

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ ШТАММОМ *PAENIBACILLUS* SP. IB-663

Ушмаева У.А.^{1,2*}, Мильман П.Ю.³, Гильванова Е.А.³

¹ Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Альметьевский государственный технологический университет «Высшая школа нефти», Альметьевск, Россия

³ Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

*E-mail: Ulianka102@yandex.ru

PHYSICOCHEMICAL MUTAGENESIS TO INCREASE THE EFFICIENCY OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE PRODUCTION BY *PAENIBACILLUS* SP. IB-663

Ushmaeva U.A.^{1,2*}, Milman P.Yu.³, Gilvanova E.A.³

¹ ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

² Almeteyevsk State Technological University

"Petroleum High School", Almeteyevsk, Russia

³ Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

*E-mail: Ulianka102@yandex.ru

Аннотация

Физико-химический мутагенез – метод, широко используемый для изменения свойств микроорганизмов и ферментов путём индуцирования случайных генетических вариаций. Проведено множество исследований по использованию метода направленного мутагенеза для повышения эффективности продукции циклодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТазы, EC 2.4.1.19) в микробных клетках. В то же время работ по использованию мутагенов, как физических, так и химических, практически не проводилось. Для создания мутантных штаммов *Paenibacillus* sp. IB-663 с повышенной продукцией ЦГТазы использован мутагенез, вызванный этилметансульфонатом (EMS) и ультрафиолетовым (УФ) облучением. В ходе работы было проанализировано 81 мутантный клон, из которых три показали увеличенную скорость роста и повышенную продукцию целевого фермента по сравнению с родительским штаммом. Индукция EMS-мутагеном не способствовала увеличению синтеза ЦГТазы у жизнеспособных клеток культуры *Paenibacillus* sp. IB-663. В то же время, мутагенез, вызванный УФ-облучением, позволил получить одного из мутантов с уровнем продукции ЦГТазы в 1.4 раза выше, чем у родительского штамма. Разработан быстрый и простой метод скрининга ЦГТазы-активных мутантов с использованием планшетного спектрофотометра, основанный на способности циклодекстринов образовывать комплексы включения с фенолфталеином. Мониторинг динамики роста и экспрессии ЦГТазы у родительского штамма и мутантов выявил совпадение максимумов роста/продукции ЦГТазы, таким образом, косвенно подтвердил согласованность работы генов, ответственных за синтез фермента и его секрецию.

Ключевые слова:

Paenibacillus sp. IB-663, циклодекстрин глюканотрансфераза, ЦГТаза, мутагенез, этилметансульфонат, EMS, ультрафиолетовое облучение, УФ

Abstract

Physicochemical mutagenesis is a method widely used for modifying the characteristics of microorganisms and enzymes by introducing random genetic variations. Numerous studies have investigated the use of site-directed mutagenesis to increase the activity of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) production in microbial cells. However, there has been virtually no work has been done with mutagens, both physical and chemical. Ethyl methanesulfonate (EMS)- and ultraviolet (UV)-induced mutagenesis was used to create mutant strains of *Paenibacillus* sp. IB-663 with enhanced CGTase production. Eighty-one mutant clones were analyzed, of which three showed increased growth rate and target enzyme production compared with the parent strain. Induction of EMS mutagen did not increase the synthesis of CGTase in viable *Paenibacillus* sp. IB-663 cells. UV-induced mutagenesis also allowed for the formation of a mutant with a CGTase production level 1.4 times higher than that of the parent strain. A rapid and simple method has been developed for screening mutants with CGTase activity by plate spectrophotometer. This method is based on the ability of cyclodextrins to form inclusion complexes with phenolphthalein. Monitoring of growth and CGTase expression dynamics in parent and mutant strains revealed a coincidence of growth/CGTase production maxima, thus indirectly confirming the co-ordination of the genes responsible for synthesis and secretion of the enzyme.

Keywords:

Paenibacillus sp. IB-663, cyclodextrin glucanotransferase, CGTase, mutagenesis, ethyl methanesulfonate, EMS, ultraviolet irradiation, UV

Поступила в редакцию: 03.08.2026

Принято в печать: 02.09.2026

Received: 03.08.2026

Accepted: 02.09.2026

Цитировать | Cite as

DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/gydpbz>

ВВЕДЕНИЕ

Циклодекстрингликозилтрансфераза (ЕС 2.4.1.19, ЦГТаза) – фермент, катализирующий микробную трансформацию крахмала в циклодекстрины (ЦД), представляющие собой циклические формы остатков глюкопиранозы, связанных α -1,4-связями [Rabadiya *et al.* 2024]. ЦД находят широкое применение в сельском хозяйстве, косметической, текстильной, пищевой, фармацевтической и химической промышленности благодаря способности образовывать комплексы включения с молекулами [Musuc 2024; Urooj *et al.* 2024; Saffarionpour 2026]. Включение органических или неорганических молекул в ЦД изменяет их свойства, такие как растворимость, реакционная способность, чувствительность к теплу и свету и т.д. [Poulson *et al.* 2022]. Известно, что ЦГТазы продуцируются различными родами бактерий, такими как *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Clostridium* и др. [Lim *et al.* 2021]. Несмотря на потенциал этих ферментов, высокая стоимость их производства остается серьезным препятствием для их промышленного внедрения. Эти ограничения подчеркивают необходимость дальнейших исследований для повышения продуктивности и активности ЦГТаз.

