

## Полисахарида разрушающие ферменты как агенты, диспергирующие бактериальные биопленки

For citation: Zdorov'e Rebenka. 2020;15(4):271-278. doi: 10.22141/2224-0551.15.4.2020.208478

**Резюме.** Развитие бактериальных биопленок зависит от секреции и сохранения внеклеточных полисахаридов, или экзополисахаридов, которые являются основными компонентами внеклеточного полисахаридного вещества биопленки. Экзополисахариды внеклеточного полисахаридного вещества обеспечивают структурную стабильность биопленки, адгезию и агрегацию микроорганизмов, физическую и химическую защиту бактерий от действия противомикробных препаратов и эффекторов иммунной системы макроорганизма. Бактериальные клетки, расположенные в биопленке, защищены от антибактериальных эндо- и экзофакторов внеклеточным полимерным матриксом. Для инициирования диспергирования биопленок микроорганизмы наряду с другими ферментами используют специфические гликозидгидролазы, которые разрушают полисахариды бактериальных биопленок. Гликозидгидролазы реализуют свое действие через гидролиз гликозидных связей: амилазы расщепляют  $\alpha$ -1,4-; целлюлазы —  $\beta$ -1,4-;  $\beta$ -галактозидазы —  $\beta$ -1,3-гликозидные связи. Основными гликозидгидролазами, которые обладают антибиопленочным действием, являются:  $\alpha$ -лизоцим, амилазы, дисперсин В, целлюлазы, гиалуронидаза,  $\alpha$ - и  $\beta$ -маннозидазы, альгинат-лиазы. Данные ферменты вызывают разрушение полисахаридных полимеров, способствуют высвобождению бактерий. Бактерии, которые лишились защиты полисахаридного каркаса, подвергаются воздействию антибактериальных агентов. С учетом того, что деградация экзополисахаридов биопленок гликозидгидролазами приводит к выраженному диспергированию бактерий, данный антибиопленочный метод лечения может представлять собой универсальный подход к терапии инфекций, протекающих с формированием биопленок. Медикаментозные методы диспергирования биопленок при помощи полисахарида разрушающих ферментов, без сомнения, расширят арсенал антибиопленочной терапии хронических и рецидивирующих бактериальных инфекций, особенно вызванных антибиотикорезистентными бактериями.

**Ключевые слова:** бактериальные биопленки; диспергирование; полисахарида разрушающие ферменты

### Введение

Формирование и диспергирование биопленок зависит от секретируемых бактериями внеклеточных полисахаридов, или экзополисахаридов, как основных компонентов внеклеточного полисахаридного вещества (extracellular polysaccharide substance — EPS) биопленок. Экзополисахариды EPS обеспечивают структурную стабильность биопленки, адгезию и агрегацию микроорганизмов, физическую и химическую защиту бактерий от действия противомикробных препаратов и эффекторов иммунной системы макроорганизма [12]. Микроорганизмы

используют специфические гликозидгидролазы (glycoside hydrolase — GH) для инициирования событий диспергирования. Например, дисперсин В представляет собой  $\beta$ -гексозаминидазу, которая продуцируется грамотрицательной бактерией *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [24]. Деградация экзополисахаридов EPS рекомбинантными гликозидгидролазами приводит к выраженному диспергированию бактерий, в связи с чем данный подход к разрушению биопленок может представлять собой универсальный метод лечения в клинических условиях инфекций, протекающих с формированием биопленок. Среди

© 2020. The Authors. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для корреспонденции: Абатуров Александр Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии 1 и медицинской генетики, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», ул. Вернадского, 9, г. Днепр, 49044, Украина; e-mail: alexabaturov@i.ua

For correspondence: Oleksandr Abatur, MD, PhD, Professor, Head of the Department of pediatrics 1 and medical genetics, State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Vernadsky st., 9, Dnipro, 49044, Ukraine; e-mail: alexabaturov@i.ua

Full list of author information is available at the end of the article.

полисахаридных гидролизующих ферментов наиболее изученными являются: лизоцим, альгинатные лиазы, дисперсин В и амилазы [28].

## Основные бактериальные гликозидгидролазы

Основные бактериальные GH, которые обладают способностью деградировать экзополисахариды EPS бактериальной биопленки, представлены в табл. 1.

Гликозидгидролазы представляют собой энзимы, которые гидролизуют гликозидные связи. Сведения о GH аккумулированы в базе данных Carbohydrate-Active enZYme (CAZy <http://www.cazy.org/>).

