



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## ГИДРОЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЦГТаз БАКТЕРИЙ РОДА *PAENIBACILLUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К $\alpha$ - И $\beta$ -ГЛИКАНАМ

Мильман П.Ю.\*, Гильванова Е.А., Рябова А.С.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального  
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

\*E-mail: [milman.polina@gmail.ru](mailto:milman.polina@gmail.ru)

Клеточная стенка микромицетов, выполняющая различные функции клетки, содержит до 80-90 % полисахаридов с разными типами связей. В ходе тестирования циклодекстринглюканотрансферазных микроорганизмов отобраны штаммы (*Paenibacillus ehimensis* IB-739, *Paenibacillus illinoisensis* IB-1087, *Paenibacillus* sp. IB-663, *Paenibacillus macerans* IB-I4), способные к гидролизу гомополисахаридов (крахмал, карбоксиметилцеллюлоза) и гетерополисахаридов (глюкоманнан, галактоманнан). Циклодекстрин глюканотрансфераза (ЦГТаза, ЕС 2.4.1.19) – многофункциональный фермент, способный катализировать разные типы реакций: циклизацию, связывание, диспропорционирование и гидролиз. Обнаружено, что штаммы и их препараты ЦГТаз, помимо циклизующей активности, обладают гидролизующей способностью в отношении  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликанов. В выборке штаммов методом кластерного анализа выявлены субстратные предпочтения при гидролизе в пользу  $\alpha$ -гликанов (*P. ehimensis* IB-739, *Paenibacillus* sp. IB-663) или  $\beta$ -гликанов (*P. illinoisensis* IB-1087, *P. macerans* IB-I4). Показано преимущество препаративной формы фермента ЦГТазы при воздействии на компоненты клеточной стенки грибов ( $\alpha$ - и  $\beta$ -гликаны) по сравнению с интактным эффектом клеточных гидролаз. Наиболее активной по степени деструкции гликанов оказалась культура *P. macerans* IB-I4, ЦГТазы которой в равной степени осуществляет гидролиз всех представленных полимеров. Обсуждается перспектива использования ферментных препаратов ЦГТаз в качестве агентов в борьбе с фитопатогенными грибами.

**Ключевые слова:** бактерии ♦ фермент ♦ циклодекстринглюканотрансфераза ♦ ЦГТаза ♦ полисахариды, гликаны ♦ фунгицидная активность

Поступила в редакцию: 29.11.2024

[Цитировать | Cite as](#)

DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-4-220-229](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-4-220-229)

EDN: [HZKRLU](https://www.edn.ru/HZKRLU)

## ВВЕДЕНИЕ

Клеточная стенка (КС) микромицетов представляет собой динамическую структуру, которая защищает клетку от изменений осмотического давления и других экологических

## HYDROLYZING ACTIVITY OF CGTASES FROM *PAENIBACILLUS* IN RELATION TO $\alpha$ - AND $\beta$ -GLICANS

Milman P.Yu.\*, Gilvanova E.A., Ryabova A.S.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of  
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

\*E-mail: [milman.polina@gmail.ru](mailto:milman.polina@gmail.ru)

The cell wall of micromycetes is crucial for the shape and function of cells, as well as for their protection from environmental influences and contains up to 80-90 % of polysaccharides with different types of bonds. Cyclodextrin glucanotransferase microorganisms were tested and the following strains were selected *Paenibacillus ehimensis* IB-739, *Paenibacillus illinoisensis* IB-1087, *Paenibacillus* sp. IB-663, *Paenibacillus macerans* IB-I4. These strains were able to hydrolyze homopolysaccharides (starch, carboxymethylcellulose) and heteropolysaccharides (glucomannan, galactomannan). Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) is a multifunctional enzyme capable of catalyzing various types of reactions: cyclization, binding, disproportionation and hydrolysis. It was found that strains and their preparations of CGTase, in addition to cyclizing activity, have a hydrolyzing ability against  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycans. The method of cluster analysis for strains revealed substrate preferences during hydrolysis in favor of  $\alpha$ -glycans (*P. ehimensis* IB-739, *Paenibacillus* sp. IB-663) or  $\beta$ -glycans (*P. illinoisensis* IB-1087, *P. macerans* IB-I4). The advantage of the preparative form of the CGTase enzyme when exposed to the components of the fungal cell wall ( $\alpha$ -glycans and  $\beta$ -glycans) in comparison with the intact effect of cellular hydrolases is shown. The culture of *P. macerans* IB-I4, whose CGTase equally hydrolyzes all the presented polymers, turned out to be the most active in terms of the degree of destruction of glycans. The prospect of using CGTase enzyme preparations as agents in the fight against phytopathogenic fungi is discussed.

