

WAYS OF INCREASING THE EFFICIENCY OF TECHNOLOGIES FOR THE SYNTHESIS OF MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES. PART 2. IMPROVEMENT OF PRODUCER STRAINS BY METHODS OF METABOLIC AND GENETIC ENGINEERING

T. Pirog, A. Voronenko

National University of Food Technologies

Key words:

*Microbial
exopolysaccharides
Recombinant producers
Intensification of
biosynthesis
Modification of
composition and
properties*

Article history:

Received 07.03.2023

Received in revised form
23.03.2023

Accepted 06.04.2023

Corresponding author:

T. Pirog

E-mail:

tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

In recent decades, methods of metabolic and genetic engineering have been used to increase synthesis indicators, as well as to regulate the composition and functional characteristics of microbial exopolysaccharides. Metabolic engineering techniques are used to analyze the producer's metabolic pathways, determine potential limiting reactions ("bottlenecks" of metabolism) and their impact on the synthesis of the final product, followed by the use of genetic engineering tools to eliminate these limitations.

One of the strategies to increase exopolysaccharides synthesis indicators is to direct metabolism to the biosynthesis of the final product by eliminating competing metabolic pathways. Quite often, the "bottleneck" of polysaccharides synthesis is an insufficient level of nucleoside diphosphate saccharides. That's why another approach to intensifying biosynthesis is to increase the pool of nucleoside diphosphate derivatives in producer cells. Increasing the expression of key genes of polysaccharide biosynthesis allows to increase exopolysaccharides synthesis indicators several times. The use of genetic engineering methods also makes it possible to design producers with a full cycle of synthesis of practically valuable biopolymers that are not characteristic of them.

The analyzed literature data on the improvement of microbial polysaccharides producers by methods of metabolic and genetic engineering indicate that the synthesis indicators of the final product by recombinant microorganisms are 2—20 times higher than the original strains. In addition, recombinant producers are able to synthesize polysaccharides of different composition and molecular weight, which allow to regulate their rheological properties depending on the field of practical application.

ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТЕХНОЛОГІЙ СИНТЕЗУ МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ. ЧАСТИНА 2. УДОСКОНАЛЕННЯ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ МЕТОДАМИ МЕТАБОЛІЧНОЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Т. П. Пирог, А. А. Вороненко

Національний університет харчових технологій

Упродовж останніх десятиліть для підвищення показників синтезу, а також регуляції складу та функціональних характеристик мікробних екзополісахаридів використовуються методи метаболічної та генетичної інженерії. Прийоми метаболічної інженерії застосовуються для проведення аналізу метаболічних шляхів продуцента, визначення потенційних лімітуючих реакцій («вузьких» місць метаболізму) та їх впливу на синтез цільового продукту з подальшим використанням інструментарію генетичної інженерії для усунення цих обмежень.

Однією зі стратегій підвищення показників синтезу є спрямування метаболізму на біосинтез цільового продукту за рахунок усунення конкуруючих метаболічних шляхів. Доволі часто «вузьким місцем» біосинтезу полісахаридів є недостатній рівень нуклеозиддифосфатсахаридів, тому ще один підхід до інтенсифікації біосинтезу полягає в підвищенні у клітинах продуцента пулу нуклеозиддифосфат-похідних. Підвищення рівня експресії ключових генів біосинтезу полісахаридів дає змогу підвищити показники синтезу в кілька разів. Застосування методів генетичної інженерії надає можливість також конструювати продуценти з повним циклом синтезу невластивих їм практично цінних біополімерів.

Проаналізовані літературні дані щодо вдосконалення продуцентів мікробних полісахаридів методами метаболічної та генетичної інженерії свідчать про те, що показники синтезу цільового продукту рекомбінантними мікроорганізмами в 2—20 разів вищі, ніж вихідні штами. Крім того, рекомбінантні продуценти здатні синтезувати полісахариди різного складу і молекулярної маси, що дає змогу регулювати їхні реологічні властивості залежно від галузі практичного застосування.

Ключові слова: мікробні екзополісахариди, рекомбінантні продуценти, інтенсифікація біосинтезу, модифікація складу і властивостей.

Постановка проблеми. У нещодавно опублікованому огляді (Пирог, & Вороненко, 2023) ми зазначали, що натепер відкрито та досліджено значну кількість мікробних екзополісахаридів (ЕПС) з різноманітними фізико-хімічними та біологічними властивостями, проте лише деякі виробляються у промисловому масштабі. Організація виробництва нових полімерів, навіть з унікальними властивостями, часто стримується високою собівартістю та недостатньо високою концентрацією цільового продукту. Основними шляхами вирішення цих проблем є використання дешевих субстратів, підвищення ефективності їх конверсії в цільовий продукт і проведення загальної оптимізації процесу біосинтезу (Пирог, & Вороненко, 2023).

Крім того, одним із визначальних факторів, що безпосередньо впливає на синтез мікробних полісахаридів, є генетична «природа» продуцента — унікальна характеристика певного ЕПС-синтезуючого штаму (Schmid, Sieber, & Rehm, 2015; Sun, & Zhang, 2021). Зважаючи на це, вплив на рівні генів є потужним інструментом для інтенсифікації синтезу та модифікації властивостей ЕПС.

Мета статті: узагальнення даних літератури про використання методів метаболічної та генетичної інженерії для підвищення показників синтезу, а також регуляції складу і функціональних характеристик мікробних екзополісахаридів.

Матеріали і методи. Матеріалами дослідження стали наукові публікації зарубіжних учених у провідних періодичних і спеціалізованих світових виданнях, що стосуються вдосконалення ЕПС-синтезуючих штамів методами метаболічної та генетичної інженерії.

