

АНАЛИЗ СТРУКТУРНОГО ПАТТЕРНА ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB-739

Гильванова Е.А.^{1*}, Мильман П.Ю.¹, Усанов Н.Н.²

¹Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

²АО «Лаборатория Касперского», Москва, Россия

*E-mail: gelena@anrb.ru

ANALYSIS OF THE STRUCTURAL PATTERN OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE FROM *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB-739

Gilvanova E.A.^{1*}, Milman P.Yu.¹, Usanov N.N.²

¹Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

²Kaspersky Lab JSC, Moscow, Russia

*E-mail: gelena@anrb.ru

Аннотация

Циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТазы, EC 2.4.1.19) трансформируют крахмал в циклодекстрины (ЦД) в виде трех основных гомологов (α -, β -, γ -), находящихся широкое применение в различных отраслях промышленности. ЦГТаза *Paenibacillus ehimensis* IB-739 уникальна тем, что обеспечивает стабильное соотношение циклодекстринов независимо от дозирования фермента и обладает редкой способностью смещать равновесие реакции в сторону преимущественного синтеза γ -ЦД. Уровень гомологии ЦГТазы IB-739 с аминокислотными последовательностями ЦГТаз из различных таксонов варьирует от 54% до 78%, тогда как уровень внутривидовой идентичности гликозилгидролаз *P. ehimensis* и ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 – 99.56-99.85%. Анализ структурных доменов ЦГТазы показал наличие канонической мультидоменной архитектуры из пяти доменов, характерной для ЦГТаз. Тепловая карта сходства доменов выявила неоднородную идентичность по всей структуре фермента, у которого домен A1 близок к алкалофильным β -ЦГТазам (85.6-87%), а домен B – нормофильным α/β - и β -ЦГТазам (84.4-87.5%). Филогенетическим анализом подтверждена локализация ЦГТазы IB-739 в кластере α/β - и β -специфичных ЦГТаз с высоким показателем бутстрепа, образуя при этом отдельную в кластере ветвь. Анализ множественного выравнивания ЦГТазы IB-739 и 18 гомологов выявил внутривидовые особенности в первичной структуре, свойственные только исследуемому ферменту и гликозилгидролазам вида *P. ehimensis*. Отличительные паттерны обнаружены в каталитических доменах A1/B/A2, ответственных за функциональность и специфичность фермента, и в сайтах связывания с субстратом (MBS).

Ключевые слова:

Paenibacillus ehimensis, циклодекстринглюканотрансфераза, ЦГТаза, гликозилгидролаза, архитектура доменов, каталитический субсайт, циклодекстрины, ЦД

Поступила в редакцию: 10.08.2026

Принято в печать: 04.09.2026

Abstract

Cyclodextrin glucanotransferases (CGTases, EC 2.4.1.19) convert starch to cyclodextrins (CDs) in three major homologues (α -, β -, γ -) that are widely used in various sectors. CGTase of *Paenibacillus ehimensis* IB-739 is unique in providing a stable cyclodextrin ratio irrespective of the dose of the enzyme and has the rare ability to shift the equilibrium of the reaction towards the preferential synthesis of γ -CD. The homology of CGTase IB-739 to amino acid sequences of other taxa ranges from 54% to 78%, and the level of intraspecific identity between *P. ehimensis* glycoside hydrolases and *P. ehimensis* CGTase IB-739 is 99.56-99.85%. An analysis of CGTase structural domains revealed the presence of a canonical five-domain multi-domain structure, which is typical for CGTases. The domain similarity heat map revealed a heterogeneous identity across the entire enzyme structure, with domain A1 close to the alkaliphilic β -CGTases (85.6-87%) and domain B close to the normophilic α/β - and β -CGTases (84.4-87.5%). Phylogenetic analysis confirmed that CGTase IB-739 is localized in a cluster of α/β - and β -specific CGTases with a high bootstrap index, and that it forms a distinct branch within the cluster. Multiple alignment analysis of CGTase IB-739 and 18 homologues revealed intraspecific features in the primary structure, characteristic only of the studied enzyme and glycoside hydrolases of the species *P. ehimensis*. Distinctive patterns are found in the catalytic domains A1/B/A2, responsible for the functionality and specificity of the enzyme, and in the substrate binding sites (MBS).