Углеводно-активные ферменты, которые разлагают или модифицируют полисахариды, связываются с субстратом при помощи углеводсвязывающего сайта, расположенного вне области активного сайта. Углеводсвязывающие сайты располагаются на углеводсвязывающих модулях (carbohydrate-binding modules — CBM) или на сайтах связывания с поверхностью (surface-binding sites — SBS) (рис. 1).

Целлюлозосвязывающий домен (Cellulose-binding domain — CBD) был первоначально определен как некаталитический полисахаридраспознающий модуль GH. Этот модуль связывает лиганд, такой как целлюлоза и другие углеводы. В настоящее время существует 81 определенное семейство CBM, обладающих аффинитетом к различным лигандам (<http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>) (табл. 2) [3, 7].

Различные GH разрушают определенные гликозидные связи:  $\alpha$ -амилазы расщепляют  $\alpha$ -1,4-; целлюлазы —  $\beta$ -1,4-;  $\beta$ -галактозидазы —  $\beta$ -1,3-гликозидные связи (рис. 2) [11].

## Альфа-амилазы

Ферменты  $\alpha$ -амилазы (EC 3.2.1.1), как и дисперсин В (DspB), разрушают биопленки, сформированные бактериями *Staphylococcus aureus*, EPS которых содержит полисахаридный межклеточный адгезин (polysaccharide intercellular adhesin — PIA)/полимерный N-ацетилглюкозамин PNAG. Различные  $\alpha$ -амилазы, происходящие из разных таксономических источников, могут значительно отличаться друг от друга по предпочтению субстрата [15]. Кроме того, молекулы  $\alpha$ -амилаз содержат по меньшей мере две разные аминокислотные последовательности, использующие два разных каталитических механизма, которые эволюционировали для достижения одинаковой  $\alpha$ -амилолитической специфичности. В связи с этим амилазы были классифицированы на четыре семейства GH: GH13, GH57, GH119, GH126 [16]. В качестве примера представлено филогенетическое дерево семейства гликозидгидролаз GH13 (рис. 3).

Антибиопленочная активность  $\alpha$ -амилазы зависит от ее происхождения. Наиболее высокая антибиопленочная активность отмечается у  $\alpha$ -амилазы бактерий *Bacillus subtilis*. В то время как ферменты, полученные из человеческой слюны и сладкого картофеля, не влияют на сформированные патологические биопленки [15, 29, 33].

Представляет интерес то, что  $\alpha$ -амилаза преимущественно разрушает биопленки, сформированные чувствительными к метициллину бактериями *Staphylococcus aureus* (meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* — MSSA). Продемонстрировано, что чувствительность к метициллину сопряжена с фенотипом бактериальной биопленки. Так, EPS биопленки

Таблица 1. Гликозидазы, участвующие в диспергировании бактериальной биопленки [12]

Фермент	Краткая характеристика
$\alpha$ -амилазы ( $\alpha$ -amylase)	GH, гидролизующая 1,4-гликозидные связи, участвует в диспергировании зрелых биопленок, образованных бактериями <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Дисперсин В (dispersin B)	GH бактерий <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , субстратом которой является поли- $\beta$ (1,6)-N-ацетил-D-глюкозамин (Poly- $\beta$ (1,6)-N-acetyl-D-glucosamine — PNAG). Данный фермент эффективен против биопленок, формируемых бактериями <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Burkholderia</i> spp., <i>Yersinia pestis</i> и <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Целлюлазы (cellulase)	GH, гидролизующая $\beta$ (1,4)-гликозидную связь. Разрушает биопленки бактерий <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Гиалуронидаза (Hyaluronidase)	Фермент, который расщепляет гиалуроновую кислоту и способствует деградации биопленок бактерий <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i>
$\alpha$ -маннозидазы ( $\alpha$ -mannosidase)	Кислотная гидролаза, разрушающая биопленки бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
$\beta$ -маннозидазы ( $\beta$ -mannosidase)	GH, отщепляющая $\beta$ (1,4)-связанные концевые маннозные остатки и разрушающая биопленки бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Альгинат-лиазы (alginate lyase — algL)	GH, которая разрушает экзополисахариды, альгинаты биопленок бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PeIAh	GH, разрушающая полисахариды бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PslGH	GH, разрушающая полисахариды бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

метициллин-резистентных бактерий *Staphylococcus aureus* (meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA) содержит аутолизин Atl, eDNA и протеины, связывающие фибронектин, FnBPA и FnBPB (фенотип Atl/FnBP). В то время как EPS биопленки пре-