Для улучшения физиологических свойств микроорганизмов, например, повышение секреции ферментов, используются методы генной инженерии: гомологичная и негомологичная рекомбинация, сайт-направленный мутагенез, адаптивная эволюция и ненаправленный мутагенез [Khattab *et al.* 2023; Rabadiya *et al.* 2024]. Физико-химический мутагенез обеспечивает высокую частоту мутаций за счет модификации азотистых оснований в результате определенных химических реакций и образования пиримидиновых димеров. Это приводит к изменениям в последовательности ДНК, что позволяет получать новые штаммы с уникальными точечными заменами и измененным метаболизмом. Кроме того, полученные эффективные мутантные штаммы можно подвергать дальнейшей модификации методами генной инженерии. Исследований, направленных на усиление синтеза ЦГТаза, с использованием физических и химических мутагенов практически не проводилось. Однако существует множество исследований по использованию метода направленного мутагенеза как для повышения эффективности синтеза ЦГТаза в микробных клетках, так и для улучшения ряда свойств самого фермента [Rabadiya *et al.* 2024]. Техническая сложность, необходимость использования специализированных реагентов и оборудования делает метод сайт-направленного мутагенеза более затратным для промышленного применения по сравнению с более простыми и массовыми методами физического мутагенеза. В данном исследовании рассматривается влияние мутагенных факторов (химического (этилметансульфонат, EMS) и физического (ультрафиолетовое излучение, УФ)) на продукцию ЦГТаза штаммом *Paenibacillus* sp. IB-663.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовался штамм *Paenibacillus* sp. IB-663. Прочитанная последовательность гена 16S рРНК штамма доступна в базе данных генетических последовательностей (GenBank) под номером FN547418.1. Штамм входит в коллекцию культур УИБ УФИЦ РАН под номером UIB-63.

В качестве отрицательного контроля при селекции ЦГТаза-активных культур использовался штамм *Bacillus subtilis* IB-54, обладающий высокой амилазной активностью, но не синтезирующий ЦГТазу. Прочитанная последовательность гена 16S рРНК штамма доступна в базе данных генетических последовательностей (GenBank) под номером AM765842.1. Штамм входит в коллекцию культур УИБ УФИЦ РАН под номером UIB-74.

Культуры поддерживали на плотной питательной среде К1 (г/л): крахмал картофельный – 10; пептон – 4; дрожжевой экстракт – 5; KH_2PO_4 – 1; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 13; агар – 15 при pH 7.2÷7.4. Для наработки фермента проводили культивирование в жидкой среде К1 следующего состава (в г/л): крахмал – 10; пептон – 4; дрожжевой экстракт – 5; KH_2PO_4 – 1; Na_2HPO_4 – 1; CaCO_3 – 0.1; pH 7.2÷7.4.

Перед проведением мутагенеза УФ и EMS готовили накопительную культуру следующим образом, стеклянную пробирку с 4 мл среды К1 засеивали отдельными колониями с агаризованной питательной среды. Нарработку биомассы проводили в течение 12 ч при температуре 37°C и аэрации 160 об/мин, после чего культуру пересеивали в новую стеклянную пробирку со средой К1 в количестве 1% от исходного объема среды. Культивирование проводили до $\text{ОП}_{600} = 0.5 \div 0.6$.

Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре T7DS («PERSEE», Китай) при длине волны 600 нм. По достижении необходимого значения оптической плотности культуральной жидкости (КЖ) биомассу осаждали низкоскоростным центрифугированием, используя центрифугу CHT210R («CENCE», Китай) при 6000 об/мин и 4°C. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в стерильном 0.9%-м растворе хлористого натрия.

Для проведения химического мутагенеза с использованием EMS клеточную суспензию переносили в 24-луночный планшет (1 мл на лунку), добавляли по 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05% EMS и ставили на перемешивание на 60 мин (120 об/мин, 30°C) [Karakus *et al.* 2018]. Каждые 20 мин отбирали пробы, осаждали клетки центрифугированием, дважды промывали 0.9%-м раствором хлористого натрия и ресуспендировали в 200 мкл 0.9%-го раствора хлористого натрия. Далее культуру клеток в разведении от 0 до 10^{-4} в количестве 100 мкл высевали на чашки Петри с твердой агаризованной средой K1. Чашки инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч.

Для проведения физического мутагенеза, вызванного УФ-излучением, клеточную суспензию (без разведений) высевали на чашки Петри с твердой агаризованной средой K1. Мутагенез проводили УФ-лампой в УФ-кросслинкере UCL-3200 («LUYOR», Китай) на расстоянии 15 см с варьированием мощности излучения (в диапазоне 0.03÷0.08 Дж) в течение 10 сек. После облучения чашки оборачивали в фольгу и инкубировали в темноте в течение 24 ч для предотвращения фотореактивации.

Оптимальные дозы EMS и УФ-излучения определяли по уровню выживаемости культур, расчет выживаемости производится по формуле ниже:

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{количество колоний после мутагенеза}}{\text{количество колоний в контроле}} * 100, \%$$

Повторные эксперименты проводили с уже подобранными дозами мутагенов.

Полученные мутантные колонии пересекали на новые чашки с агаризованной средой K1 для закрепления генетических мутаций. Инкубировали в термостате в течение 12 ч при 37°C.

Селекцию полученных мутантных клонов проводили в планшетном режиме. Полученные мутантные клоны (одну колонию) засевали в 24-луночный планшет с 600 мкл среды K1, культивировали в течение 12 ч в шейкере-инкубаторе ES-20 («Biosan», Латвия) при 180 об/мин и 37°C. После этого измеряли оптическую плотность КЖ и пересекали культуру в новый планшет с 1 мл среды K1, уравнивая результаты ОП₆₀₀ для засева одинакового количества стартовой культуры. Культивирование проводили в течение 48 ч, отбирая по 100 мкл каждые 24 ч. Циклизующую активность фермента выделенных клонов измеряли косвенно через способность продукта реакции, а именно молекул β-циклодекстрина образовывать комплекс включения с фенолфталеином, при этом происходит обесцвечивание реакционной смеси. Схема определения эффективности выработки синтеза фермента ЦГТазы мутантными клонами следующая: отобранные пробы КЖ центрифугировали для удаления клеток, супернатант смешивали с 200 мкл насыщенного фенолфталеинового реактива (98.6 мМ K₂CO₃ смешивали с 0.13 мМ фенолфталеина в 96%-ном этаноле). Изменение окраски детектировали на мультимодальном ридере Feyond A300 («ALLSHENG», Китай) при длине волны 553 нм. Для дальнейшей работы оставляли штаммы, уровень продукции ЦГТазы которых превышал уровень секреции фермента родительского штамма.