Keywords:

Paenibacillus ehimensis, cyclodextrin glucanotransferase, CGTase, glycoside hydrolase, domain architecture, catalytic subsite, cyclodextrins, CD

Received: 10.08.2026

Accepted: 04.09.2026

ВВЕДЕНИЕ

Циклодекстрины (ЦД) – это циклические олигосахариды, состоящие из звеньев глюкопиранозы, соединенных α -1,4-связями. Распространенными видами ЦД являются α -, β - и γ -ЦД, содержащие 6, 7 и 8 звеньев глюкопиранозы соответственно. ЦД имеют гидрофильную внешнюю поверхность и гидрофобную внутреннюю полость, благодаря чему могут образовывать комплексы включения со многими соединениями, тем самым изменяя физические и химические свойства молекулы, такие как стабильность, растворимость, летучесть [Poulson *et al.* 2022]. Благодаря этим уникальным свойствам они широко применяются в промышленности, в том числе в косметической, пищевой, медицинской и текстильной отраслях [Pardhi *et al.* 2023; Rabadiya *et al.* 2024; Saffarionpour 2026].

ЦД образуются в результате ферментативной трансформации крахмала в реакции трансгликозилирования при участии циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТазы, EC 2.4.1.19). Обнаружено, что различные микроорганизмы способны вырабатывать ЦГТазу, в том числе *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Actinomycetes*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Aspergillus* и *Archaea* [Lim *et al.* 2021; Sharma *et al.* 2026]. Все известные ЦГТазы из различных бактериальных источников при инкубации с крахмалом продуцируют смесь ЦД и линейных мальтоолигосахаридов. Преимущественно образующийся продукт ЦД зависит от типа и происхождения ЦГТазы. В зависимости от доминирующего типа продукта реакции циклизации ЦГТазы можно разделить на α -, β - и γ -ЦГТазы, а также на смешанные α/β -, β/γ -ЦГТазы [Leemhuis *et al.* 2010].

Фермент циклодекстрингликозилтрансфераза относится к подсемейству GH13_2 суперсемейства гликозилгидролаз (GH) (<http://www.cazy.org>). Ферменты α -амилаза и мальтогенные амилазы также относятся к этому классу ферментов, и все три фермента имеют существенное последовательное сходство аминокислотных последовательностей. Все три фермента обладают тремя консервативными доменами: А, В и С, тогда как ЦГТазы имеют еще два домена: D и E. ЦГТазы представляют собой мономерные белки с пятью доменами (А, В, С, D и E) [Klein, Schulz 1991], катализирующие четыре типа реакций: связывание, гидролиз, циклизацию и диспропорционирование [Leemhuis *et al.* 2010]. Домены А и В являются каталитическими и ответственны за основную функциональную активность фермента – гидролиз, циклизацию и диспропорционирование. Домены С и E содержат участки связывания мальтозы, играющие важную роль в связывании сырого крахмала [Qi, Zimmermann 2005]. Последовательность домена D и его значение в ЦГТазе остается неизученным. Функция домена D может быть связана с правильным позиционированием домена E и влиять на каталитическую реакцию фермента [Rimphanitchayakit *et al.* 2005]. Несколько исследований предполагают его гидролитическую активность [Leemhuis *et al.* 2010; Han *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2021]. Домен E, или домен связывания сырого крахмала, принадлежит к семейству 20 модулей связывания углеводов (CBM20, <http://www.cazy.org>), имеющих два сайта связывания мальтозы [Machovič, Janeček 2006; Han *et al.* 2014].