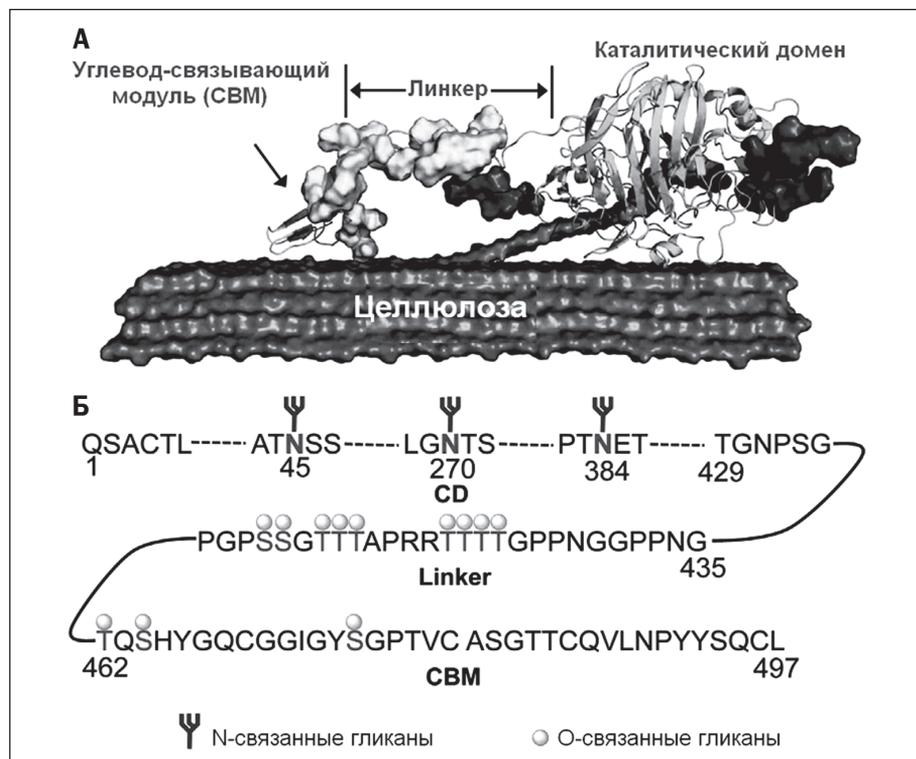
имущественно содержит PIA/PNAG (фенотип PIA/PNAG) [23].

Установлено, что  $\alpha$ -амилаза разлагает биопленку с фенотипом PIA/PNAG, образованную бактериями *Staphylococcus aureus*, на 79 % в течение 5 минут и на 89 % в течение 30 минут инкубации. Влияние амилазы в концентрации 10, 20 и 100 мг/мл приводит к уменьшению объема биопленки *Staphylococcus aureus* на 72, 89 и 90 % соответственно [8, 17].

Согласно результатам исследования антибиопленочной активности четырех ферментных соединений, проведенного *in vitro* с использованием модели биопленки бактерий *Staphylococcus aureus*, которая имитирует раневидные состояния, лизостафин уменьшает биомассу биопленки на 76 %, а  $\alpha$ -амилаза, бромелайн и папаин — на 97, 98 и 98 % соответственно. Сканирующая электронная микроскопия подтвердила, что диспергирующие ферментные агенты отделяют матрицу экзополисахарида биопленки от поверхности, на которой сформировалась биопленка [31].

### Дисперсин В

Дисперсин В продуцируется грамотрицательными коккобациллами *Actinobacillus actinomy-*



**Рисунок 1. Структура и взаимодействие гликозидгидролаз с целлюлозой (на примере целлюлазы, продуцируемой *Trichoderma reesei* — TrCel7A) [14]**

**Примечания:** А. Доменное строение целлюлазы TrCel7A — углеводсвязывающий модуль и каталитический домен, которые соединены линкером. Б. Схема аминокислотной последовательности TrCel7A с расположением сайтов гликозилирования, помеченных красным цветом.