**Keywords:** bacteria ♦ enzyme ♦ cyclodextrin glucanotransferase ♦ CGTase ♦ polysaccharides ♦ glycans ♦ fungicidal activity

Принято в печать: 05.12.2024



стрессов, позволяя при этом самой клетке взаимодействовать с окружающей средой. Основными компонентами КС являются хитин, хитозан,  $\beta$ -1,3-глюкан,  $\beta$ -1,6-глюкан, смесь  $\beta$ -1,3- и  $\beta$ -1,4-глюканов,  $\alpha$ -1,3-глюкан, меланин и гликопротеины [Gow et al., 2016]. Хитин по своей структуре является гомополимером остатков N-ацетил-D-глюкозамина, связанных  $\beta$ -1,4-гликозидными связями, и составляет 1-2% сухой массы у дрожжей и 10-20% – гиомицетов [Fesel, Zuccaro, 2016]. Относительная доля полисахарида в клеточной стенке может варьировать в зависимости от условий культивирования, процесса ферментации, происхождения штамма и т.д., но, как правило, 50% сухой массы клеточной стенки состоит из  $\beta$ -глюкана (10-15%  $\beta$ -1,6-глюкана) [Gow et al., 2016].

Гомополисахаридами являются полимеры, состоящие из моносахаридов (гликаны), в случае мономера D-глюкозы – глюканы. В грибах присутствуют две группы глюканов:  $\alpha$ -глюканы и  $\beta$ -глюканы. Большинство  $\alpha$ -глюканов, связанных с клеточной стенкой, состоят из глюкозильных единиц, соединенных  $\alpha$ -1,3-связями, и нерастворимы в воде. У некоторых грибов полисахариды состоят из чередующихся единиц глюкозы, связанных попеременно через связи  $\alpha$ -1,3 и  $\alpha$ -1,4, и глубоко встроены в клеточную стенку (например, у *Aspergillus niger*) [Fesel, Zuccaro, 2016]. Наиболее распространенным  $\beta$ -глюканом в клеточной стенке гриба является  $\beta$ -1,3-глюкан, который составляет от 65% до 90% от общего содержания  $\beta$ -глюкана [Bowman, Free, 2006]. Многоразветвленные  $\beta$ -глюканы могут быть прочно связаны с клеточной стенкой или связаны слабо, и накапливаться вокруг микромицета в виде слизи или желатинового материала, что может быть связано со степенью разветвленности глюкановых полимеров или с молекулярным размером полисахаридов [Fesel, Zuccaro, 2016]. Боковые ответвления с  $\beta$ -1,6-гликозидными связями, которые составляют приблизительно 3-10% от общего числа связей глюкана, соединяют цепи  $\beta$ -1,3-глюкана, создавая жесткую сеть [Bowman, Free, 2006]. Связь между компонентами  $\beta$ -глюкана и хитина часто осуществляется посредством  $\beta$ -1,4-связей. Процесс синтеза  $\beta$ -глюкана происходит в нитчатых грибах на кончике гифы и по бокам роста и ветвления клеток.

Некоторые виды микромицетов имеют гетерогенный состав гликанов, которые относятся к гетерополисахаридам. Анализ содержания сахаров в клеточных стенках *Fusarium oxysporum* показал наличие глюкозы, N-ацетил-глюкозамина, маннозы, галактозы и уроновых кислот [Schoffemeer et al., 1999]. У *Magnaporthe oryzae* доминируют остатки глюкозила, составляющие 75% моносахаридных компонентов стенки, а также манноза (14%), N-ацетилглюкозамин (7%), галактоза (2%), следы арабинозы и ксилозы [Samalova et al., 2017]. В стенке другого фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* обнаружено примерно 90% глюкозы и гораздо меньшее количество галактозы, маннозы и арабинозы [Cantu et al., 2009]. Данные по *M. oryzae* согласуются с составом стенки, описанным у *Saccharomyces cerevisiae* [Dallies et al., 1998] и *Candida albicans* [Ene et al., 2012], тогда как у *Aspergillus fumigatus* и *Schizosaccharomyces pombe* более распространены галактоманнаны [Xie, Lipke, 2010]. Важно отметить, что количество каждого из входящих в состав моносахаридов не является абсолютным, поскольку оно колеблется в процессе роста и морфогенеза, а также в ответ на внешний стресс или состав среды.

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаза, ЕС 2.4.1.19) является важным промышленным ферментом, который трансформирует крахмал в циклические невосстанавливающие олигосахариды, называемые циклодекстринами [Li et al., 2014]. ЦГТаза обнаружена у многих бактерий, включая представителей родов *Bacillus* spp. [Chen et al., 2018; Gimenez et al., 2019] и *Paenibacillus* spp. [Castillo et al., 2018]. ЦГТаза может катализировать разные типы реакций: циклизацию, связывание, диспропорционирование

и гидролиз [Pardhi et al., 2023]. Учитывая многофункциональное действие ЦГТаз, **целью настоящего исследования** был поиск среди циклодекстриногенных микроорганизмов потенциально пригодных для использования в качестве фунгицидных агентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований служили штаммы бактерий-продуцентов ЦГТаз: *Paenibacillus ehimensis* IB-739, *Paenibacillus illinoisensis* IB-1087, *Paenibacillus* sp. IB-663, *Paenibacillus macerans* IB-I4. Прочитанные последовательности гена 16S рНК всех штаммов доступны в Генбанке (NCBI) под номерами FN582329.1, FN422001.1, FN547418.1, AM406669.1 соответственно. Все штаммы входят в коллекцию культур УИБ УФИЦ РАН под номерами UIB-29, UIB-61, UIB-63, UIB-65, соответственно.