Каталитический центр ЦГТазы расположен в основании домена А, представляющего собой симметричную β/α изомеразную бочкообразную структуру с 8 параллельными β -листами, окруженными 8 α -спиралями [Leemhuis *et al.* 2010; Han *et al.* 2014; Lim *et al.* 2021]. Домен В – выступающая петля между 3 β -листом и 3 α -спиралью домена А, разделяющая этот домен на А1 и А2, и содержит 44-133 аминокислотных остатка, играющих решающую роль в связывании субстрата [van der Veen *et al.* 2000b; Goh *et al.* 2012; Lim *et al.* 2021]. Таким образом, каталитический центр и вторичные сайты связывания углеводов (субсайты), локализованные в доменах А/В, расположенные в глубоком кармане, обеспечивают взаимодействие с олиго- и полисахаридными субстратами [Klein *et al.* 1992; Leemhuis, Dijkhuizen 2003; Kumar 2010]. Всего в сайте связывания субстрата ЦГТазы насчитывается девять субсайтов, которые являются донорными субсайтами с -1 по -7 и рецепторными субсайтами +1 и +2. Непосредственно каталитический центр расположен рядом с субсайтами -1 и +1 [Kelly *et al.* 2009]. Все гомологи ЦГТаз, члены клана гликозилгидролаз GH, демонстрируют каталитическую TIM-бочкообразную топологию с как минимум четырьмя консервативными регионами (CSR) от I до IV. Эти четыре мотива содержат функционально важные остатки среди ЦГТаз, каталитическую триаду Asp/Glu/Asp, а также остаток Arg, расположенный на второй позиции перед каталитическим нуклеофилом Asp. Обнаружены три дополнительных мотива CSR V-VII содержащие несколько остатков, которые отличают специфичность ЦГТаз от специфичности других членов семейства GH13 [Janecsek *et al.* 1995]. Этот структурный набор обеспечивает разрыв α -1,4-гликозидной связи в крахмале и временное образование ковалентной

связи фермента с углеводом. Три домена (C, D и E) составляют C-концевую область в ЦГТазах и имеют β -листовую структуру [Qi, Zimmermann 2005].

Исследуемая в данной работе ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739, была выделена и очищена, изучены ее физико-химические свойства, кинетические характеристики и определено соотношение циклических продуктов [Федорова и др. 2012]. Особенность данной ЦГТаза заключается в образовании относительно постоянных соотношений α -, β - и γ -ЦД, мало зависящих от дозировки внесенного фермента. Ранее было обнаружен факт снижения коэффициента селективности $[\beta]/[\gamma]$ ЦГТаз группы *P. ehimensis*, приводящий к смещению равновесия реакции в сторону образования γ -ЦД на фоне увеличения удельной дозировки фермента, не обнаруженный ранее ни одним из типов ЦГТаз сравниваемых таксономических групп *P. macerans*, *P. illinoisensis* или *P. campinasensis* [Федорова и др. 2011].

Цель работы – анализ первичной и вторичной структуры ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739, включающий подоменный анализ, определения сходства с референсными ЦГТазами, установления филогенетического положения исследуемого фермента в семействе гомологов ЦГТаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служил штамм продуцент ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739. Штамм хранится в коллекции культур ВКМ В-2680D и УИБ УФИЦ РАН под номером UIB-29. Для штамма *P. ehimensis* IB-739 выполнено полногеномное секвенирование, аннотирование генома, драфт генома депонирован в международной базе данных GenBank под номером JAUMKJ010000000. Прочитанная последовательность гена 16S рРНК штамма доступна в GenBank (NCBI) под номером FN582329.1, прочитанная аминокислотная последовательность ЦГТаза под номером MDO3678285.1 (locus JAUMKJ010000016).

Анализ гомологии ЦГТаза IB-739 проводился с использованием NCBI BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), а функциональная аннотация выполнена с использованием базы данных консервативных доменов NCBI (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>), InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), Reference Sequence (RefSeq, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). Для проведения структурного анализа ЦГТаза IB-739 из базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) были отобраны 18 аминокислотных последовательностей по принципу генетического разнообразия, специфичности ЦГТаз и полноты информации о продуценте фермента (Табл. 1). Сравнительный анализ последовательностей ЦГТаз на основе множественного выравнивания проводили с использованием программного обеспечения ClustalOmega [Sievers et al. 2011]. Для проведения филогенетического анализа и подоменного сравнения отбирали полностью прочитанные аминокислотные последовательности длиной не менее 690 остатков, и депонированные в базе ProteinDataBank (PDB, <https://www.rcsb.org>). Построение филогенетических деревьев для аминокислотной последовательности ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739 осуществляли методами присоединения соседей (Neighbor-Joining) максимальной экономии (Maximum Parsimony) и минимальной эволюции (Minimal Evolution) с 1000 бутстреп-репликациями с помощью программы MEGAX [Kumar et al. 2018]. Узлы с поддержкой >70% после 1000 бутстреп-репликаций считались статистически значимыми. Парное сравнение доменов ЦГТаза IB-739 с доменами отобранных последовательностей осуществляли с помощью онлайн-сервиса в программе EMBOSS-NEEDLE, используя матрицу соответствия RAM90 (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/needle>).