Отобранные эффективные штаммы культивировали в 200-мл колбах, содержащих 50 мл среды K1 на шейкере-инкубаторе ES-60C («Miulab», Китай) при 160 об/мин и 37°C. Пробы для измерения ОП₆₀₀ и ЦГТазной активности отбирали каждые 24 ч в течение 96 ч. Клетки отделяли в центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия) при 6000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант использовали в качестве ферментативного препарата для дальнейшего исследования.

Количественное определение ЦГТазной активности в КЖ измеряли фенолфталеиновым методом [Усанов и др. 2007], с соответствующим уменьшением объемов и сохранением пропорций, в 96-луночных планшетах на микропланшетном ридере Feyond A300 («ALLSHENG», Китай). В качестве субстрата использовали 3%-й растворимый картофельный крахмал в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (pH 5.7). 90 мкл разбавленного ферментного препарата вносили в лунку с 180 мкл субстрата. Планшет инкубировали при 40°C в течение 1 ч в микропланшетном ридере Feyond A300 («ALLSHENG», Китай). После чего 50 мкл реакционной смеси переносили в другой

планшет, содержащего в лунках по 300 мкл фенолфталеинового реактива, и измеряли ОП₅₅₃. В качестве контроля использовали реакционную смесь, не подвергшуюся реакции. За одну единицу активности принималось количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль β -циклодекстрина за 1 минуту при описанных условиях [Усанов и др. 2007].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Origin 9.1 («OriginLab Corp.», США). Измерения проводили в пяти технических повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения, достоверность различий оценивалась по t-критерию Стьюдента при $p=0.05$. Описание объектов, условий экспериментов, материалов и методов, используемых в работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках данного исследования для увеличения синтеза ЦГТазы *Paenibacillus* sp. IB-663 выбраны методы физико-химического мутагенеза с использованием EMS и УФ-облучения.

Клеточную суспензию *Paenibacillus* sp. IB-663 подвергали воздействию 0.03, 0.04 и 0.05% EMS-мутагена в течение различного времени (20, 40 и 60 минут), затем проводили высев на агаризованную среду K1. Было обнаружено, что по мере увеличения периода воздействия EMS (0.03, 0.04 и 0.05%) выживаемость популяции клеток резко снижалась: с 27.48% (19.54%) через 20 минут до 21.53% (7.36%) и 10.76% (3.96%) через 40 и 60 минут, соответственно. Концентрация 0.05% EMS являлась для данного микроорганизма летальной, при которой отсутствовал рост (табл. 1). Снижение уровня выживаемости может быть связано с повреждением нуклеиновой кислоты, вызванным EMS-мутагеном, и/или дефектами других клеточных компонентов [Holman *et al.* 2026b].

Таблица 1. Выживаемость штамма *Paenibacillus* sp. IB-663 после воздействия мутагена этилметансульфоната (EMS), %

Table 1. Survival of *Paenibacillus* sp. strain IB-663 after exposure to the mutagen ethyl methanesulfonate (EMS), %

Концентрация EMS, %	Время воздействия		
	20 мин	40 мин	60 мин
0 (контроль)	100	100	100
0.03	27.48	21.53	10.76
0.04	19.54	7.36	3.96
0.05	0	0	0

В ходе селекции отобрано 36 мутантных клонов. Однако индуцированные EMS-мутагенезом жизнеспособные клетки не демонстрировали усиленного синтеза ЦГТазы. Поэтому был проведен мутагенез с использованием УФ-облучения. По итогам физического мутагенеза, смертность культуры *Paenibacillus* sp. IB-663 составила более 99% и наблюдались видимые фенотипические изменения полученных колоний (размер, форма) (табл. 2).

Таблица 2. Выживаемость штамма *Paenibacillus* sp. IB-663 после воздействия УФ-облучением

Table 2. Survival of *Paenibacillus* sp. IB-663 strain after exposure to UV irradiation

Энергия воздействия, Дж	КОЕ/100 мкл	Выживаемость, %	Мутантные клоны
0 (контроль)	3533000	100	
0.03	370	0.01	
0.05	298	0.008	
0.06	28	0.0007	
0.07	17	0.0004	12, 21
0.08	11	0.0003	6

Оценка жизнеспособности бактериальной суспензии, подвергшейся воздействию УФ-ламп, показала, что при более интенсивном воздействии (0.06; 0.07; 0.08 Дж) выживаемость бактерий снижается сильнее, чем при менее интенсивном воздействии (0.03; 0.05 Дж). Учитывая высокую летальность для всех вариантов воздействия, приемлемое количество колоний для дальнейшего

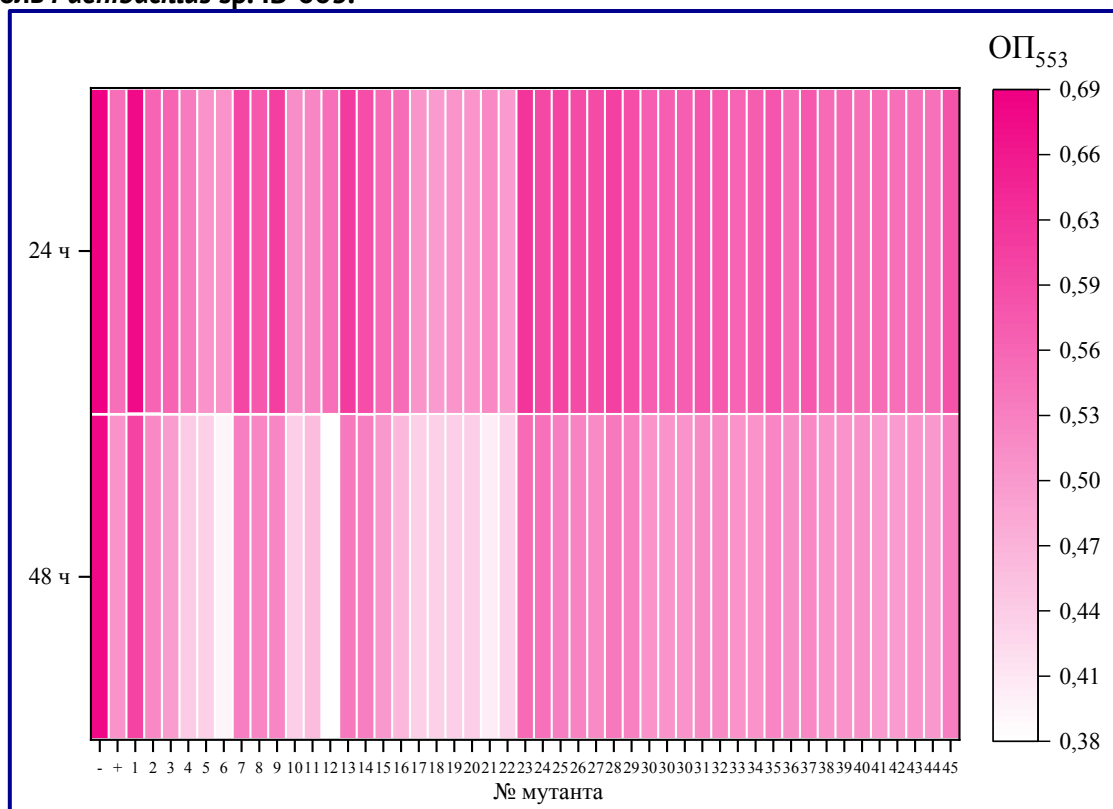
анализа (30–300 клонов) на нулевом разведении, было получено без дополнительных десятичных разведений культуры (табл. 2). После воздействия 0.03-0.08 Дж на расстоянии 15 см от источника УФ-излучения смертность составила более 99%.