Культуры поддерживали на плотной питательной среде К1 (г/л): крахмал картофельный – 10; пептон – 4; дрожжевой экстракт – 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1; агар – 15; pH 7.2÷7.4.

Гидролизующую активность штаммов детектировали по наличию зон гидролиза (после окрашивания йодным реагентом или Congo Red) вокруг колоний или лунок с ферментным препаратом на минеральной агаризованной тест среде (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3;  $\text{NaCl}$  – 0.5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1; 1М  $\text{MgSO}_4$  – 0.2; 1М  $\text{CaCl}_2$  – 0.1; агар – 15. В качестве единственного источника углерода в минеральную среду добавляли различные полисахариды (такие как крахмал, глюкоманнан, галактоманнан, карбоксиметилцеллюлоза натрия (КМЦ)) в конечной концентрации 0.5%.

В качестве посевного материала в опыте по определению гидролитических ферментов, разрушающих разные типы углеводных полимеров, использовали 72 ч бактериальную суспензию клеток с  $\text{ОП}_{600}=0.1$ , которую наносили по 10 мкл на чашку Петри с минеральной агаризованной средой (состав среды представлен выше). Засеянные чашки инкубировали в термостате ТСО-1/80 СПУ («Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 37°C в течение 48 ч.

Амилазную активность (после 48 ч инкубирования) определяли, окрашивая чашки с крахмалом йодным реагентом (раствор кристаллического йода: йодида калия 0.2:2 (% масс.) соответственно) в течение 10 минут с последующим измерением диаметра прозрачных зон вокруг бактериальных колоний.

Гидролизующую активность (после 48 ч инкубирования) определяли, окрашивая чашки с субстратами (содержащими  $\beta$ -связь), 0.1% раствором Congo Red в течение 30 минут при комнатной температуре, с последующей отмывкой зон гидролиза сначала дистиллированной водой, затем двукратно раствором 1М  $\text{NaCl}$  с выдерживанием по 20 минут. Желто-оранжевый ореол вокруг бактериальных колоний на красном фоне окрашенного субстрата указывал на наличие гидролиза полимера синтезирующими ферментами.

Наработку бактериальных внеклеточных метаболитов, содержащих ЦГТазу, осуществляли в 250-мл качалочных колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл среды следующего состава (в г/л): крахмал – 10; пептон – 4; дрожжевой экстракт – 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{CaCO}_3$  – 0.1; pH 7.2÷7.4. Культивирование исследуемых штаммов проводили на шейкере-инкубаторе Innova 40R («New Brunswick Scientific», США) при 250 об/мин и 37°C в течение 68-72 ч.

Ферментный препарат ЦГТазы из культуральной жидкости исследуемых культур был получен путем центрифугирования КЖ на центрифуге ОПН-8 («Дастан», Киргизия) при 6000 об/мин в течение 30 мин. Отделённый от клеточной биомассы супернатант, содержащий ЦГТазу, концентрировали с помощью ультрафильтрации на модуле VivaFlow 200 («Sartorius», Германия) с диаметром пор 30 кДа. Полученный препарат ЦГТазы из выбранных культур использовали для определения гидролизующей активности в отношении различных полисахаридов.

Количественное определение ЦГТазной активности в культуральной жидкости и препаратах ЦГТаз измеряли на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО-Спектр», Россия) фенофталеиновым методом [Усанов и др., 2007].

Для оценки гидролизующей активности внеклеточных метаболитов ЦГТазных штаммов, препарат ЦГТазы 0.2÷0.3 ед в объеме (200 мкл) вносили в лунки в чашки Петри с минеральной агаризованной средой (состав приведен выше). Чашки с тест средой инкубировали в термостате ТСО-1/80 СПУ («Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 37°C. Через 48 ч инкубирования проводили окрашивание чашек йодным реагентом и 0.1% раствором Congo Red как описано выше.

Для оценки противогрибной активности в качестве тест-объектов использовали микромицеты из коллекции УИБ УФИЦ РАН *Bipolaris sorokiniana* UIB-F-9, *Fusarium oxysporum* UIB-F-15, и *Rhizoctonia solani* UIB-F-38. Грибы были выбраны в качестве тестовых объектов как вероятные патогенные виды-возбудители заболеваний растений. Микромицеты предварительно выращивали на среде КГА в течение 7 суток и готовили суспензию спор. Оценку проводили методом диффузии в агар также на среде КГА, для чего поверхность питательной среды засеивали суспензией спор с плотностью  $10^4$  КОЕ/мл и в лунку вносили по 100 мкл препарата ЦГТазы (0.2÷0.3 ед). Время инкубации 7 суток при 28°C. Повторность трехкратная. Активность оценивали, наблюдая за развитием тест-культур с использованием светового микроскопа Leica DM 1000 («Leica Microsystems», Германия) при увеличении  $\times 10$ . Контролем служило развитие гриба на питательной среде КГА без внесения препаратов и бактерий.