Викладення основних результатів дослідження. *Основні підходи до регуляції метаболізму продуцентів мікробних полісахаридів.* Біосинтез мікробних екзополісахаридів є складним комплексним процесом, який розпочинається з поглинання субстрату, його трансформації в центральних метаболічних шляхах з утворенням попередників і закінчується синтезом та екскрецією полісахаридів (Freitas, Alves, & Reis, 2011; Donot, Fontana, Baccou, & Schorr-Galindo, 2012; Rana, & Upadhyay, 2020). Усі ці метаболічні перетворення каталізуються певними ферментами, що кодується відповідними генами. Пов'язані з синтезом ЕПС гени можна розділити на три основні групи (Rehm, 2010; Ates, 2015; Schmid, Sieber, & Rehm, 2015; Schmid, 2018; Schilling та ін., 2020): 1) гени, що беруть участь в активації та послідовному перетворенні субстратів на нуклеозиддифосфат-похідні вуглеводів, що є вихідними сполуками для біосинтезу ЕПС, а також в утворенні інших складових частин полісахаридів; 2) гени, відповідальні за синтез глікозилтрансфераз, що здійснюють перенесення активованих нуклеозиддифосфат-похідних вуглеводів до полісахаридного ланцюга; 3) гени, залучені до полімеризації полісахаридів та їх екскреції з клітин.

Переважає більшість генів, які відповідають за безпосередній синтез ЕПС, зазвичай, організовані у вигляді кластера, розміщеного на хромосомній або плазмідній ДНК (Rehm, 2010; Schmid, Sieber, & Rehm, 2015). Така організація генів, пов'язаних з синтезом екзополісахаридів, значно полегшує відкриття нових ЕПС-синтезуючих штамів і відповідних полісахаридних оперонів (Schmid, Sieber, & Rehm, 2015; Xiong та ін., 2022). Незважаючи на те, що оперони та шляхи синтезу мікробних полісахаридів відомі вже впродовж десятиліть, функції більшості цих генів, а також особливості відповідних регуляторних механізмів досі повністю не з'ясовані (Rehm, 2010; Becker, 2015; Schmid та ін., 2016; Anderson, Islam, & Prather, 2018). Окрім цього, рівень залучення певних генів у біосинтез цих полімерів може значною мірою відрізнятися в різних ЕПС-синтезуючих штамів, що зумовлює необхідність розробки індивідуальних підходів до вдосконалення продуцентів.

Вирішення цих проблем передбачає застосування підходів метаболічної інженерії для проведення аналізу метаболічних шляхів продуцента, визначення потенційних лімітуючих реакцій («вузьких» місць метаболізму) та їх впливу на синтез цільового продукту, з подальшим використанням інструментарію генетичної інженерії для усунення цих обмежень (Oesterle, Wuethrich, & Panke, 2017;

Sun, Zhang, 2021). При цьому доцільним є послаблення або повне усунення небажаних побічних реакцій чи конкуруючих метаболічних шляхів, що спрямовує потік вуглецю субстрату й енергетичного метаболізму на синтез ЕПС (Schilling та ін., 2020; Sun, & Zhang, 2021), а також унеможлиблює інгібування кінцевим продуктом (ретроінгібування) (Ruiz-Villafán та ін., 2021).

Модифікацію метаболізму можна здійснювати за рахунок впливу на рівні ферментів і регуляції їх активності експресією відповідних генів у рекомбінантних мікробних клітинах (Oesterle, Wuethrich, & Panke, 2017; Wang, Salem, & Sani, 2019). Для кожного ЕПС-синтезуючого штаму існує велика кількість можливих підходів для регулювання його метаболізму, проте, зазвичай, відсутнє всебічне розуміння того, які елементи підвищують або знижують ефективність цільових метаболічних шляхів. У той же час велика кількість метаболічних взаємодій мають нелінійний характер, що може призводити до непередбачуваних наслідків при налаштуванні якогось певного елемента метаболізму та зумовлює необхідність використання комплексного підходу до їх оптимізації. При цьому також не варто забувати про важливість встановлення для кожного продуцента індивідуальних оптимальних умов культивування (Freitas, Torres, & Reis, 2017; Barcelos, Vespermann, Pelissari, & Molina, 2020; Пирог, & Вороненко, 2023).

Спрямування метаболізму на біосинтез цільового продукту за рахунок усунення конкуруючих метаболічних шляхів. Біосинтез полісахаридів є енерговитратним процесом, який потребує безперервного надходження значної кількості вуглецю, що призводить до конкурування з основними шляхами конструктивного метаболізму за доступні джерела вуглецю та енергії (Rehm, 2010; Ates, 2015; Schmid, Sieber, & Rehm, 2015; Schmid, 2018; Schilling та ін., 2020). Таким чином, однією зі стратегій підвищення показників синтезу ЕПС є збільшення пулу вуглецю в клітинах продуцента або його перерозподілу в різних метаболічних шляхах.

У праці (Velmurugan, & Incharoensakdi, 2021) з метою підвищення синтезу ЕПС у ціанобактерій *Synechocystis* sp. PCC 6803 було порушено функціонування гену *glgC*, який кодує синтез глікозо-1-фосфатаденілтрансферази, що бере участь у синтезі глікогену, а також підвищено експресію гену *gpi* (кодує глікозо-6-фосфат ізомеразу). Такий підхід сприяв спрямуванню потоків вуглецю на синтез вуглеводних мономерів, що входять до складу ЕПС. Отриманий рекомбінантний штам $\Delta gpi\text{-}\Delta glgC$ синтезував 1,3 г/л ЕПС, який характеризувався підвищенням вмістом у його складі глюкози, галактози, ксилози, манози, рамнози, фукози та уоновних кислот порівняно з ЕПС вихідного штаму.

Інші дослідники (Nap та ін., 2021) використовували комплексний підхід для інтенсифікації синтезу коланової кислоти *Escherichiacoli* JM109(DE3). Спершу завдяки видаленню гену *waaF*, який відіграє ключову роль у синтезі ліпополісахариду, було частково порушено функціонування клітинної мембрани та створено стресові умови, в яких синтез коланової кислоти підвищувався майже в 6 разів. Далі встановлювали умови культивування отриманого рекомбінантного штаму, що забезпечують максимальний синтез ЕПС. Так, в оптимальних умовах культивування концентрація ЕПС досягала 1,9 г/л ЕПС, що у 12 разів більше, ніж синтезована вихідним штамом.