**Таблица 2. Классификация СВМ, основанная на специфичности лигандов [3]**

Лиганды	Семейство СВМ
Целлюлоза	СВМ1, СВМ2, СВМ3, СВМ4, СВМ6, СВМ8, СВМ9, СВМ10, СВМ16, СВМ17, СВМ28, СВМ30, СВМ37, СВМ44, СВМ46, СВМ49, СВМ59, СВМ63, СВМ64, СВМ65, СВМ73, СВМ76, СВМ78, СВМ80, СВМ81
Ксилан	СВМ2, СВМ4, СВМ6, СВМ9, СВМ13, СВМ15, СВМ22, СВМ31, СВМ35, СВМ36, СВМ37, СВМ44, СВМ54, СВМ59, СВМ60, СВМ64, СВМ72
Стенка клеток растений (например, $\beta$ -глюканы, порфираны, пектины, маннаны, глюко- и галактуронаны)	СВМ4, СВМ6, СВМ11, СВМ13, СВМ16, СВМ22, СВМ23, СВМ27, СВМ28, СВМ29, СВМ32, СВМ35, СВМ39, СВМ42, СВМ43, СВМ52, СВМ56, СВМ59, СВМ61, СВМ62, СВМ67
Хитин	СВМ1, СВМ2, СВМ5, СВМ6, СВМ12, СВМ13, СВМ14, СВМ16, СВМ18, СВМ19, СВМ50, СВМ54, СВМ55, СВМ73
$\alpha$ -глюканы (крахмал/гликоген, мутант)	СВМ20, СВМ21, СВМ25, СВМ26, СВМ34, СВМ41, СВМ45, СВМ48, СВМ53, СВМ58, СВМ68, СВМ69, СВМ74
Гликаны млекопитающих	СВМ32, СВМ40, СВМ47, СВМ51, СВМ57
Другие	Сахара бактериальной клеточной стенки: СВМ35, СВМ39, СВМ50 Фруктаны: СВМ38, СВМ66 Глюканы из клеточной стенки дрожжей: СВМ54



счет действия AgNP. Применение конъюгата AgNP-DspB при биопленке, сформированной бактериями *Staphylococcus epidermidis*, сопровождалось деградацией 69 % биопленки, в то время как использование только DspB приводило к уменьшению массы биопленки на 37 %. Авторы полагают, что конъюгат AgNP-DspB может быть использован при лечении стафилококковых инфекций раневых поверхностей.

Charlene Babra Waryah и соавт. [30] показали, что ДНКаза I и дисперсин B одинаково способствуют повышению антибактериальной эффективности тобрамицина за счет разрушения *Staphylococcus aureus*-ассоциированной биопленки. Однако комбинация этих двух разрушающих биопленку ферментов менее эффективно способствует повышению антибактериальной эффективности тобрамицина, чем моноприменение данных ферментов. Эти данные указывают на то, что комбинации различных разрушающих биопленку ферментов могут поставить под угрозу антимикробную эффективность антибиотиков и их необходимо тщательно оценивать *in vitro*, прежде чем использовать для дезинфекции медицинских устройств или в фармацевтических составах для лечения хронических инфекций респираторного тракта.

### Целлюлазы

Целлюлоза, полимер  $\beta$ -1,4-связанных молекул глюкозы, является основным полисахаридным компонентом клеточных стенок растений и наиболее распространенным органическим полимером на Земле. Семейство гликозидгидролаз-74 (GH74) представляет собой исторически важное семейство

эндо- $\beta$ -глюканаз, которое первоначально считалось семейством целлюлазы [2]. Около 24 % бактерий продуцируют целлюлазы. Существует два распространенных типа активных сайтов целлюлаз. Гликозидные гидролизы с открытыми (бороздчатые, расщепленные) активными центрами обычно проявляют эндоцеллюлолитическую активность (эндоцеллюлазы), связываясь в любом месте по длине молекулы целлюлозы и гидролизуя  $\beta$ -1,4-гликозидную связь, в то время как те целлюлазы, у которых активный сайт имеет туннелеподобную форму, проявляют экзоцеллюлолитическую активность (целлобиогидролазы), связываясь на концах молекулы целлюлозы и продуцируя олигосахаридные продукты единичной длины. Как правило, экзоцеллюлазы являются процессивными ферментами, то есть они прикрепляются к целлюлозной цепи до тех пор, пока она полностью не гидролизуется [19, 27].

Целлюлазы расщепляют  $\beta$ -1,4-гликозидные связи, и конечным продуктом данного гидролиза является целлобиоза, которая представляет собой дисахарид глюкозы, способный репрессировать целлюлолитический механизм и подавлять активность целлюлазы [4].

Многочисленные целлюлазы относятся к различным классам GH (табл. 3).

Целлюлаза легко гидролизует Psl бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и устраняет Psl с поверхности клетки. При обработке целлюлазой Psl, по-видимому, отделяется от поверхности бактерий. Установлено, что целлюлаза может высвобождать Psl с поверхности бактериальных клеток, не разрушая основной полимер Psl. По всей вероятности, данный феномен обуслов-

Таблица 3. Эндо- и экзоцеллюлазы [27]