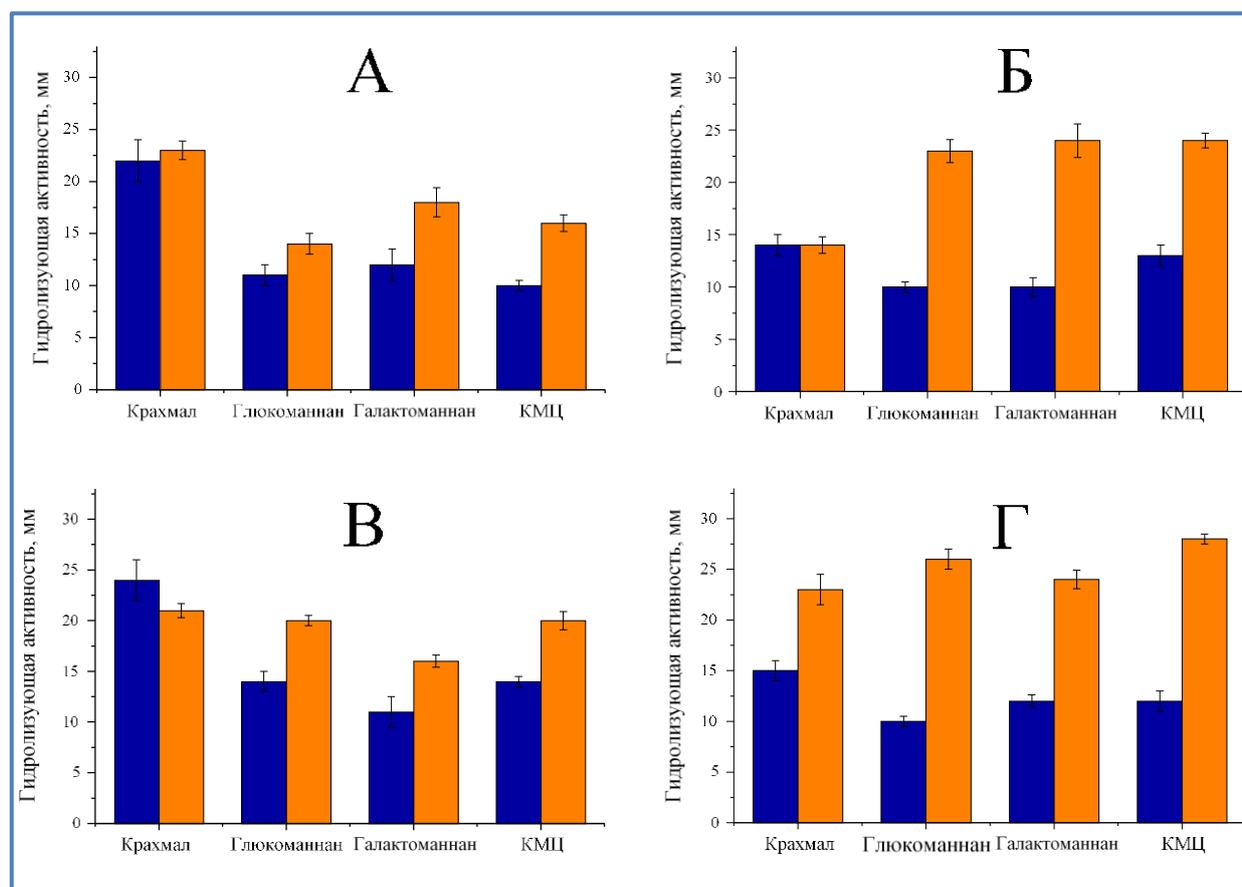
Статистическая обработка результатов проводили в программе Origin 9.1 («OriginLab Corp.», США). Иерархический кластерный анализ (НСА), выполненный с использованием попарного Евклидова расстояния между образцами и метода сопоставления ближнего соседа, для выявления кластеров ЦГТактивных микроорганизмов на основе матрицы сходства гидролизующей активности в отношении различных полисахаридов. Для визуализации результатов НСА построена дендрограмма. Результаты считали достоверными при критерии вероятности  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе использовали известный индикатор гидролиза структурированных  $\beta$ -гликанов с  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4  $\beta$ -1,6-связями Congo Red [Kath et al., 1999], который обеспечивает быстрый и чувствительный скрининг-тест для выявления целлюлозолитических бактерий. Для визуализации гидролиза  $\alpha$ -гликанов, в частности  $\alpha$ -глюкана (крахмала), в данном исследовании использовали методику окрашивания крахмала йодным реагентом [Zhou et al., 2012]. Из ЦГТактивных микроорганизмов коллекции УИБ УФИЦ РАН были отобраны 4 штамма: *P. ehimensis* IB-739, *P. illinoisensis* IB-1087, *Paenibacillus* sp. IB-663, *P. macerans* IB-I4.

Отбор штаммов проведен по наличию зоны гидролиза полисахарида вокруг бактериальных колоний, что свидетельствовало о продукции ферментов, разрушающих связи в исследуемом полисахариде. Эти культуры были способны использовать такие субстраты как крахмал (с  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-связями), глюкоманнан (с  $\beta$ -1,4 и  $\beta$ -1,6-связями), галактоманнан (с  $\beta$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6-связями), КМЦ (с  $\beta$ -1,4), в качестве источника углерода. Все субстраты разделены по типу связывания углеводных цепей на  $\alpha$ - и  $\beta$ -, а не составу мономерных углеводных единиц. Глюкоманнан, галактоманнан, КМЦ отнесены к группе  $\beta$ -гликанов, а крахмал к  $\alpha$ -гликанам. Галактоманнан имеет смешанный тип связывания, но с преобладающей  $\beta$ -1,4-связью. Поскольку молекулярные структуры используемых гликанов и хитина клеточной стенки грибов сходны, то выбранные штаммы могут оказывать деструктивное воздействие на стенки грибных гифов.