У праці (Li та ін., 2015, а) з метою підвищення показників синтезу ЕПС у

молочнокислих бактерій проводили клонування генів НАДН-оксидази *Streptococcus mutans* у *Lactobacillus casei* LC2W під контролем конститутивного промотора P₂₃. У рекомбінантного штаму LC-пох активність цього ферменту підвищувалася майже у 20 разів порівняно з такою у вихідного штаму, що супроводжувалось зниженням показників росту й утворенням лактату. Загалом, це сприяло додатковому спрямуванню вуглецю на синтез ЕПС, концентрація якого становила 0,2 г/л, що на 46% вище, ніж утворювана вихідним штамом. Ці ж автори в іншій праці (Li та ін., 2015, b) продемонстрували, що підвищення рівня експресії саме генів *пох* спричиняє найбільший вплив на синтез ЕПС штамом LC2W порівняно з іншими досліджуваними генами (*pfk*, *rfbB*, *galT*).

Ще одним прикладом підвищення показників синтезу ЕПС за рахунок усунення конкуруючих метаболічних шляхів є дослідження одночасного утворення полісахариду санксану та полі-3-гідроксибутирату штамом *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 (Wu та ін., 2018). Незважаючи на різну локалізацію полімерів (полісахарид екзо-, а полі-3-гідроксибутират ендогенний), максимальний їх синтез досягався в однакових умовах культивування. Експерименти показали, що повне видалення гену *phbB*, який кодує ацетоацетил-КоАредуктазу (ключовий фермент синтезу полі-3-гідроксибутирату), супроводжувалося суттєвим зниженням синтезу ЕПС штамом NX02-dPHB. На наступному етапі цей штам піддавали плазмовому мутагенезу, в результаті якого концентрація синтезованого ним санксану підвищувалася до 21,2 г/л, що у 1,4 раза вище за показники синтезу вихідного штаму (14,9 г/л). Важливо, що мутантний штам NXdP характеризувався нижчим у три рази рівнем біомаси (3,1 г/л).

Не зі співавт. (He та ін., 2018) в результаті опромінення штаму *Bacillus subtilis* NJ509 іонами азоту отримали мутантний штам NJ308, який синтезує у процесі культивування на крохмалі у 5,4 раза більше ЕПС (3,41 г/л), ніж вихідний штам. Подальші дослідження показали, що в результаті мутагенезу було порушено експресію генів, які кодують ключові ферменти біосинтезу полісахариду.

Доволі часто «вузьким місцем» біосинтезу ЕПС є недостатній рівень нуклеозиддифосфатсахаридів (Wang, Salem, & Sani, 2019; Schilling та ін., 2020; Sun, & Zhang, 2021). Особливо актуальним такий стан речей є у грамнегативних бактерій, в яких ці попередники використовуються для синтезу полісахаридів зовнішньої мембрани. Отже, ще одна стратегія інтенсифікації біосинтезу ЕПС полягає у підвищенні в клітинах продуцента пулунуклеозиддифосфат-похідних.

Бактерії *Aureobasidium pullulans* одночасно з пулуланом синтезують ще один практично цінний полісахарид — β-глюкан. Для утворення обох полімерів використовується один і той самий попередник (уридиндифосфат-глюкоза). У результаті *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації отримано штам *A. Pullulans* CGMCC 19650, здатний синтезувати на 78,6% більше β-глюкану, ніж вихідний штам CCTCC M 2012259 (Chen та ін., 2021). При трансформації трансферну ДНК було вбудовано в кодуючий регіон гену *mal31*, відповідального за утворення задіяного в синтезі пулулану вуглеводного транспортеру, що привело до підвищення рівня транскрипції генів *pgm2*, *ugp*, *fls1* та *kre6*; активності ключових ферментів, пов'язаних з біосинтезом уридиндифосфат-глюкози і β-глюкану, та внутрішньоклітинного пулууридиндифосфат-глюкози. У той же час спо-

стерігалось зниження рівня транскрипції генів *ags2*, які кодують α -глюкансинтазу — ключовий фермент синтезу пулулану. Загалом, порушення функціонування гену *mal31* призвело до зниження концентрації пулулану на 41,7%.

Ще одним прикладом спрямування метаболічних шляхів на синтез цільового продукту є дослідження (Cheng, Yu, & Stephanopoulos, 2019), в якому на основі моделі геному iCW773 було визначено цільові гени та здійснено відповідні генетичні маніпуляції, спрямовані на інтенсифікацію синтезу гіалуронової кислоти у *Corynebacterium glutamicum*. У результаті проведених досліджень: 1) підвищено експресію гену *hasB*, кодуючого УДФ-глюкозо-6-дегідрогеназу, яка каталізує перетворення УДФ-глюкози на попередник гіалуронової кислоти — УДФ-глюкуронову кислоту; 2) знижено метаболічну активність гліколізу за рахунок asRNA-опосередкованого послаблення гену *fba*, який кодує фруктозо-1,6-дифосфат альдолазу; 3) знижено метаболічну активність пентозофосфатного шляху завдяки делеції гену *zwf*, який кодує глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу; 4) знижено активність піруватдегідрогенази в результаті комплексного asRNA-опосередкованого послаблення гену *aceE* та мутації ініціюючого кодону; 5) заблоковано шляхи синтезу лактату та ацетату завдяки видаленню ключових генів відповідних метаболічних шляхів (*ldh*, *ackA-pta*, *cat* та *poxB*). Загалом, такий комплексний підхід сприяв максимальному спрямуванню пулу вуглецю на синтез цільового продукту. При реалізації культивування з підживленням отриманий рекомбінантний штам накопичував 28,7 г/л гіалуронової кислоти, що у 22 рази вище за показники синтезу вихідного штаму.

Інші дослідники (Woo, Seong, Lee, & Jang, 2019) в результаті комплексних рекомбінацій (делеція репресорів галактозного оперону *galR* та *galS*, підвищення активності кластеру генів *galU-ugd* біосинтезу гіалуронової кислоти, зниження рівня споживання глюкози за рахунок видалення генів *pfkA* та *zwf*) отримали рекомбінантний штам *Escherichia coli*, здатний синтезувати гіалуронову кислоту (0,03 г/л) на суміші глюкози та галактози. Зазначимо, що ця праця є однією з перших, в якій повідомляється про можливість синтезу гіалуронової кислоти з галактози.