В ходе работы было проанализировано 45 мутантных клонов, из которых три (№ 6, 12 и 21) показали увеличение ЦГТазной активности через 48 ч в 1.17-1.34 раз по сравнению с родительским штаммом IB-663 (рис. 1). Активные клоны получены при энергии воздействия УФ-излучения 0.07 и 0.08 Дж. Вероятно, более высокие дозы облучения приводят к значительным перестройкам метаболизма микроорганизма за счет повышенного количества мутаций, а сочетание множества мутаций приводит к позитивному эффекту на выработку целевого фермента (табл. 2).

Для простого и быстрого отбора ЦГТ-активных мутантных штаммов был разработан жидкофазный скрининг среди полученных мутантов в 96-луночных планшетах (рис. 1), как описано в разделе «Материалы и методы». Интенсивность обесцвечивания фенолфталеинового реагента, вызванная взаимодействием β -циклодекстринов, образовавшихся в КЖ под действием выработанной ЦГТазы, с молекулами фенолфталеина, сравнивалась с интенсивностью окрашивания культуральной жидкости, полученной после культивирования штамма дикого типа в тех же условиях. КЖ клонов, содержащие ЦГТазу с более низкой циклизующей активностью, слабо обесцвечивались или имели темно-розовый цвет фенолфталеинового реагента (соответствует начальному ОП₅₅₃). Напротив, культуральные жидкости клонов, содержащих ЦГТазу с повышенным уровнем циклизующей активности, обесцвечивали фенолфталеиновый реагент до светло-розового цвета (рис. 1). Родительский штамм *Paenibacillus* sp. IB-663 использовали в качестве положительного контроля, а *B. subtilis* IB-54 в качестве отрицательного.

Рисунок 1. Тепловая карта этапа селекции ЦГТ-активных штаммов после УФ-облучения: темно-розовым обозначены штаммы, не синтезирующие ЦГТазу, светло-розовым – активные продуценты ЦГТаз, «-» – отрицательный контроль *B. subtilis* IB-54, «+» – положительный контроль *Paenibacillus* sp. IB-663.

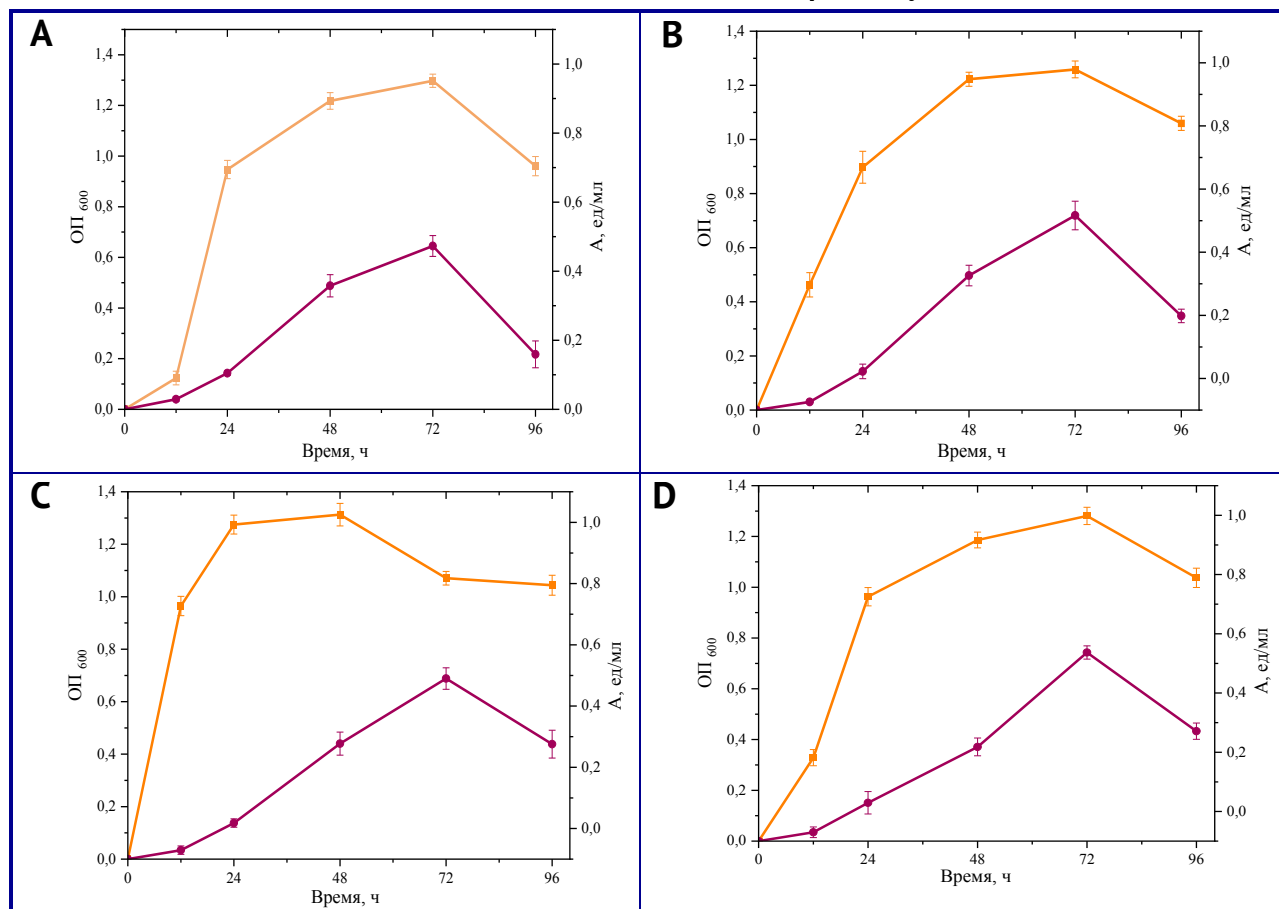
Figure 1. Heat map of the stage of selection of CGTase active strains after UV irradiation: strains that do not synthesize CGTase are shown in dark pink, active CGTase producers are shown in light pink, “-” is the negative control *B. subtilis* IB-54, “+” is the positive control *Paenibacillus* sp. IB-663.