Все культуры, использованные в экспериментах, продемонстрировали хорошо детектируемый уровень внеклеточной ЦГТазной активности в культуральной жидкости, определенной фенолфталеиновым методом, у *P. ehimensis* IB-739 – 1,46 ед/мл, *P. illinoisensis* IB-1087 – 1,08 ед/мл, *Paenibacillus* sp. IB-663 – 1,18 ед/мл, *P. macerans* IB-I4 – 0,96 ед/мл. Для отобранных штаммов были наработаны препараты ЦГТаз. Методом лунок проведена оценка влияния препаратов ЦГТаз на гидролиз всех ранее протестированных субстратов. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 1. При оценке гидролизующей активности ЦГТаз не учитывался размер колоний и размер лунок, на диаграммах представлен только диаметр зоны гидролиза двух вариантов препаратов: в виде биомассы штамма, и бесклеточный препарат ЦГТазы этого же штамма.



**Рис. 1. Гидролизующая активность биомассы штаммов (обозначено синим цветом) и их бесклеточного препарата ЦГТаз (оранжевым цветом): А – *P. ehimensis* IB-739, Б – *P. illinoisensis* IB-1087, В – *Paenibacillus* sp. IB-663, Г – *P. macerans* IB-I4, в отношении различных полисахаридов.**

## ОБСУЖДЕНИЕ

ЦГТаза считается уникальным членом семейства гликозидгидролаз 13 (GH13). Большинство членов семейства GH13 состоят из трех доменов: А, В и С. Однако трехмерная структура ЦГТаза содержит два дополнительных домена, D и E. Каталитическая область ЦГТаза расположена в каталитической щели, образованной между доменами А и В. Фермент содержит два иона  $\text{Ca}^{2+}$ , расположенных внутри этой щели, и координируется с некоторыми аминокислотными остатками для стабилизации структурной конструкции щели, необходимой для каталитического механизма. Домен С участвует в связывании субстрата, тогда как функция домена D до конца не изучена [Pardhi et al., 2023]. Согласно исследованиям мутаций, домен D может являться ключевым для гидролизной активности ЦГТаз [Zhou et al., 2021]. Домены С и E имеют сайты связывания мальтозы. Исследования мутантной ЦГТаза показали наличие нескольких сайтов связывания мальтозы, которые либо напрямую взаимодействуют с крахмалом, либо направляют его к активному центру. Согласно информации, представленной в базе данных BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), домен E у ЦГТаз классифицируется как углеводсвязывающий модуль семейства 20 (CBM20) (<http://www.cazy.org>) [Cantarel et al., 2009; Machovic, Janecsek, 2006]. Сообщалось, что в ЦГТазе из YUPP-5 был обнаружен сайт связывания хитина (GDQVS) в 616-620 аминокислотных остатках домена E [Svitil, Kirchman, 1998], что указывает на возможность схожих функций ЦГТаза и хитиназы [Zhou et al., 2021]. Хитиназа и  $\beta$ -1,3-глюканаза могут разрушать хитин в клеточной стенке грибов, тем самым ингибируя их рост [Fujimori et al., 2016; Sousa et al., 2019]. Следовательно, домены D и E могут играть ключевую роль в деградации полисахаридов с  $\beta$ -1,4-связью.

Клеточная стенка имеет решающее значение для поддержания формы и функции клеток, поэтому основной стратегией борьбы с микозами является разрушение клеточной стенки гриба. В зависимости от вида грибов стенки содержат разное соотношение  $\beta$ -глюканов, хитина, белков и целлюлозы [Samalova et al., 2017]. Хитиназа действует преимущественно на хитин, тогда как ЦГТаза способна гидролизовать многие компоненты клеточной стенки, поэтому ее активность более разнообразна.