Підвищення рівня експресії ключових генів біосинтезу полісахаридів. Gu зі співавт. (Gu та ін., 2017) досліджували можливість підвищення експресії гену *sacB*, що кодує левансахаразу у штаму *Bacillus amyloliquefaciens* NK- Δ LP. Серед усіх рекомбінантів штам Δ LP-Y, у якому використано гетерологічний промотор P_{gras} та сигнальний пептид uncM, характеризувався найвищими показниками синтезу полісахариду. Так, при культивуванні з підживленням на середовищі з сахарозою (200 г/л) штам Δ LP-Y накопичував 102 г/л ЕПС впродовж 48 год культивування, що більш ніж у 7 разів вище порівняно з показниками синтезу вихідного штаму. Зазначимо, що така концентрація левану є порівнянною з найвищою відомою натеper (*Bacillus subtilis* (natto) CCT7712 синтезував 112 г/л полісахариду) (Öner, Hernández, & Combie, 2016).

Інші дослідники (Huang та ін., 2013) вивчали вплив підвищення експресії гену *pgmG*, який кодує синтез біфункціонального білка з фосфоглюкомутазною та фосфоманомутазною активністю, на синтез полісахариду сфінгану бактеріями *S.sanxanigenens*. Експерименти показали, що рекомбінантний штам синтезує на 17% більше ЕПС (12,6 г/л), ніж вихідний.

У праці (Jones, 2012) встановлено, що мутантний штам *Sinorhizobium meliloti* з підвищеною експресією гену *exoY*, утворював в 2,3—2,5 рази більше полісахариду сукциноглюкану порівняно з вихідним штамом. Ген *exoY* кодує фермент фосфотрансферазу ундекапреніл-фосфат галактози, який каталізує приєднання галактози до ліпідного переносника та бере участь у початкових етапах синтезу сукциноглюкану.

У праці (Svensson, Waak, Svensson, & Rådström, 2005) показано, що підвищення експресії генів *galE*, *galT* та *galK*, кодуючи УДФ-глюкозо-4-епімеразу, галактозо-фосфатазо-уридилтрансферазу та галактокіназу відповідно, у рекомбінантного штаму *Streptococcus thermophilus* TMB 6013 супроводжувалося збільшенням виходу ЕПС від субстрату у 3,3 рази (до 0,5 г ЕПС/г лактози) порівняно з вихідним штамом LY03.

Однією з проблем синтезу пулулану *Aureobasidium* spp. під час росту на середовищах з високим вмістом глюкози є катаболітна репресія. Для зниження такого впливу Wang зі співавт. (Wang та ін., 2017) у штаму *Aureobasidium melanogenum* P16 видалили ген, який кодує катаболітний вуглецевий репресор CreA та відіграє ключову роль у репресії глюкозою. Отриманий штам DG41 з порушеним функціонуванням гену *CREA* характеризувався підвищеним транскрипційним рівнем генів, кодуючи глікозилтрансферазу, трьох генів транспортерів глюкози, глюкозо-6-фосфаткінази, α -амілази, глюкоамілази та пулулани. У той же час було суттєво знижено рівень експресії генів *CreA* та двох транспортерів глюкози. У процесі культивування на середовищі з високим вмістом глюкози (120 г/л) штам DG41 накопичував майже 65 г/л пулулану, що було в 1,25 рази вищим за показники синтезу вихідного штаму P16.

Зазначимо, що в деяких випадках надмірна експресія генів, пов'язаних з біосинтезом полісахаридів, не завжди спричиняє однозначний позитивний ефект. Штам *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876 одночасно синтезує полісахарид та полі- γ -глютамінову кислоту, яким притаманні флокуляційні властивості (Liu та ін., 2017). Експерименти показали, що підвищена експресія гену *epsB*, відповідального за негативну регуляцію синтезу полісахариду, приводила до підвищення концентрації біофлокулянту до 10,26 г/л та його флокуляційної активності до 9612 Од/мл (на 36,6 та 224% відповідно). При цьому спостерігалось зниження вмісту вуглеводної складової біофлокулянту майже на 25% і підвищення вмісту полі- γ -глютамінової кислоти на 10%. У той же час одночасне підвищення рівня експресії ключових генів біосинтезу ЕПС у бактерій роду *Bacillus* (*pgcA* і *gtaB1*, що кодують фосфоглюкомутазу та УДФ-глюкозо-пірофосфорилазу), супроводжувалося підвищенням синтезу біофлокулянту лише на 21%. Зазначимо, що в цих дослідженнях продуцент вирощували в середовищі з глюкозою, в якому, на відміну від культивування на цитраті натрію та гліцерині, переважно синтезується полісахарид.

Оптимізація умов культивування вдосконалених штамів-продуцентів. Окремо варто виділити вдосконалення продуцентів з метою оптимізації біотехнологічного процесу одержання практично цінних метаболітів. Так, у праці (Liu та ін., 2016) повідомляється про оптимізацію біосинтезу велану штамом *Sphingomonas* sp. за рахунок гетерологічної експресії гену гемоглобіну (*vgb*) бактерій *Vit-*

reosilla. Використання такого підходу дало змогу мінімізувати лімітування кишем, що має місце при підвищенні в'язкості культуральної рідини у процесі накопичення ЕПС, та підвищити синтез велану з 25,3 г/л до 34,6 г/л без суттєвої зміни його реологічних властивостей.

Інші дослідники (Sun та ін., 2011) в результаті електротрансформації *Enterobacter cloacae* JD генетичним матеріалом, виділеним з термофільного штаму *Geobacillus* sp. GW3, отримали трансформант GW3-3.0, здатний синтезувати 8,83 г/л ЕПС на середовищі з мелясою при температурі 54 °С. У той же час при підвищенні температури до 59 °С синтез полісахариду майже повністю припинявся. Такі властивості отриманого трансформанту роблять перспективним використання синтезованого ним ЕПС для контрольованої інтенсифікації вторинного видобутку нафти.

Зазначимо, що термофільні та інші екстремофільні організми, зокрема психро- та галофіли, можуть бути не тільки джерелом генів підвищеної стійкості до несприятливих факторів навколишнього середовища, а й слугувати перспективною біологічною моделлю для створення нових промислово важливих продуцентів ЕПС (Wang, Salem, & Sani, 2019). Незважаючи на те, що полісахаридам екстремофілів можуть бути притаманні унікальні властивості, їхнє комерційне впровадження є дуже обмеженим через низьку ЕПС-синтезувальну здатність (Pirog, Voronenko, & Ivakhniuk, 2018).