Для родительского штамма и эффективных мутантных клонов проведено сравнительное исследование динамики роста и накопления ЦГТазы (рис. 2).

Рисунок 2. Динамика накопления биомассы (ОП₆₀₀) и синтеза ЦГТазы (ед/мл) на среде K1 во времени (0-96 ч) для А – родительского штамма *Paenibacillus* sp. IB-663 и мутантных клонов №6, 12, 21 соответственно В, С, D.

Figure 2. Dynamics of biomass accumulation (OD₆₀₀) and CGTase synthesis (U/ml) on K1 medium over time (0-96 h) for A – parent strain *Paenibacillus* sp. IB-663 and mutant clones No. 6, 12, 21, respectively B, C, D.



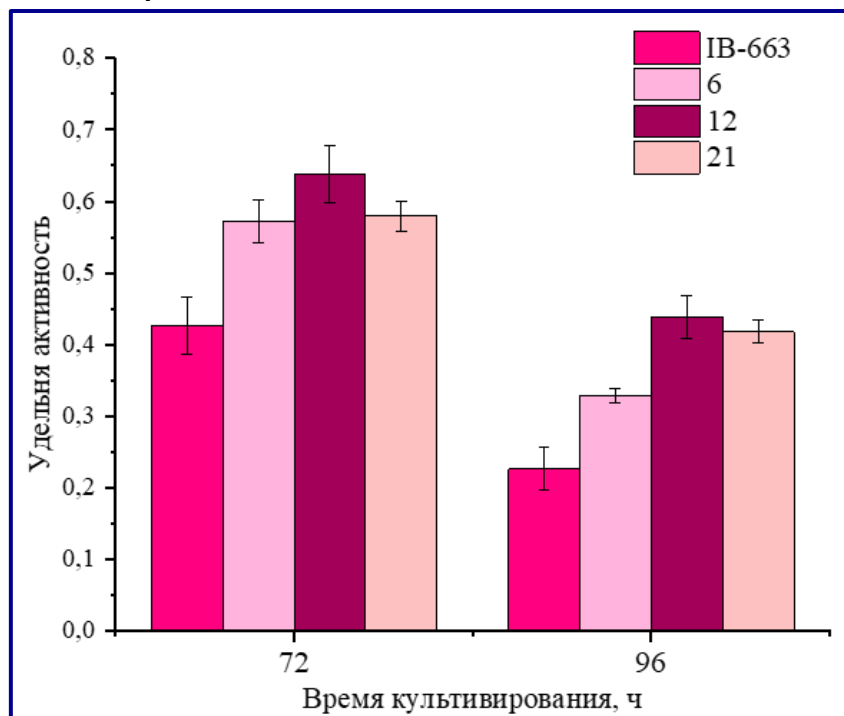
Исследование динамики роста родительского штамма и мутантных клонов показало, что стадии роста культур совпадают по времени (рис. 2). Вероятно, УФ-мутации не затронули ключевые гены и регуляторные механизмы, влияющие на скорость роста и деление клеток. При этом уровень накопления биомассы мутантных штаммов в среднем повысился в 1.05-1.12 раз.

Секреция ЦГТазы как родительского штамма, так и мутантных клонов начиналась в стадии логарифмического роста, и уровень активности достигал максимума на 72 ч культивирования, что соответствовало окончанию стационарной фазы роста. В фазе отмирания и перехода в споры (с 72 до 96 ч) для родительского штамма и мутантного клона № 6 наблюдается резкое падение активности (на 55.1 и 43.8% соответственно), для мутантных клонов № 12 и 21 – постепенное (на 25.9 и 29.3% соответственно) (рис. 2, 3). Вероятно, УФ-облучение интенсивностью 0.07 Дж смогло замедлить фазу отмирания и продлить время синтеза фермента, т.е. повысить его выход. Для мутантного штамма № 6, полученного при интенсивности УФ-облучения 0.08 Дж такого не наблюдалось.

На рисунке 3 представлена удельная активность ЦГТазы, выраженная в виде соотношения активности фермента к накоплению биомассы на разных этапах культивирования, позволяющая оценить, насколько эффективно синтезируется фермент «на единицу» биомассы. Видно, что фермент нарабатывается эффективнее через 72 ч, а через 96 ч уровень активности падает за счет истощения субстрата.

Рисунок 3. Удельная активность ЦГТазы родительского штамма (IB-663) и мутантных клонов (№№ 6, 12, 21), выраженная соотношением активности фермента к накоплению биомассы во времени 72 и 96 ч.