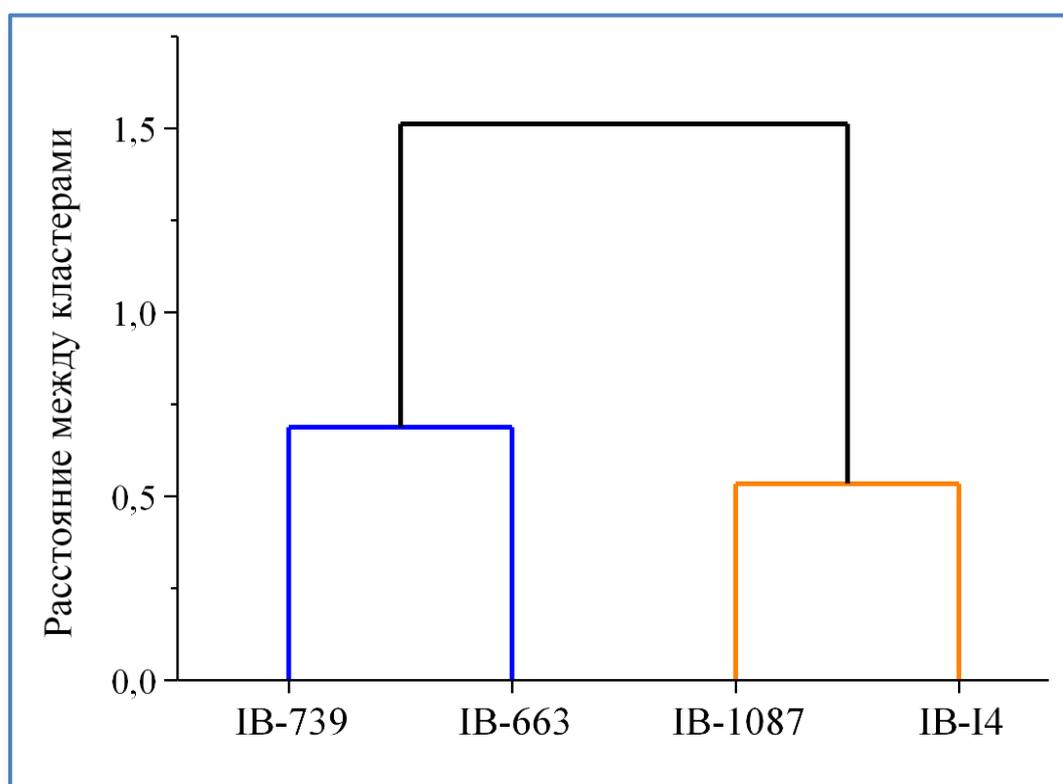
Ранее сообщалось о ЦГТазах, способных к гидролизу полисахаридов с различными типами связей. Штамм *Paenibacillus azotofixans* YUPP-5, выделенный из ризосферы *Amorphophallus konjac* методом накопительного культивирования, был способен гидролизовать глюкоманнан, галактоманнан, ксилан, КМЦ и хитин. Рекомбинантная ЦГТаза *Escherichia coli* BL21, полученная путем экспрессии гена из YUPP-5, была способна расщеплять указанные полисахариды [Zhou et al., 2012].

Эндофитная бактерия хлопка *Bacillus cereus* YUPP-10 гидролизовала глюкоманнан [Zhou et al., 2017]. Мутант ЦГТаза из YUPP-10, созданный путем сплайсинга генов с ПЦР с перекрытием, был способен к гидролизу глюкоманнана и КМЦ [Zhou et al., 2021].

В нашем исследовании предварительно была проверена и подтверждена способность ЦГТактивных штаммов расщеплять  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозидные связи в гомополисахаридах и гетерополисахаридах. Несмотря на очевидность гидролиза определенного полисахарида соответствующим ферментом, иногда встречаются примеры многофункциональности ферментов, способных воздействовать на несколько углеводных полимеров. Ранее сообщалось об уникальной многофункциональной гликозилгидролазе, обладающей манназной, ксиланазной и глюканазной активностями [Palackal et al., 2007].

Для четырех изученных штаммов активность клеточных гидролаз (вариант биомасса) в отношении полисахарида с  $\alpha$ -связью (крахмала) выше, чем для полисахаридов с  $\beta$ -связью в 1.1-2.2 раза (глюкоманнан, галактоманнан, КМЦ) (рис. 1), что может быть обусловлено большим сродством клеточных гидролаз к этому субстрату. При этом активность клеточных гидролаз всех штаммов в отношении крахмала соизмерима с активностью их внеклеточных ЦГТаз. Но в отношении субстратов, содержащих  $\beta$ -связь, действие бесклеточного препарата ЦГТаз у всех штаммов выше, чем действие их клеточных гидролаз, в среднем в 1.5-2.5 раза. Это может быть связано с внутриклеточной конкуренцией ферментов за субстрат, приводящей к снижению скорости ферментативной реакции в отношении конкретного субстрата. В случае воздействия бесклеточного препарата на полисахариды, при котором все молекулы фермента включены в фермент-субстратный комплекс, скорость реакции максимальна за счет полного насыщения активных центров фермента молекулами субстрата, и соответственно зоны деструкции больше.

Сравнение влияния ЦГТаз всех штаммов по отношению к субстратам, содержащим различные типы связи методом кластерного анализа, позволило разделить их на две группы. Результаты представлены в виде дендрограммы (рис. 2).



**Рис. 2.** Влияние внеклеточных ферментов, содержащих ЦГТазы, штаммов *Paenibacillus* по отношению к полисахаридам с различными типами связей:  $\alpha$ -гликаны (обозначены синим цветом),  $\beta$ -гликаны (оранжевым цветом). Кластерный анализ выполнен методом сопоставления nearest neighbor (distance type – Euclidean).