Зазначимо, що у переважній більшості досліджень рекомбінантні штами продуцентів отримано з використанням як векторів для перенесення генетичної інформації відповідних плазмід. Оскільки плазмиди та інші мобільні генетичні елементи можуть бути легко сконструйовані, перенесені та експресовані в організмі господаря, вони є зручним інструментом для проведення тестувань і досліджень (Oesterle, Wuethrich, & Panke, 2017). У той же час існує ряд недоліків при використанні рекомбінантних штамів у біотехнологічному виробництві. Так, для відбору рекомбінантних плазмід, зазвичай, містить гени стійкості до певних антибіотиків. При промисловому одержанні цільового продукту наявність антибіотиків у середовищі культивування рекомбінантних продуцентів є додатковим фактором витрат, а потенційне забруднення продукту антибіотиками є ризиком і викликає занепокоєння з екологічної точки зору. Окрім цього, генетична нестабільність може призвести до елімінації плазмиди чи зниження кількості копій, а отже, й втрати продуктивності.

Модифікація функціональних характеристик мікробних полісахаридів. Окрім інтенсифікації синтезу ЕПС, методи генетичної інженерії використовуються для регуляції складу і властивостей полісахаридів.

Ще в 1990 р. було встановлено, що модифікований тетраметр ксантану, з якого завдяки інактивації гену, кодуєму глікозилтрансферазу, видалено термінальну манозу, характеризувався нижчою в'язкістю, ніж ЕПС вихідного штаму (Hassler, & Doherty, 1990).

Пізніші дослідження, проведені у другій половині 90-х XX ст.—початку 2000-х років, підтвердили, що зміни у хімічному складі ЕПС за різних умов культивування продуцентів можуть бути зумовлені зміненням активності або інактивацією ферментів (зокрема, глікозилтрансфераз), які беруть участь в утворенні

нуклеозиддифосфатсахаридів — попередників синтезу ЕПС. Зокрема, у *Rhizobium leguminosarum* мутації в *exoB* гені (аналог *galE*), який кодує синтез УДФ-галактозоепімерази, супроводжувались відсутністю галактози у складі ЕПС (Sanchez-Andujar та ін., 1997). У *galE* мутантів *Erwinia amylovora* змінювався склад синтезованого ліпополісахариду (Metzer, Bellemann, Bugert, & Geider, 1994). У той же час у молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* мутації у *galE* гені не впливали на склад ЕПС, зокрема, на вміст галактози (Boels, Ramos, Kleerebezem, & de Vos, 2001). Було встановлено, що в цих бактерій утворення УДФ-галактози (як і УДФ-глюкози) контролюється іншим ферментом — УДФ-глюкозопірофосфорилазою, синтез якого кодується *galU* геном.

У ЕПС-синтезувальних стрептококів групи В визначено гени (*cpsIaC* і *cpsIaD*), відповідальні за полімеризацію ЕПС (Cieslewicz, Kasper, Wang, & Wesels, 2001). Мутанти, дефектні за цими генами, синтезували ЕПС, склад яких був ідентичний складу ЕПС вихідного штаму, проте з нижчою молекулярною масою (41000—45000 проти 90000—100000 у ЕПС вихідного штаму). Автори зазначають, що білки CpsC та CpsD є схожими за амінокислотним складом до білків грамнегативних бактерій (ExoP у *Rhizobium meliloti* та Wzz у ентеробактерій), які також є відповідальними за довжину синтезованого полісахаридного ланцюга. Ці білки у стрептококів піддані регуляції шляхом фосфорилування-дефосфорилування.

У різних видів бактерій роду *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) кластери генів *exs* та *exr* залучені до синтезу сукциноглюкану та галактоглюкану відповідно (Mendrygal, & Gonzalez, 2000; Becker та ін., 2002). Концентрація фосфатів у середовищі культивування є важливим фактором, який впливає на експресію *exr* генів (Mendrygal, & Gonzalez, 2000; Becker та ін., 2002). Встановлено, що регуляторами транскрипції кластера *exr* генів, який забезпечує синтез галактоглюкану, є білки MucR MucS (Lloret та ін., 2002).

Stingele зі співавт. (Stingele та ін., 1999) досліджували гетерологічну експресію кластеру генів *Streptococcus thermophilus* Sfi6, які кодують синтез ЕПС, у молочнокислих бактерій *L. lactis* MG1363, нездатних до синтезу полісахариду. Отриманий рекомбінантний штам через низьку активність УДФ-*N*-ацетоглюкозамін-С4-епімерази синтезував полісахарид, у складі якого *N*-ацетилгалактозамін був замінений на галактозу.

Нещодавно з'явилася праця (Wu та ін., 2019), в якій, окрім впливу термінальної манозина реологічні характеристики ксантану *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155, додатково досліджували вплив наявності залишків ацетату та пірувату на властивості цього ЕПС. З цієї метою було сконструйовано 8 рекомбінантних штамів з делецією або підвищеною експресією генів *gumF*, *gumG*, *gumL* та *gumI*. Аналогічно даним, викладеним у праці (Hassler, & Doherty, 1990), полісахарид з відсутньою термінальною занозою у складі тетрамеру характеризувався низькою в'язкістю при нульовій швидкості зсуву. У той же час встановлено, що наявність залишків ацетату (на відміну від пірувату), у складі повторюваної одиниці ксантану сприяла стабілізації подвійної спіралі полімеру, а розчинам полісахариду, з складу якого було вилучено глюкуронову кислоту, була притаманна підвищена в'язкість. Є дані про можливість регулювання молекулярної маси ксантану комбінованим підвищенням експресії генів *gumB* та *gumC*

(Galván та ін., 2013).