CAZy семейство	Складка	Тип действия
GH5	$(\beta/\alpha)_8$	Эндо
GH5	$(\beta/\alpha)_8$	Экзо
GH6	Atypical $\beta/\alpha$ barrel	Эндо
GH6	Atypical $\beta/\alpha$ barrel	Экзо
GH7	$\beta$ -jelly roll	Эндо
GH7	$\beta$ -jelly roll	Экзо
GH8	$(\alpha/\alpha)_6$	Эндо
GH9	$(\alpha/\alpha)_6$	Эндо
GH9	$(\alpha/\alpha)_6$	Экзо
GH12	$\beta$ -jelly roll	Эндо
GH23	$\alpha_8$ superhelical	Эндо
GH44	$(\beta/\alpha)_8$	Эндо
GH45	$\beta_6$ -barrel	Эндо
GH48	$(\alpha/\alpha)_6$	Эндо
GH48	$(\alpha/\alpha)_6$	Экзо
GH51	$(\beta/\alpha)_8$	Эндо
GH61	$\beta$ -sandwich with an Ig-like topology. $\beta_3\alpha_5$	Эндо
GH74	7-fold $\beta$ -propeller	Эндо

лен тем, что  $\beta$ -1,3- или  $\beta$ -1,4-связанная глюкоза может быть моносахаридом, который связывает Psl с бактериальной поверхностью [22].

### Альгинат-лиазы

Альгинат представляет собой линейный анионный полисахарид с высокой молекулярной массой, который состоит из  $\beta$ -1,4-гликозидно-связанной  $\alpha$ -L-гулуруновой (G) и  $\beta$ -D-маннуруновой (M) кислоты и является характерным компонентом биопленки бактерий *Pseudomonas* и *Azotobacter*. Альгинат защищает бактерии от агрессивных факторов окружающей среды и способствует их адгезивной активности. Гены, участвующие в синтезе альгината, транскрибируются при адгезии бактерий к поверхностям, что приводит к развитию биопленки. При определенных условиях бактерии *Pseudomonas aeruginosa* экспрессирует algL, которая расщепляет альгинатный полимер на короткие олигосахариды, что приводит к подавлению адгезии и отделению бактерий от биологической поверхности. Диспергирование бактерий из биопленки позволяет микроорганизмам колонизировать новые сайты макроорганизма [9, 26].

Альгинат-лиазы делятся на G-специфические (EC4.2.2.11) и M-специфические (EC4.2.2.3) ферменты. Полисахаридные лиазы на основании гомологии аминокислотных последовательностей делятся на несколько семейств. К настоящему времени идентифицировано более 1774 последовательностей альгинат-лиаз, которые образуют 7 ферментативных семейств

[21, 32, 34]. Действие альгинат-лиазы происходит в три этапа: 1) удаление отрицательного заряда карбоксилат-аниона; 2) отведение протона на C5; 3)  $\beta$ -элиминация 4-O-гликозидной связи (лиазы) (рис. 4) [28].

Альгинат-лиазы отличаются субстратной специфичностью. Установлено, что альгинат-лиаза бактерий *Pseudomonas aeruginosa* проявляет активность как к поли-M, так и к поли-G альгинату [13].

Продемонстрировано, что альгинат-лиаза в концентрации 20 ед/мл в комбинации с гентамицином (64 мкг/мл) вызывает деградацию биопленки, сформированной *Pseudomonas aeruginosa*. Инкубация биопленки с альгинат-лиазой и гентамицином в течение 96 часов приводила к полному исчезновению ее структур [1].

Продемонстрировано, что сайт-специфическое монопегилирование гено-инженерной альгинат-лиазы A1-III усиливает антибиопленочную активность. Гено-инженерная альгинат-лиаза A1-III способствует элиминации более чем 90 % адгезивных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* из биопленки [20].

Полагают, что альгинат-лиаза обязательно получит клиническое применение для лечения заболеваний, связанных с развитием бактериальных биопленок слизистых оболочек респираторного тракта.

### Выводы

Бактериальные клетки, расположенные в биопленке, защищены от антибактериальных эндо- и экзофакторов внеклеточным полимерным матриксом, основу которого составляют бактериальные полисахаридные соединения, которые синтезируются самими бактериями. Ферменты, которые расщепляют полисахаридные полимеры, вызывают разрушение бактериальных биопленок, что сопровождается высвобождением бактерий. Лишение защиты полисахаридов EPS способствует эффективному воздействию антибактериальных агентов на бактерии. Медикаментозные методы диспергирования биопленок при помощи полисахаридразрушающих ферментов, без сомнения, расширяют арсенал антибиопленочной терапии хронических и рецидивирующих бактериальных инфекций, особенно вызванных антибиотикорезистентными бактериями.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов и собственной финансовой заинтересованности при подготовке данной статьи.