Figure 3. Specific activity of CGTase of the parent strain (IB-663) and mutant clones (No. 6, 12, 21), expressed as the ratio of enzyme activity to biomass accumulation over 72 and 96 hours.



ОБСУЖДЕНИЕ

Случайный мутагенез с использованием химических веществ и УФ-излучения – простой способ генетической и функциональной модификации организма для стимулирования выработки некоторых ферментов у бактерий. Мутации, вызванные мутагенными агентами, приводят к вариациям в нуклеотидной последовательности ДНК. Естественные мутации считаются редкими по сравнению с индуцированными мутациями, но при использовании химических и физических мутагенных агентов значительные изменения в последовательности ДНК (замена пар оснований, добавление и удаление нуклеотидов) происходят случайным образом. Для внесения случайных мутаций в геном бактериальных штаммов используются традиционные мутагенные агенты, такие как ультрафиолетовое излучение и химические мутагенные агенты (EMS и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, {NTG}), которые обычно вызывают различные мутации в бактериальной ДНК [Kim *et al.* 2025; Holman *et al.* 2026b].

Мутагенез EMS широко используется для стимуляции наработки ферментов, например, β -1,3-глюканаз, целлюлаз, ксиланаз, амилаз, протеаз [Narasimhan *et al.* 2013; Tai *et al.* 2016; Demirkan, Özdemir 2020; Sharma *et al.* 2021]. Единственное упоминание использования EMS для повышения активности ЦГТазы для бактерий *B. hunanensis* WT3, в результате которого была получена серия мутантных клонов при 20, 40 и 60 минутном воздействии EMS (200 мМ) с увеличенной продукцией фермента от 3 до 11% по сравнению с родительским штаммом [Khattab *et al.* 2023]. Индуцированные EMS-мутагенезом жизнеспособные клоны *Paenibacillus* sp. IB-663 не показали увеличения синтеза ЦГТазы, что вероятно связано с физиологическими особенностями микроорганизмов или концентрацией мутагена. При мутагенезе с использованием EMS алкилируются основания ДНК (чаще гуанин), что приводит к точечным мутациям. Такие мутации могут не затронуть участки, критически важные для активности фермента, либо изменить его так, что он станет менее стабильным. Исследования показывают, что у мицелиальных грибов EMS обычно усиливает секрецию гидролитических ферментов, особенно из классов целлюлаз и ксиланаз при относительно умеренных концентрациях EMS и непродолжительном воздействии [Holman *et al.* 2026a]. Учитывая, что ЦГТаза способна катализировать четыре типа реакций

(циклизации, связывания, диспропорционирования, гидролиз), обработка EMS могла привести к увеличению гидролитической активности и снижению циклизующей, что требует дополнительных исследований.

Экспериментов по ненаправленному мутагенезу штаммов-продуцентов ЦГТаз с использованием физических мутагенов не проводилось. Поэтому данную работу можно считать первой в своем роде, нацеленную на повышение эффективности наработки ЦГТазы с помощью УФ-мутагенеза для получения различных мутаций при синтезе ЦГТазы у *Paenibacillus* sp. IB-663.

В данном исследовании случайный мутагенез был вызван с помощью УФ-излучения в качестве физического фактора. УФ-излучение вызывает повреждения ДНК, в частности образование пиримидиновых димеров (чаще всего тимина). Это приводит к ошибкам при репликации и репарации ДНК, что может вызывать мутации – замены оснований, делеции, дубликации и другие изменения в геноме. Некоторые из этих мутаций могут улучшать физиологические характеристики микроорганизма, в том числе повышать эффективность выработки ферментов [Kim *et al.* 2025]. Например, достигнуто увеличение протеазной активности родительского штамма *B. subtilis* E6-5 на 88% [Demirkan *et al.* 2018] или α -амилазной активности *B. licheniformis* MK90 на 50.8% [Khedr *et al.* 2017].

Использование УФ-излучения в данном исследовании позволило выделить мутантные штаммы с повышенной эффективностью продукции ЦГТазы. При интенсивности воздействия 0.07 и 0.08 Дж был отобран ряд мутантных клонов, синтезирующих большее количество фермента по сравнению с КЖ штамма дикого типа (табл. 2). Следует отметить, что при увеличении интенсивности воздействия выживаемость бактерий закономерно снижалась.

По сравнению с родительским штаммом, мутантные клоны демонстрировали более высокий титр продукции целевого фермента и биомассы. Максимальные значения активности ЦГТазы, а также биомассы увеличились на 14.8-19.7% и 6.5-12.1% соответственно через 72 ч культивирования. При этом пиковые значения активности ферментов и плотности клеток культуры были достигнуты в одни фазы культивирования с исходным родительским штаммом (рис. 2). Совпадение стадий роста и секреции фермента у родительского штамма и его мутантных клонов совпадали во времени культивирования. Таким образом, можно предположить, что УФ-мутации затронули отдельные элементы регуляторных сетей (например, промоторы, операторы, факторы транскрипции), но при этом не нарушили общую логику работы генов, отвечающих за синтез фермента и его секрецию. В результате динамика роста и секреторной активности у родительского штамма и мутантов остаётся согласованной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физико-химический мутагенез представляет значительный интерес для биотехнологии, особенно в области разработки улучшенных штаммов, продуцирующих ферменты, благодаря своей простоте, доступности и экономичности. Проведенный мутагенез *Paenibacillus* sp. IB-663, вызванный УФ-облучением с интенсивностью 0.07 и 0.08 Дж позволил получить три мутантных клона с повышенной эффективностью продукции ЦГТазы (14.8-19.7%). Оценка динамики роста и синтеза фермента выявила корреляцию между этими процессами у родительского и мутантных клонов, показывая, что УФ-мутации не нарушили общий баланс между клеточным ростом и синтезом фермента. Стабильность секреторной активности мутантных клонов упрощает разработку методов регуляции биосинтеза в промышленных или исследовательских целях.