Інші автори (Díaz-Barrera, Soto, & Altamirano, 2021) продемонстрували можливість збільшення молекулярної маси альгінату *Azotobacter vinelandii* в результаті підвищення експресії гену *alg8*, який кодує синтез каталітичної субодиниці альгінат-полімеразного комплексу. У той же час в експериментах з рекомбінантним штамом *Pseudomonas aeruginosa* PDO300Δ*alg8*, нездатними до синтезу ЕПС, встановлено, що додаткове введення гену *alg8* супроводжувалося підвищенням кількості синтезованого альгінату в 15 разів порівняно з показниками для вихідного штаму PDO300 (Remminghorst, & Rehm, 2006).

Зазначимо, що використання методів генетичної інженерії надає можливість конструювати продуценти з повним циклом синтезу не властивих їм практично цінних біополімерів (Becker, 2015; Wu та ін. 2019; Badri та ін. 2021). Так, Gu зі співавт. (Badri та ін. 2021) сконструювали рекомбінантний штам *E. coli* MG1655Δ*cysH*(DE3) pETM6-PCAFSw, здатний синтезувати приблизно 27 мкг/г біомаси низькомолекулярного хондроїтин сульфату з високим рівнем сульфатування (96%). Етапи конструювання штаму такі: 1) з використанням як вектора плазмиди pETM6-Sw введено гени синтезу сульфотрансферази; 2) порушено синтез фруктозилізованого хондроїтину, який входить до складу капсульного полісахариду продуцента; 3) завдяки репресії гену *cysH*, відповідального за відновлення 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфату до неорганічного сульфіту забезпечено достатній внутрішньоклітинний пул донору сульфату.

У праці (Williams та ін., 2019) продемонстровано можливість гетерологічної експресії генів *Pasteurella multocida*, що кодують гепарозан синтазу (PmHS2), в бактеріях *Bacillus megaterium*. Під час культивування з підживленням у середовищі з ксилостою рекомбінантний штам накопичував до 2,74 г/л гепарозану.

Узагальнені дані щодо синтезу ЕПС продуцентами, вдосконаленими методами генетичної та метаболічної інженерії, наведено в таблиці.

Таблиця. Синтез екзополісахаридів рекомбінантними штамми мікроорганізмів

Вихідний штам продуцента	Генетична модифікація продуцента	Результат генетичної модифікації	Література
<i>Aureobasidium melanogenum</i> P16	Делеція гену CREA	Підвищення синтезу пулулану у 1,25 раза (до 65 г/л)	Wang та ін., 2017
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Підвищення експресії генів <i>pgm2</i> , <i>ugp</i> , <i>fls1</i> та <i>kre6</i>	Підвищення синтезу β-глюкану у 5,4 раза (до 3,41 г/л)	Chen та ін., 2021
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Підвищення експресії гену <i>alg8</i>	Регуляція молекулярної маси альгінату	Díaz-Barrera, Soto, & Altamirano, 2021
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NK-ΔLP	Підвищення експресії гену <i>sacB</i>	Підвищення синтезу ЕПС у 7 разів (до 102 г/л)	Gu та ін., 2017
<i>Bacillus licheniformis</i> CGMCC 2876	Підвищення експресії генів <i>epsB</i>	Підвищення синтезу біофлокулянту на 36,6% (до 10,26 г/л). Підвищення флокуляційної активності на 224 % (до 9612 Од/мл)	Liu та ін., 2017

<i>Bacillus megaterium</i>	Експресія генів, які кодують гепарозан синтазу (PmHS2)	Синтез гепарозану (2,74 г/л)	Williams та ін., 2019
<i>Bacillus subtilis</i> NJ509	Опромінення іонами азоту	Підвищення синтезу ЕПС у 5,4 раза (до 3,41 г/л)	He та ін., 2018
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Підвищення експресії гену <i>hasB</i> Послаблення експресії генів <i>fba</i> та <i>aceE</i> . Делеція генів <i>zwf</i> , <i>ldh</i> , <i>ackA-pta</i> , <i>cat</i> та <i>poxB</i>	Підвищення синтезу гіалуронової кислоти у 22 рази (до 28,7 г/л)	Cheng, Yu, & Stephanopoulos, 2019
<i>Enterobacter cloacae</i> JD	Електротрансформація генетичним матеріалом <i>Geobacillus</i> sp. GW3	Здатність до синтезу ЕПС (8,83 г/л) при температурі 54 °C	Sun та ін., 2011
<i>Escherichia coli</i>	Делеція генів <i>galR</i> , <i>galS</i> , <i>pfkA</i> та <i>zwf</i> Підвищення експресії генів <i>galU-ugd</i>	Синтез гіалуронової кислоти (0,03 г/л) на галактозі	Woo, Seong, Lee, & Jang, 2019
<i>Escherichia coli</i>	Експресія генів, які кодують сульфотрансферазу. Делеція генів, які кодують фруктозилтрансферазу. Репресія гену <i>cysH</i>	Синтез низькомолекулярного хондроїтин сульфату з високим рівнем сульфатування (27 мкг/г біомаси)	Badri та ін., 2021
<i>Escherichia coli</i> JM109(DE3)	Делеція гену <i>waaF</i>	Підвищення синтезу коланової кислоти у 12 разів (до 1,90 г/л)	Han та ін., 2021
<i>Lactobacillus casei</i> LC2W	Підвищення експресії гену <i>nox</i>	Підвищення синтезу ЕПС на 46% (до 0,2 г/л)	Li та ін., 2015, a
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Експресія кластеру ЕПС генів <i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi6	Заміна N-ацетилгалактозаміну складі ЕПС вихідного штаму на галактозу	Stingele та ін., 1999
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Підвищення експресії гену <i>exoY</i>	Підвищення синтезу ЕПС у 2,3—2,5 раза	Jones, 2012
<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	Підвищення експресії гену <i>pgmG</i>	Підвищення синтезу ЕПС на 17% (до 12,6 г/л)	Huang та ін., 2013
<i>Sphingomonas sanxanigenens</i> NX02	Делеція гену <i>phbB</i> . Плазмовий мутагенез	Підвищення синтезу ЕПС у 1,4 раза (до 21,2 г/л)	Wu та ін., 2018
<i>Sphingomonas</i> sp.	Експресія гену гемоглобіну <i>vgb</i>	Підвищення синтезу пулулану у 1,4 раза (до 34,6г/л). Мінімізація лімітування за киснем при глибинному культивуванні	Liu та ін., 2016