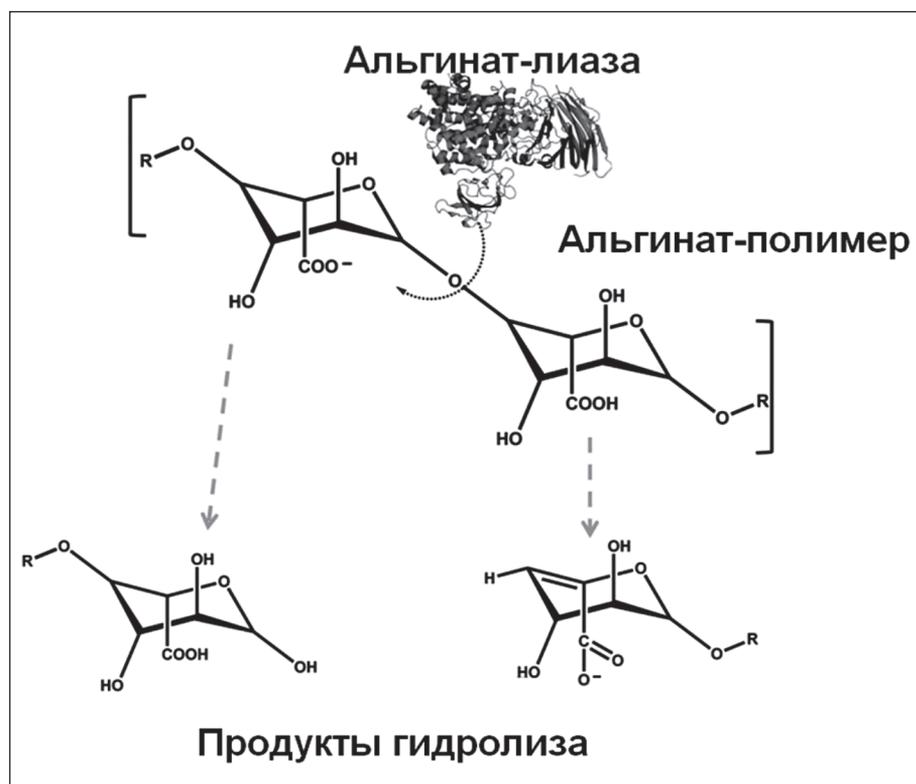


Рисунок 4. Гидролиз альгината при помощи альгинат-лиазы [28]

Примечание: альгинат-лиаза катализирует гидролиз альгината, сополимера L-гулуруната (G) и C5-эпимера-D-маннуруната (M) посредством  $\beta$ -элиминации.