Конфликт интересов | Conflicts of Interest

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

The authors declare no actual or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Усанов Н.Г., Гильванова Е.А., Елизарьев П.А., Пруцакова Е.А., Мелентьев А.И. (2007) Усовершенствованный метод фотометрического определения активности циклодекстринглюканотрансферазы. *Прикладная биохимия и микробиология*. **43**(1): 118–124.
EDN: [HZDLDP](#)

- Demirkan E., Özdemir K. (2020) Ethyl methanesulfonate (EMS) mutation for hyper protease production by *Bacillus subtilis* E6-5 and optimization of culture conditions. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. **48**(4): 355–365. <https://doi.org/10.15671/hjbc.697070> EDN: LDWJBT
- Demirkan E., Sevgi T., Gokoz M., Güler B.E., Zeren B., Özalpar B., Abdou M. (2018) Strain improvement by UV mutagenesis for protease overproduction from *Bacillus subtilis* E6-5 and nutritional optimization. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. **12**(35): 69–77. Available at: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jbes/article/1679086> (Accessed: 25/05/2026)
- Holman D.E., Abrahams A.I., Hattings K., Saulse C., Hess M., Stegmann D., Roomanay M., Basson G., Klein A., Keyster M. (2026a) Ethyl methanesulfonate mutagenesis in fungi: genetic mechanisms, applications, and implications for agricultural biotechnology. *Archives of Microbiology*. **208**(7): 341. <https://doi.org/10.1007/s00203-026-04858-x> EDN: VOYDBG
- Holman D.E., Basson G., Klein A., Keyster M. (2026b) Ethyl methanesulfonate mutagenesis: Advancing bacterial genetics for sustainable agriculture. *Folia Microbiologica*. **71**(3): 485–495. <https://doi.org/10.1007/s12223-025-01407-9> EDN: LRCJTO
- Karakus B.Z., Korkmaz İ., Demirci K., Sinan Arslan K., Unlu O., Catal T. (2018) A combined treatment using ethylmethane sulfonate and ultraviolet light to compare amylase production by three *Bacillus* sp. isolates. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. **48**(9): 815–822. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1509088>
- Khattab A.E.-N., Abou-Shosha A., Abozaid A., El-Fadly G. (2023) Genetic enhancement of *Bacillus* cyclodextrin glycosyltransferase production. *Egyptian Journal of Chemistry*. **66**(5): 223–235. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.148437.6419>
- Khedr M.A., Ewais E.A., Khalil K.M.A. (2017) Improvement of thermophilic α -amylase productivity through UV mutagenesis and AmyE gene amplification and sequencing. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*. **4**(2): 58–67.
- Kim S., Ha I., Lee Y.-Y., Lee J., Yun J. (2025) Development of a high-performance *Trichoderma* mutant for enhanced cellulase production through UV-induced random mutagenesis. *Journal of Fungi*. **11**(6): 439. <https://doi.org/10.3390/jof11060439> EDN: ALBUZD
- Lim C.H., Rasti B., Sulistyo J., Hamid M.A. (2021) Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources. *Heliyon*. **7**(2): e06305. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06305> EDN: JLVMUZ
- Musuc A.M. (2024) Cyclodextrins: Advances in chemistry, toxicology, and multifaceted applications. *Molecules*. **29**(22): 5319. <https://doi.org/10.3390/molecules29225319> EDN: IEXIMB
- Narasimhan A., Suresh S., Bist D., Shivakumar S. (2013) Enhancement of mycolytic activity of an antagonistic *Bacillus subtilis* through ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis. *Turkish Journal of Biology*. **37**(3): 323–328. <https://doi.org/10.3906/biy-1209-20>
- Poulson B.G., Alsulami Q.A., Sharfaldin A., El Agammy Emam.F., Mouffouk F., Emwas A.-H., Jaremko L., Jaremko M. (2022) Cyclodextrins: Structural, chemical, and physical properties, and applications. *Polysaccharides*. **3**(1): 1–31. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001> EDN: DMIZDK
- Rabadiya K., Pardhi D., Thaker K., Patoliya J., Rajput K., Joshi R. (2024) A review on recent upgradation and strategies to enhance cyclodextrin glucanotransferase properties for its applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. **259**: 129315. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129315> EDN: JPTDVI
- Saffarionpour S. (2026) Cyclodextrins as supramolecular agents for enhancing the separation performance of deep eutectic solvents: an overview of food and pharmaceutical applications. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. **106**(1): 65–93. <https://doi.org/10.1007/s10847-025-01323-y> EDN: VLFMNB
- Sharma N., Mallick S.A., Sheikh Z.N., Raina S., Chalotra R. (2021) Mutagenesis of *Bacillus* spp. using ethyl methane-sulfonate (EMS) for improvement of amylase activity. *Chemical Science Review and Letters*. **10**(38): 227–234.
- Tai W.Y., Lee C.K., Ibrahim D. (2016) Enhancement of cellulolytic enzymes and xylanase production via classical mutational techniques under solid-state fermentation condition. *Malaysian Journal of Microbiology*. **12**(1): 91–101. <https://doi.org/10.21161/mjm.73315>
- Urooj T., Mishra M., Pandey S. (2024) Unlocking environmental solutions: a review of cyclodextrins in pollutant removal. *Discover Environment*. **2**(1): 65. <https://doi.org/10.1007/s44274-024-00090-w> EDN: EGSNTP

REFERENCES

- Usanov N.G., Gil'vanova E.A., Elizar'ev P.A., Prutsakova E.A., Melent'ev A.I. (2007) An improved method of photometric determination of cyclodextrin glucanotransferase activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **43**(1): 118–124. EDN: HZDLDP (in Russian)