<i>Streptococcus thermophilus</i> TMB 6013	Підвищення експресії генів <i>galE</i> , <i>galT</i> та <i>galK</i>	Підвищення виходу ЕПС від субстрату у 3,3 раза (до 0,5 г ЕПС/г лактози)	Svensson, Waak, Svensson, & Rådström, 2005
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Порушення експресії гену <i>glgC</i> . Підвищення експресії гену <i>gpi</i>	Підвищення синтезу ЕПС у 7,4 раза (до 1,3 г/л)	Velmurugan, & Incharoensakdi, 2021
<i>Xanthomonas campestris</i>	Підвищення експресії генів <i>gumB</i> та <i>gumC</i>	Регуляція молекулярної маси ксантану	Galván та ін., 2013
<i>Xanthomonas campestris</i> CGMCC 15155	Підвищення експресії або делеція генів <i>gumF</i> , <i>gumG</i> , <i>gumL</i> та <i>gumI</i>	Регуляція реологічних характеристик ксантану	Wu та ін., 2019

Висновки

Проаналізовані літературні дані останніх років щодо шляхів підвищення ефективності технологій мікробних ЕПС засвідчили необхідність комплексного підходу для вирішення цього завдання, у тому числі й застосування методів метаболічної та генетичної інженерії. Реалізація цих методів дає змогу виявити та усунути «вузькі місця» метаболізму продуцентів екзополісахаридів, інтенсифікувати синтез полісахаридів, модифікувати склад та властивості ЕПС, розширити набір субстратів для їхнього синтезу. Основними шляхами регуляції метаболізму продуцентів мікробних ЕПС є спрямування вуглецю субстрату на синтез цільового продукту за рахунок підвищення рівня експресії ключових генів біосинтезу полісахаридів і делеції генів конкуруючих метаболічних шляхів.

Література

- Пирог, Т. П., Вороненко, А. А. (2023). Шляхи підвищення ефективності технологій синтезу мікробних екзополісахаридів. Частина 1. Встановлення оптимальних умов біосинтезу. *Наукові праці НУХТ*, 29(1), 7—24. Взято з: http://sw.nuft.edu.ua/Archiv/2023/swnuft_29_1.pdf.
- Anderson, L. A., Islam, M. A., Prather, K. L. J. (2018). Synthetic biology strategies for improving microbial synthesis of "green" biopolymers. *Journal of Biological Chemistry*, 293(14), 5053—5061. doi: 10.1074/jbc.TM117.000368.
- Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3:200. doi: 10.3389/fbioe.2015.00200.
- Badri, A., Williams, A., Awofiranye, A., Datta, P., Xia, K., He, W. et al. (2021). Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 12:1389. doi: 10.1038/s41467-021-21692-5.
- Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari, F. M., Molina, G. (2020). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), 1475—1495. doi: 10.1080/10408398.2019.1575791.
- Becker, A. (2015). Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Frontiers in Microbiology*, 6:687. doi: 10.3389/fmicb.2015.00687.
- Becker, A., Ruberg, S., Baumgarth, B., Bertram-Drogatz, P. A., Quester, L., Puhler, A. (2002). Regulation of succinoglucan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(3), 187—190.

- Boels, I. C., Ramos, A., Kleerebezem, M., de Vos, W. M. (2001). Functional analysis of the *Lactococcus lactis* *galU* and *galE* genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3033—3040.
- Chen, X., Wang, Y., He, C. Y., Wang, G. L., Zhang, G. C., Wang, C. L. et al. (2021). Improved production of β -glucan by a T-DNA-based mutant of *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6887—6898. doi: 10.1007/s00253-021-11538-x.
- Cheng, F., Yu, H., Stephanopoulos, G. (2019). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering*, 55, 276—289. doi: 10.1016/j.ymben.2019.07.003.
- Cieslewicz, M. J., Kasper, D. L., Wang, Y., Wessels, M. R. (2001). Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 139—146.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951—962. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083.
- Díaz-Barrera, A., Soto, E., Altamirano, C. (2021). Alginate production and *alg8* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 613—621. doi: 10.1007/s10295-011-1055-z.
- Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388—398. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008.
- Freitas, F., Torres, C. A. V., Reis, M. A. M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245(Pt B), 1674—1683. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.092.
- Galván, E. M., Ielmini, M. V., Patel, Y. N., Bianco, M. I., Franceschini, E. A., Schneider, J. C. et al. (2013). Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB. *Glycobiology*, 23(2), 259—272. doi: 10.1093/glycob/cws146.
- Gu, Y., Zheng, J., Feng, J., Cao, M., Gao, W., Quan, Y. et al. (2017). Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4163—4174. doi: 10.1007/s00253-017-8171-2.
- Han, H. M., Kim, I. J., Yun, E. J., Lee, J. W., Cho, Y., Jin, Y. S. et al. (2021). Overproduction of exopolysaccharide colanic acid by *Escherichia coli* by strain engineering and media optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 193(1), 111—127. doi: 10.1007/s12010-020-03409-4.
- Hassler, R. A., Doherty, D. H. (1990). Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Progress*, 6(3), 182—187.
- He, X., He, F., Hang, J., Li, H., Chen, Y., Wei, P. et al. (2018). Enhanced production of exopolysaccharides using industrial grade starch as sole carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(6), 811—817. doi: 10.1007/s00449-018-1915-2.
- Huang, H., Li, X., Wu, M., Wang, S., Li, G., Ma, T. (2013). Cloning, expression and characterization of a phosphoglucomutase/phosphomannomutase from sphingane-producing *Sphingomonas sanxanigenens*. *Biotechnology Letters*, 35, 1265—1270. doi: 10.1007/s10529-013-1193-7.
- Jones, K. M. (2012). Increased production of the exopolysaccharide succinoglycan enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiosis with the host plant *Medicago truncatula*. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4322—4331. doi: 10.1128/JB.00751-12.
- Li, N., Wang, Y., Zhu, P., Liu, Z., Guo, B., Ren, J. (2015a). Improvement of exopolysaccharide production in *Lactobacillus casei* LC2W by overexpression of NADH oxidase gene. *Microbiological Research*, 171, 73—77. doi: 10.1016/j.micres.2014.12.006.
- Li, N., Huang, Y., Liu, Z., You, C., Guo, B. (2015b). Regulation of EPS production in

Lactobacillus casei LC2W through metabolic engineering. *Letters in Applied Microbiology*, 61(6), 555—561. doi: 10.1111/lam.12492.