## References

- Alkawash MA, Soothill JS, Schiller NL. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS*. 2006;114(2):131-138. doi:10.1111/j.1600-0463.2006.apm\_356.x.
- Arnal G, Stogios PJ, Asohan J, et al. Substrate specificity, regiospecificity, and processivity in glycoside hydrolase family 74. *J Biol Chem*. 2019;294(36):13233-13247. doi:10.1074/jbc.RA119.009861.
- Baroroh U, Yusuf M, Rachman SD, et al. The Importance of Surface-Binding Site towards Starch-Adsorptivity Level in  $\alpha$ -Amylase: A Review on Structural Point of View. *Enzyme Res*. 2017;2017:4086845. doi:10.1155/2017/4086845.
- Berlemont R, Martiny AC. Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(5):1545-1554. doi:10.1128/AEM.03305-12.
- Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah Ch, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;75(1):125-132. doi:10.1007/s00253-006-0790-y.
- Chen KJ, Lee CK. Twofold enhanced dispersin B activity by N-terminal fusion to silver-binding peptide for biofilm eradication. *Int J Biol Macromol*. 2018;118(Pt A):419-426. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.06.066.
- Cockburn D, Wilkens C, Ruzanski C, et al. Analysis of surface binding sites (SBSs) in carbohydrate active enzymes with focus on glycoside hydrolase families 13 and 77 — a mini-review. *Biologia*. 2014;69(6):705-712. doi:10.2478/s11756-014-0373-9.
- Craig B, Dashiff A, Kadouri DE. The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Open Microbiol J*. 2011;5:21-31. doi:10.2174/1874285801105010021.
- Ertesvåg H. Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses. *Front Microbiol*. 2015;6:523. doi:10.3389/fmicb.2015.00523.
- Fekete A, Borbás A, Gyémánt G, et al. Synthesis of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked N-acetyl-D-glucosamine oligosaccharide substrates and their hydrolysis by Dispersin B. *Carbohydr Res*. 2011;346(12):1445-1453. doi:10.1016/j.carres.2011.03.029.
- Fleming D, Chahin L, Rumbaugh K. Glycoside Hydrolases Degrade Polymicrobial Bacterial Biofilms in Wounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(2):e01998-16. doi:10.1128/AAC.01998-16.
- Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms*. 2017;5(2):15. doi:10.3390/microorganisms5020015.
- Ghadam P, Akhlaghi F, Ali AA. One-step purification and characterization of alginate lyase from a clinical *Pseudomonas aeruginosa* with destructive activity on bacterial biofilm. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(5):467-473. doi:10.22038/IJBMS.2017.8668.
- Greene ER, Himmel ME, Beckham GT, Tan Z. Glycosylation of Cellulases: Engineering Better Enzymes for Biofuels. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2015;72:63-112. doi:10.1016/bs.accb.2015.08.001.
- Hogan S, Zapotoczna M, Stevens NT, Humphreys H, O'Gara JP, O'Neill E. Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. *J Hosp Infect*. 2017;96(2):177-182. doi:10.1016/j.jhin.2017.02.008.
- Janeček Š, Gabriško M. Remarkable evolutionary relatedness among the enzymes and proteins from the  $\alpha$ -amylase family. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(14):2707-2725. doi:10.1007/s00018-016-2246-6.
- Kalpna BJ, Aarthy S, Pandian SK. Antibiofilm activity of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;167(6):1778-1794. doi:10.1007/s12010-011-9526-2.
- Kerrigan JE, Ragunath C, Kandra L, et al. Modeling and biochemical analysis of the activity of antibiofilm agent Dispersin B. *Acta Biol Hung*. 2008;59(4):439-451. doi:10.1556/ABiol.59.2008.4.5.
- Kurasin M, Våljamäe P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. *J Biol Chem*. 2011;286(1):169-177. doi:10.1074/jbc.M110.161059.
- Lamppa JW, Ackerman ME, Lai JI, Scanlon TC, Griswold KE. Genetically engineered alginate lyase-PEG conjugates exhibit enhanced catalytic function and reduced immunoreactivity. *PLoS One*. 2011;6(2):e17042. doi:10.1371/journal.pone.0017042.
- Lombard V, Bernard T, Rancurel C, Brumer H, Coutinho PM, Henrissat B. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochem J*. 2010;432(3):437-444. doi:10.1042/BJ20101185.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):e1000354. doi:10.1371/journal.ppat.1000354.
- Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, et al. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002626. doi:10.1371/journal.ppat.1002626.
- Ragunath C, DiFranco K, Shanmugam M, et al. Surface display of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autotransporter Aae and dispersin B hybrid act as antibiofilm agents. *Mol Oral Microbiol*. 2016;31(4):329-339. doi:10.1111/omi.12126.
- Ramasubbu N, Thomas LM, Ragunath C, Kaplan JB. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Mol Biol*. 2005;349(3):475-486. doi:10.1016/j.jmb.2005.03.082.
- Saxena P, Joshi Y, Rawat K, Bisht R. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J Microbiol*. 2019;59(1):3-12. doi:10.1007/s12088-018-0757-6.
- Sukharnikov LO, Cantwell BJ, Podar M, Zhulin IB. Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends Biotechnol*. 2011;29(10):473-479. doi:10.1016/j.tibtech.2011.04.008.
- Thallinger B, Prasetyo EN, Nyanhongo GS, Guebitz GM. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol J*. 2013;8(1):97-109. doi:10.1002/biot.201200313.
- van Dijk JM, Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact*. 2013;12:3. doi:10.1186/1475-2859-12-3.
- Waryah CB, Wells K, Ulluwishewa D, et al. In Vitro Antimicrobial Efficacy of Tobramycin Against *Staphylococcus aureus* Biofilms in Combination With or Without DNase I and/or Dispersin B: A Preliminary Investigation. *Microb Drug Resist*. 2017;23(3):384-390. doi:10.1089/mdr.2016.0100.
- Watters CM, Burton T, Kirui DK, Millenbaugh NJ. Enzymatic degradation of in vitro *Staphylococcus aureus* biofilms supplemented with human plasma. *Infect Drug Resist*. 2016;9:71-78. doi:10.2147/IDR.S103101.
- Xu F, Wang P, Zhang YZ, Chen XL. Diversity of Three-Dimensional Structures and Catalytic Mechanisms of Algi-

ate Lyases. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(3):e02040-17. doi:10.1128/AEM.02040-17.

33. Yan S, Wu G. Bottleneck in secretion of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):124. doi:10.1186/s12934-017-0738-1.

34. Zhu B, Yin H. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis

and applications. *Bioengineered.* 2015;6(3):125-131. doi:10.1080/21655979.2015.1030543.

