikkema J.: Identification of bio-synthetic intermediates of the extracellular polysaccharide viilian in *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0495. *Arch. Microbiol.*, 1999; 171: 343–349
- [62] Poolman B.: Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993; 12: 125–147
- [63] Ricciardi A., Parente E., Crudele M.A., Zanetti F., Scolari G., Mannazzu I.: Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. *J. Appl. Microbiol.*, 2002; 92: 297–306
- [64] Robijn G.W., Gutierrez Gallego R., van den Berg D.J., Haas H., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydr. Res.*, 1996; 288: 203–218
- [65] Robijn G.W., Thomas J.R., Haas H., van den Berg D.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. *Carbohydr. Res.*, 1995; 276: 137–154
- [66] Robijn G.W., van den Berg D.J., Haas H., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1. *Carbohydr. Res.*, 1995; 276: 117–136
- [67] Robijn G.W., Wienk H.L., van den Berg D.J., Haas H., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.: Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydr. Res.*, 1996; 285: 129–139
- [68] Robyt J.F., Walseth T.F.: The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.*, 1978; 61: 433–445
- [69] Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilan C.G., Salminen S.: Short communication: Effect of exopolysaccharide isolated from “Villi” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *J. Dairy Sci.*, 2006; 89: 2355–2358
- [70] Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Margolles A., de los Reyes-Gavilan C.G., Salminen S.: Exopolysaccharides produced by probiotic strain modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.*, 2006; 69: 2011–2015
- [71] Schwengers D.: Leucrose, a ketodisaccharide of industrial design. In: *Carbohydrates as Organic Raw Materials*. Ed.: F.W. Lichtenthaler, Wiley VCH: New York, 1991: 183–195
- [72] Seymour F.R., Knapp R.D.: Structural analysis of dextrans from strains of *Leuconostoc* and related genera, that contain 3-O- α -glucosylated-D-glucopyranosyl residues at the branched point or in consecutive linear position. *Carbohydr. Res.*, 1980; 81: 105–129
- [73] Shimamura A., Tsumori H., Mukasa H.: Three kinds of extracellular glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* 6715 (serotype g). *FEBS Lett.*, 1983; 157: 79–84
- [74] Shiroza T., Kuramitsu H.K.: Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J. Bacteriol.*, 1988; 170: 810–816
- [75] Smith M.R., Zahnley J., Goodman N.: Glucosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994; 60: 2723–2731
- [76] Staaf M., Widmalm G., Yang Z., Huttunen E.: Structural elucidation of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus*. *Carbohydr. Res.*, 1996; 291: 155–164
- [77] Staaf M., Yang Z., Huttunen E., Widmalm G.: Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161. *Carbohydr. Res.*, 2000; 326: 113–119
- [78] Stingle F., Lemoine J., Neeser J.R.: *Lactobacillus helveticus* Lh59 secretes an exopolysaccharide that is identical to the one produced by *Lactobacillus helveticus* TN-4, a presumed spontaneous mutant of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr. Res.*, 1997; 302: 197–202
- [79] Stingle F., Neeser J.R., Mollet B.: Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sf6. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 1680–1690
- [80] Sutherland I.W.: Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.*, 1972; 8: 143–213
- [81] Uemura B., Itoh T., Kaneko T., Noda K.: Chemical characterization of exocellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Milchwissenschaft*, 1998; 53: 443–446
- [82] Van Casteren M.R. cited in: Pham P.L., Dupont I., Roy D., Lapointe G., Cerning J.: Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66: 2302–2310
- [83] van Casteren W.H., de Waard P., Dijkema C., Schols H.A., Voragen A.G.: Structural characterisation and enzymic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydr. Res.*, 2000; 327: 411–422
- [84] van Casteren W.H., Dijkema C., Schols H.A., Beldman G., Voragen A.G.: Structural characterisation and enzymic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39. *Carbohydr. Res.*, 2000; 324: 170–181
- [85] van Casteren W.H., Kabel M.A., Dijkema C., Schols H.A., Beldman G., Voragen A.G.: Endoglucanase V and a phosphatase from *Trichoderma viride* are able to act on modified exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydr. Res.*, 1999; 317: 131–144
- [86] van den Berg D., Robijn G.W., Janssen A.C., Giuseppin M., Vreeker R., Kamerling J.P., Vliegthart J., Ledebor A.M., Verrips C.T.: Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 61: 2840–2844
- [87] van Geel-Schutten G.H., Faber E.J., Smit E., Bonting K., Smith M.R., Ten Brink B., Kamerling J.P., Vliegthart J.F., Dijkhuizen L.: Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999; 65: 3008–3014
- [88] van Kranenburg R., Marugg J.D., van Swam I.I., Willem N.J., de Vos W.M.: Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.*, 1997; 24: 387–397
- [89] Vanhaverbeke C., Bosso C., Colin-Morel P., Gey C., Gamar-Nourani L., Blondeau K., Simonet J.M., Heyraud A.: Structure of an extracellular polysaccharide product by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Carbohydr. Res.*, 1998; 314: 211–220
- [90] Vincent S.J., Faber E.J., Neeser J.R., Stingle F., and Kamerling J.P.: Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiology*, 2001; 11: 131–139
- [91] Walker G.J., Heetham N.W., Taylor C., Pearce B.J., Slodki M.E.: Productivity of four α -D-glucosyltransferase released by *Streptococcus sorbinus* under defined conditions in continuous culture. *Carbohydr. Res.*, 1990; 13: 399–421
- [92] Yamamoto Y., Murosaki S., Yamauchi R., Kato K., Sone Y.: Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr. Res.*, 1994; 261: 67–78
- [93] Yamamoto Y., Nunome T., Yamauchi R., Kato K., Sone Y.: Structure of an exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr. Res.*, 1995; 275: 319–332
- [94] Yang Z., Huttunen E., Staaf M., Wildman G., Tenhu H.: Separation, purification and characterization of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strains. *Int. Dairy J.*, 1999; 9: 631–638
- [95] Yang Z., Staaf M., Huttunen E., Widmalm G.: Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* K16. *Carbohydr. Res.*, 2000; 329: 465–469
- [96] Ziesenitz S.C., Siebert G., Schwengers D., Lemmes R.: Nutritional assessment in humans and rats of leucrose [D-glucopyranosyl- α -1 \rightarrow 5-D-fructopyranose] as a sugar substitute. *J. Nutr.*, 1989; 119: 971–978