Liu, P., Chen, Z., Yang, L., Li, Q., He, N. (2017). Increasing the biofloculant production and identifying the effect of overexpressing *epsB* on the synthesis of polysaccharide and γ -PGA in *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 16:163. doi: 10.1186/s12934-017-0775-9.

Liu, X., Zhu, P., Jiang, R., Wu, L., Feng, X., Li, S. et al. (2016). Enhancement of welan gum production in *Sphingomonas* sp. HT-1 via heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Carbohydrate Polymers*, 156, 135—142. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.08.081.

Lloret, J., Martin, M., Oruezabal, R. I., Bonilla, I., Rivilla, R. (2002). MucR and mucC activate *exp* genes transcription and galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(1), 54—59.

Mendrygal, K. E. Gonzalez, J. E. (2000). Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 182(3) 559—606.

Metzer, M., Bellemann, P., Bugert, P., Geider, K. (1994). Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *Journal of Bacteriology*, 176, 450—459.

Oesterle, S., Wuethrich, I., Panke, S. (2017). Toward genome-based metabolic engineering in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 101, 49—82. doi: 10.1016/bs.aambs.2017.07.001.

Öner, E. T., Hernández, L., Combie, J. (2016). Review of levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 34(5), 827—844. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.002.

Pirog, T. P., Voronenko, A. A., Ivakhniuk, M. O. (2018). Non-traditional producers of microbial exopolysaccharides. *Biotechnologia acta*, 11(4), 5—27. doi: 10.15407/biotech11.04.005.

Rana, S., Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 577—583. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084.

Rehm, B. H. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578—592. doi: 10.1038/nrmicro2354.

Remminghorst, U., Rehm, B. (2006). *In vitro* alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 298—305. doi: 10.1128/AEM.72.1.298-305.2006.

Ruiz-Villafán, B., Cruz-Bautista, R., Manzo-Ruiz, M., Passari, A. K., Villarreal-Gómez, K., Rodríguez-Sanoja, R. et al. (2021). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation, an old but not well-established regulatory system. *Microbial Biotechnology*, 1—15. doi: 10.1111/1751-7915.13791.

Sanchez-Andujar, B., Colorado, C., Philip-Hollingsworth, S., Dazzo, F. B., Palomares, A. J. (1997). Structure and role in symbiosis of *exoB* gene of γ *Rhizobium leguminosarum* by. *trifolii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 255, 131—140.

Schilling, C., Badri, A., Sieber, V., Koffas, M., Schmid, J. (2020). Metabolic engineering for production of functional polysaccharides. *Current Opinion in Biotechnology*, 66, 44—51. doi: 10.1016/j.copbio.2020.06.010.

Schmid, J. (2018). Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 130—136. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.005.

Schmid, J., Heider, D., Wendel, N. J., Sperl, N., Sieber, V. (2016). Bacterial glycolsyl-transferases: challenges and opportunities of a highly diverse enzyme class toward tailoring natural products. *Frontiers in Microbiology*, 7:182. doi: 10.3389/fmicb.2016.00182.

Schmid, J., Sieber, V., Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6:496. doi: 10.3389/fmicb.2015.00496.

Stingele, F., Vincent, S. J. F., Faber, E. J., Newell, J. W., Kamerling, J. P., Nesser, J. R. (1999). Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into

Lactococcus lactis MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Molecular Microbiology*, 32(6), 1287—1295. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01441.x.

Sun, X., Zhang, J. (2021). Bacterial exopolysaccharides: chemical structures, gene clusters and genetic engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 481—490. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.139.

Sun, S., Zhang, Z., Luo, Y., Zhong, W., Xiao, M., Yi, W. et al. (2011). Exopolysaccharide production by a genetically engineered *Enterobacter cloacae* strain for microbial enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*, 102(10), 6153—6158. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.005.

Svensson, M., Waak, E., Svensson, U., Rådström, P. (2005). Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6398—6400. doi: 10.1128/AEM.71.10.6398-6400.2005.

Velmurugan, R., Incharoensakdi, A. (2021). Overexpression of glucose-6-phosphate isomerase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with disrupted glycogen synthesis pathway improves exopolysaccharides synthesis. *Algal Research*, 57:102357. doi: 10.1016/j.algal.2021.102357.

Wang, Q. Q., Lu, Y., Ren, Z. Y., Chi, Z., Liu, G. L., Chi, Z. M. (2017). CreA is directly involved in pullulan biosynthesis and regulation of *Aureobasidium melanogenum* P16. *Current Genetics*, 63(3), 471—485. doi: 10.1007/s00294-016-0650-y.

Wang, J., Salem, D. R., Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: a review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers*, 205, 8—26. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.011.

Williams, A., Gedeon, K. S., Vaidyanathan, D., Yu, Y., Collins, C. H., Dordick, J. S. et al. (2019). Metabolic engineering of *Bacillus megaterium* for heparosan biosynthesis using *Pasteurella multocida* heparosan synthase, PmHS2. *Microbial Cell Factories*, 18:132. doi: 10.1186/s12934-019-1187-9.

Woo, J. E., Seong, H. J., Lee, S. Y., Jang, Y.-S. (2019). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of hyaluronic acid from glucose and galactose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:351. doi: 10.3389/fbioe.2019.00351.

Wu, M., Shi, Z., Tian, X., Shen, Y., Qu, J., Dai, X. et al. (2018). Enhancement of transparent hydrogel sanxan production in *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 via rational and random gene manipulation. *Carbohydrate Polymers*, 189, 210—217. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.02.027.

Wu, M., Qu, J., Tian, X., Zhao, X., Shen, Y., Shi, Z. et al. (2019). Tailor-made polysaccharides containing uniformly distributed repeating units based on the xanthan gum skeleton. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 646—653. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.130.

Xiong, Z., Chen, H., Song, X., Xia, Y., Ai, L. (2022). Rapid isolation of exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* based on molecular marker screening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(2), 862—867. doi: 10.1002/jsfa.11398.