Получено/Received 22.01.2020

Рецензовано/Revised 24.02.2020

Принято в печать/Accepted 03.03.2020 ■

#### Information about author

A.E. Abatur, MD, PhD, Professor, Head of the Department of pediatrics 1 and medical genetics, State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine; e-mail: alexabatur@i.ua; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6291-5386>

Абатур О.Є.

ДУ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро, Україна

### Полісахаридруйнуючі ферменти як агенти, що диспергують бактеріальні біоплівки

**Резюме.** Розвиток бактеріальних біоплівок залежить від секретії і збереження позаклітинних полісахаридів або екзополісахаридів, що являють собою основні компоненти позаклітинної полісахаридної речовини біоплівок. Екзополісахариди позаклітинної полісахаридної речовини забезпечують структурну стабільність біоплівки, адгезію і агрегацію мікроорганізмів, фізичний та хімічний захист бактерій від дії протимікробних препаратів і ефекторів імунної системи макроорганізму. Бактеріальні клітини, розташовані в біоплівці, захищені від антибактеріальних ендо- та екзофакторів позаклітинним полімерним матриксом. Для ініціювання диспергування біоплівок мікроорганізми поряд з іншими ферментами використовують специфічні глікозидгідролази, що руйнують полісахариди бактеріальних біоплівок. Глікозидгідролази реалізують свою дію через гідроліз глікозидних зв'язків: амілази розщеплюють  $\alpha$ -1,4-; целулази —  $\beta$ -1,4-;  $\beta$ -галактозидази —  $\beta$ -1,3-глікозидний зв'язок. Основними глікозидгідролазами, що чи-

нять антибіоплівкову дію, є:  $\alpha$ -лізоцим, амілази, дисперсин В, целулази, гіалуронідаза,  $\alpha$ - і  $\beta$ -манозідази, альгінат-ліази. Ці ферменти викликають руйнування полісахаридних полімерів, сприяючи вивільненню бактерій. Бактерії, які втратили захист полісахаридного каркасу, піддаються впливу антибактеріальних агентів. З огляду на те, що деградація екзополісахаридів біоплівок глікозидгідролазами призводить до вираженого диспергування бактерій, даний антибіоплівковий метод лікування може являти собою універсальний підхід до терапії інфекцій, що перебігають із формуванням біоплівок. Медикаментозні методи диспергування біоплівок за допомогою полісахариддеградуючих ферментів, без сумніву, розширяють арсенал антибіоплівкової терапії хронічних та рецидивуючих бактеріальних інфекцій, особливо викликаних антибіотикорезистентними бактеріями.

**Ключові слова:** бактеріальні біоплівки; диспергування; полісахаридруйнуючі ферменти

A.E. Abatur

State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine

### Polysaccharide-degrading enzymes as agents dispersing bacterial biofilms

**Abstract.** The development of bacterial biofilms depends on the secretion and preservation of extracellular polysaccharides, or exopolysaccharides, which are the main components of the extracellular polysaccharide substance of the biofilms. Exopolysaccharides of the extracellular polysaccharide substance provide the structural stability of the biofilm, the adhesion and aggregation of microorganisms, the physical and chemical protection of bacteria from the action of antimicrobials and immune system effectors of the macroorganism. Bacterial cells located in the biofilm are protected from antibacterial endo- and exofactors by an extracellular polymeric matrix. To initiate the dispersion of biofilms, microorganisms, along with other enzymes, use specific glycoside hydrolases, which destroy polysaccharides of bacterial biofilms. Glycoside hydrolases realize their action through the hydrolysis of glycosidic bonds: amylases cleave  $\alpha$ -1,4-; cellulases —  $\beta$ -1,4-;  $\beta$ -galactosidases —  $\beta$ -1,3-glycosidic bonds. The main glycoside

hydrolases that have antibiotic action are:  $\alpha$ -lysozyme, amylases, dispersin B, cellulases, hyaluronidase,  $\alpha$ - and  $\beta$ -mannosidases, alginate lyases. These enzymes cause the destruction of polysaccharide polymers, contributing to the release of bacteria. Bacteria that have lost the protection of the polysaccharide scaffold are exposed to antibacterial agents. Considering that the degradation of exopolysaccharides of biofilms by glycoside hydrolases leads to pronounced dispersion of bacteria, this antibiofilm treatment method can be a universal approach to the treatment of infections occurring with the formation of biofilms. Drug methods of dispersing biofilms using polysaccharide-degrading enzymes will no doubt expand the arsenal of antibiofilm therapy for chronic and recurrent bacterial infections, especially those caused by antibiotic-resistant bacteria.

**Keywords:** bacterial biofilms; dispersion; polysaccharide-degrading enzymes