Для первой группы, включающей ЦГТазы штаммов *P. ehimensis* IB-739 и *Paenibacillus* sp. IB-663, характерно увеличение в среднем в 1.5 раза гидролизующей активности фермента к крахмалу, чем к субстратам с  $\beta$ -1,4-связью. Для второй группы (ЦГТазы из *P. illinoisensis* IB-1087, *P. macerans* IB-I4) наблюдается обратная зависимость: гидролизующая активность ферментов по отношению к  $\beta$ -гликанам выше в 1.3-1.5 раза, чем к крахмалу, что может быть связано с их видовой принадлежностью. Таким образом, ЦГТазы первого кластера имеют большее сродство к  $\alpha$ -гликанам, а второго –  $\beta$ -гликанам. Поэтому штаммы второй группы

более привлекательны для последующих экспериментов с тест-культурами патогенных грибов. Результаты данного исследования демонстрируют преимущество препаративной формы фермента ЦГТазы при воздействии на полимерные компоненты клеточной стенки грибов ( $\alpha$ -гликаны и  $\beta$ -гликаны) по сравнению с интактным эффектом клеточных гидролаз. Следует отметить, что культура из второго кластера, *P. macerans* IB-I4 интересна тем, что ее препаративная форма ЦГТазы практически в равной степени осуществляет гидролиз как гомополисахаридов, так и гетерополисахаридов.

Исследования противогрибной активности ЦГТаз штаммов *P. macerans* IB-I4 и *P. illinoisensis* IB-1087 проводили на *B. sorokiniana*, *F. oxysporum* и *R. solani* как вероятных патогенных видах-возбудителей заболеваний растений. На рост микроскопических грибов оказывали влияние как сами бактериальные клетки и выделяемые ими метаболиты, так и препараты ЦГТаз (табл. 1).

**Таблица 1. Влияние ЦГТазных культур рода *Paenibacillus* на рост микроскопических грибов (28°C, 7 сут). Диаметр зоны подавления развития грибов (мм) при  $p \leq 0.05$**

Штаммы и препараты		<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Контроль		образование хламидоспор	спорообразование	спорообразование
<i>P. macerans</i> IB-I4	культура	отсутствует	отсутствует	14.3±0.9
	препарат ЦГТазы	24.8±6.3	18.4±2.4	отсутствует
<i>P. illinoisensis</i> IB-1087	культура	отсутствует	отсутствует	отсутствует
	препарат ЦГТазы	отсутствует	10.7±1.5	отсутствует

Наибольшая противогрибная активность препарата ЦГТаз отмечена у *P. macerans* IB-I4, подавляющего рост *R. solani* и *B. sorokiniana*, а его бактериальные клетки препятствовали росту *F. oxysporum*. ЦГТазы *P. illinoisensis* IB-1087 проявляла слабую фунгистатическую активность, препятствуя образованию спор, незначительно влияя на развитие мицелия, изменяя форму клеток (*R. solani*), склеивая гифы (*F. oxysporum*) и замедляя развитие воздушного мицелия (*B. sorokiniana*).

Полученные данные, свидетельствующие о предпочтительном действии ЦГТаз разных штаммов на гликаны с  $\alpha$ - или  $\beta$ - гликозидными связями, позволяют предположить существование видоспецифичных ЦГТаз, которые обладают необходимой структурной и функциональной адаптацией, проявляя широкую или узкую специфичность к разным субстратам. Похожие результаты были получены в немногочисленных работах [Svitil, Kirchman, 1998; Zhou et al., 2021]. Сравнение и анализ гидролизующей активности ЦГТазных культур из имеющейся коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН позволит создать биопрепарат с наибольшей фунгицидной активностью по отношению к определенным видам фитопатогенных грибов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fesel P.H., Zuccaro A.  $\beta$ -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants // *Fungal Genet Biol.* 2016. V. 90. P. 53–60. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.12.004
2. Gow N.A.R., Latge J.P., Munro C.A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function // *Microbiol Spectr.* 2017. V. 5. I. 3. DOI: 10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016