- Demirkan E., Özdemir K. (2020) Ethyl methanesulfonate (EMS) mutation for hyper protease production by *Bacillus subtilis* E6-5 and optimization of culture conditions. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. **48**(4): 355–365. <https://doi.org/10.15671/hjbc.697070> EDN: LDWJBT
- Demirkan E., Sevgi T., Gokoz M., Güler B.E., Zeren B., Özalpar B., Abdou M. (2018) Strain improvement by UV mutagenesis for protease overproduction from *Bacillus subtilis* E6-5 and nutritional optimization. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. **12**(35): 69–77. Available at: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jbes/article/1679086> (Accessed: 25/05/2026)
- Holman D.E., Abrahams A.I., Hattingh K., Saulse C., Hess M., Stegmann D., Roomanay M., Basson G., Klein A., Keyster M. (2026a) Ethyl methanesulfonate mutagenesis in fungi: genetic mechanisms, applications, and implications for agricultural biotechnology. *Archives of Microbiology*. **208**(7): 341. <https://doi.org/10.1007/s00203-026-04858-x> EDN: VOYDBG
- Holman D.E., Basson G., Klein A., Keyster M. (2026b) Ethyl methanesulfonate mutagenesis: Advancing bacterial genetics for sustainable agriculture. *Folia Microbiologica*. **71**(3): 485–495. <https://doi.org/10.1007/s12223-025-01407-9> EDN: LRCJTO
- Karakus B.Z., Korkmaz İ., Demirci K., Sinan Arslan K., Unlu O., Catal T. (2018) A combined treatment using ethylmethane sulfonate and ultraviolet light to compare amylase production by three *Bacillus* sp. isolates. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. **48**(9): 815–822. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1509088>
- Khattab A.E.-N., Abou-Shosha A., Abozaid A., El-Fadly G. (2023) Genetic enhancement of *Bacillus* cyclodextrin glycosyltransferase production. *Egyptian Journal of Chemistry*. **66**(5): 223–235. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.148437.6419>
- Khedr M.A., Ewais E.A., Khalil K.M.A. (2017) Improvement of thermophilic α -amylase productivity through UV mutagenesis and AmyE gene amplification and sequencing. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*. **4**(2): 58–67.
- Kim S., Ha I., Lee Y.-Y., Lee J., Yun J. (2025) Development of a high-performance *Trichoderma* mutant for enhanced cellulase production through UV-induced random mutagenesis. *Journal of Fungi*. **11**(6): 439. <https://doi.org/10.3390/jof11060439> EDN: ALBUZD
- Lim C.H., Rasti B., Sulistyo J., Hamid M.A. (2021) Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources. *Heliyon*. **7**(2): e06305. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06305> EDN: JLVMUZ
- Musuc A.M. (2024) Cyclodextrins: Advances in chemistry, toxicology, and multifaceted applications. *Molecules*. **29**(22): 5319. <https://doi.org/10.3390/molecules29225319> EDN: IEXIMB
- Narasimhan A., Suresh S., Bist D., Shivakumar S. (2013) Enhancement of mycolytic activity of an antagonistic *Bacillus subtilis* through ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis. *Turkish Journal of Biology*. **37**(3): 323–328. <https://doi.org/10.3906/biy-1209-20>
- Poulson B.G., Alsulami Q.A., Sharfaldin A., El Agammy Emam.F., Mouffouk F., Emwas A.-H., Jaremko L., Jaremko M. (2022) Cyclodextrins: Structural, chemical, and physical properties, and applications. *Polysaccharides*. **3**(1): 1–31. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001> EDN: DMIZDK
- Rabadiya K., Pardhi D., Thaker K., Patoliya J., Rajput K., Joshi R. (2024) A review on recent upgradation and strategies to enhance cyclodextrin glucanotransferase properties for its applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. **259**: 129315. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129315> EDN: JPTDVI
- Saffarionpour S. (2026) Cyclodextrins as supramolecular agents for enhancing the separation performance of deep eutectic solvents: an overview of food and pharmaceutical applications. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. **106**(1): 65–93. <https://doi.org/10.1007/s10847-025-01323-y> EDN: VLFMNB
- Sharma N., Mallick S.A., Sheikh Z.N., Raina S., Chalotra R. (2021) Mutagenesis of *Bacillus* spp. using ethyl methane-sulfonate (EMS) for improvement of amylase activity. *Chemical Science Review and Letters*. **10**(38): 227–234.
- Tai W.Y., Lee C.K., Ibrahim D. (2016) Enhancement of cellulolytic enzymes and xylanase production via classical mutational techniques under solid-state fermentation condition. *Malaysian Journal of Microbiology*. **12**(1): 91–101. <https://doi.org/10.21161/mjm.73315>
- Urooj T., Mishra M., Pandey S. (2024) Unlocking environmental solutions: a review of cyclodextrins in pollutant removal. *Discover Environment*. **2**(1): 65. <https://doi.org/10.1007/s44274-024-00090-w> EDN: EGSNTP

Цитировать как

Ушмаева У.А., Мильман П.Ю., Гильванова Е.А. (2026) Физико-химический мутагенез для увеличения продукции циклодекстринглюканотрансферазы штаммом *Paenibacillus* sp. IB-663. *Экобиотех.* **9**(3): 354-364. DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/gydpbz>

Сведения об авторах

Ульяна Андреевна Ушмаева, Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: Ulianka102@yandex.ru, SPIN: 9596-6711, ORCID: 0009-0009-0678-9173.

Полина Юрьевна Мильман, к.б.н., Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия. E-mail: milman.polina@gmail.com, SPIN: 1300-1103, ORCID: 0000-0001-6379-7094.

Елена Альбертовна Гильванова, к.б.н., Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия. E-mail: gelena@anrb.ru, SPIN: 1897-6291, ORCID: 0000-0003-3656-7925.

Cited as

Ushmaeva U.A., Milman P.Yu., Gilvanova E.A. (2026) Physicochemical mutagenesis to increase the efficiency of cyclodextringlucanotransferase production by *Paenibacillus* sp. IB-663. *Ecobiotech.* **9**(3): 354-364. DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/gydpbz>

Information About the Authors

Ulyana A. Ushmaeva, ITMO University, Saint-Petersburg, Russia. E-mail: Ulianka102@yandex.ru, SPIN: 9596-6711, ORCID: 0009-0009-0678-9173.

Polina Yu. Milman, PhD in Biology, Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: milman.polina@gmail.com, SPIN: 1300-1103, ORCID: 0000-0001-6379-7094.

Elena A. Gilvanova, PhD in Biology, Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: gelena@anrb.ru, SPIN: 1897-6291, ORCID: 0000-0003-3656-7925.