3. Bowman S.M., Free S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall // *BioEssays*. 2006. V. 28(8). P. 799–808. DOI: [10.1002/bies.20441](https://doi.org/10.1002/bies.20441)
4. Schoffemeer E.A.M., Klis F.M., Sietsma J.H. et al. The Cell Wall of *Fusarium oxysporum* // *Fungal Genet Biol*. 1999. V. 27(2-3). P. 275–282. DOI: [10.1006/fgbi.1999.1153](https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1153)
5. Samalova M., Mérida H., Vilaplana F. et al. The  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferases (Gels) affect the structure of the rice blast fungal cell wall during appressorium – mediated plant infection // *Cell Microbiol*. 2017. V. 19:e12659. DOI: [10.1111/cmi.12659](https://doi.org/10.1111/cmi.12659)
6. Cantu D., Greve L.C., Labavitch J.M. et al. Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea* // *Mycol Res*. 2009. V. 113. P. 1396–1403. DOI: [10.1016/j.mycres.2009.09.006](https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.006)
7. Dallies N., Francois J., Paquet V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. 1998. V. 14. P. 1297–1306. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199810\)14:14<1297::AID-YEA310>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199810)14:14<1297::AID-YEA310>3.0.CO;2-L)
8. Ene I.V., Adya A.K., Wehmeier S. et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen // *Cell Microbiol*. 2012. V. 14. P. 1319–1335. DOI: [10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x)
9. Xie X., Lipke P.N. On the evolution of fungal and yeast cell walls // *Yeast*. 2010. V. 27. P. 479–488. DOI: [10.1002/yea.1787](https://doi.org/10.1002/yea.1787)
10. Li Z., Sheng C., Gu Z. et al. Alpha-cyclodextrin: enzymatic production and food applications // *Trends Food Sci Technol*. 2014. V. 35. P. 151–160. DOI: [10.1016/j.tifs.2013.11.005](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.11.005)
11. Chen S., Li Z., Gu Z. et al. Leu600 mutations decrease product inhibition of the  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* STB01 // *Int J Biol Macromol*. 2018. V. 115. P. 1194–1201. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2018.05.006](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.006)
12. Gimenez G.G., Costa H., de Lima Neto Q.A. et al. Sequencing, cloning, and heterologous expression of cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Bacillus firmus* strain 37 in *Bacillus subtilis* WB800 // *Bioproc Biosyst Eng*. 2019. V. 42. P. 621–629. DOI: [10.1007/s00449-018-02068-4](https://doi.org/10.1007/s00449-018-02068-4)
13. Castillo J., Caminata Landriel S., Sánchez Costa M. et al. A single mutation in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus barengoltzii* changes cyclodextrin and maltooligosaccharides production // *PEDS*. 2018. V. 31. P. 399–407. DOI: [10.1093/protein/gzy034](https://doi.org/10.1093/protein/gzy034)
14. Pardhi D.S., Rabadiya K.J., Panchal R.R. et al. Cyclodextrin glucanotransferase: fundamentals and biotechnological implications // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2023. V. 107. P. 5899–5907. DOI: [10.1007/s00253-023-12708-9](https://doi.org/10.1007/s00253-023-12708-9)
15. Усанов Н.Г., Гильванова Е.А., Елизарьев П.А. и др. Усовершенствованный метод фотометрического определения активности циклодекстринглюканотрансферазы // *Приклад. Биохим. Микробиол*. 2007. Т. 43. № 1. С. 118–124.
16. Kath F., Lange S., Kulicke W.-M. Influence of the glycosidic linkage on the solution conformation of glucans // *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 1999. V. 271. P. 28–36.
17. Zhou Y., Lee Y.-S., Park I.-H. et al. Cyclodextrin glycosyltransferase encoded by a gene of *Paenibacillus azotofixans* YUPP-5 exhibited a new function to hydrolyze polysaccharides with  $\beta$ -1,4 linkage // *Enzyme Microb Technol*. 2012. V. 50(2). P. 151–157. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2011.12.001](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.12.001)

18. Zhou J., Feng Z., Shichao L. et al. CGTase, a novel antimicrobial protein from *Bacillus cereus* YUPP-10, suppresses *Verticillium dahliae* and mediates plant defence responses // Mol Plant Pathol. 2021. V. 22(1). P. 130–144. DOI: [10.1111/mpp.13014](https://doi.org/10.1111/mpp.13014)
19. Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. DOI: [10.1093/nar/gkn663](https://doi.org/10.1093/nar/gkn663)
20. Machovič M., Janeček Š. Starch-binding domains in the post-genome era // Cell Mol Life Sci. 2006. V. 63. P. 2710–2724. DOI: [10.1007/s00018-006-6246-9](https://doi.org/10.1007/s00018-006-6246-9)
21. Svitil A.L., Kirchman D.L. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4- $\beta$ -glycanases // Microbiology. 1998. V. 144. P. 1299–1308. DOI: [10.1099/00221287-144-5-1299](https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1299)
22. Fujimori N., Enoki S., Suzuki A. et al. Grape apoplasmic  $\beta$ -1,3-glucanase confers fungal disease resistance in *Arabidopsis* // Sci Hortic. 2016. V. 200. P. 105–110. DOI: [10.1016/j.scienta.2016.01.008](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.008)
23. Sousa A., Silva C., Sousa J. et al. A thermostable chitinase from the antagonistic *Chromobacterium violaceum* that inhibits the development of phytopathogenic fungi // Enzyme Microb Technol. 2019. V. 126. P. 50–61. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2019.03.009](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.03.009)
24. Zhou J.L., Feng Z.L., Feng H.J. et al. Biocontrol effect and mechanism of cotton endophytic bacterium *Bacillus cereus* YUPP-10 against *Verticillium wilt* in *Gossypium hirsutum* // Sci Agric Sin. 2017. V. 50. P. 2717–2727. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2017.14.008](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2017.14.008)
25. Palackal N., Lyon C.S., Zaidi S. et al. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut // Appl Microbiol Biotechnol. 2007. V. 74. P. 113–124. DOI: [10.1007/s00253-006-0645-6](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0645-6).

Цитировать как

Мильман П.Ю., Гильванова Е.А., Рябова А.С. Гидролизующая активность ЦГТаз бактерий рода *Paenibacillus* по отношению к  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликанам // Экобиотех, 2024, Т. 7 № 4. С. 220-229. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-4-220-229](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-4-220-229) EDN: HZKRLU

Cited as

Milman P.Yu., Gilvanova E.A., Ryabova A.S. Hydrolyzing activity of CGTases from *Paenibacillus* in relation to  $\alpha$ - and  $\beta$ -glicans. *Ekobioteh.* 2024, V.7 (4). P. 220-229. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-4-220-229](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-4-220-229) EDN: HZKRLU (In Rus.)