Сравнение со структурно охарактеризованными ЦГТазами проводили на основе базы данных о белках PDB, Swiss-Prot (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>).

Для прогнозирования сигнального пептида в ЦГТаза использовался онлайн-сервис SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>).

По аминокислотной последовательности белка рассчитаны индекс нестабильности, алифатический индекс, индекс GRAVY в программе ProtParam на сайте ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Трехмерная структура ЦГТаза смоделирована с помощью AlphaFold2 [Jumper et al. 2021]. Визуализация выполнена с помощью PyMol (v3.29.0a; Schrödinger, LCC).

Статистическую обработку результатов проводили в программе OriginPro 2024 («OriginLabCorp.», США). Результаты считали достоверными при критерии вероятности $p \leq 0.05$.

Таблица 1. Список ЦГТаз, использованных в статье

Источник ЦГТазы	Номер в GenBank (NCBI)	Соотношение ЦД в долях	Специфичность	Ссылка
<i>P. ehimensis</i> IB-739	MDO3678285.1	0.68:1:0.19	α/β	Федорова и др. 2012
<i>P. macerans</i> IFO3490	P04830.2	нд	α	Fujiwara et al. 1992
<i>P. macerans</i> IB7	AAC04359.1	0.54:1:0.2	α	Bikbulatova et al. 2000
<i>P. pabuli</i> US-132	CAO05752.1	0.34:1:0.22	β	Jemli et al. 2008
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfugenes</i> EM1	P26827.2	0.74:1:0.16	α/β	Wind et al. 1995
<i>Bacillus stearothermophilus</i> NO2 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i> NO2)	P31797.1	0.57:1:0.25	α/β	Zuo et al. 2022
<i>Bacillus circulans</i> 251 (<i>Niallia circulans</i> 251)	P43379.1	0.4:1:0.2	β	Lawson et al. 1994
<i>Bacillus</i> sp. 663	P31747.1	0.27:1:0.23	β	Bikbulatova et al. 2000
<i>P. illinoisensis</i> E3	PYY31245.1	0.35:1:0.1	β	Doukyu et al. 2003
<i>Bacillus licheniformis</i>	P14014.1	нд	α/β	Hill et al. 1990
<i>Bacillus</i> sp. 38-2	P09121.2	нд	β	Kato, Horikoshi 1984
<i>Bacillus</i> sp. 1011	P05618.1	нд	β	Kimura et al. 1987
<i>Bacillus</i> sp. B1018	P17692.1	нд	β	Itkor et al. 1990
<i>Bacillus lentus</i> 290-3	CAA01436.1	нд	β/γ	Hirano et al. 2006
<i>Bacillus pseudocaliphilus</i> 20RF	AEL33336.1	0:1:0.25	β/γ	Atanasova et al. 2011
<i>Bacillus ohbensis</i>	P27036.2	0:1:0.2	β/γ	Sin et al. 1991
<i>Brevibacillus brevis</i> CD162	O30565.1	0.03:1:0.3	β/γ	Kim et al. 1998
<i>Bacillus</i> sp. G-825-6	BAE87038.1	0:0.5:1	β/γ	Hirano et al. 2006
<i>Bacillus clarkii</i> 7364 (<i>Evansella clarkii</i> 7364)	4JCM_A	0.09:0.19:1	γ	Takada et al. 2003
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	P08704	нд	α	Binder et al. 1986

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск гомологов ЦГТазы в Protein Data Bank с использованием BLASTp показал, что у ЦГТаз довольно сильно варьирует уровень сходства от 54% до 78% в аминокислотных последовательностях для большинства источников фермента, независимо от вида ЦД, который они продуцируют в качестве основного продукта.

Сравнение со структурно охарактеризованными ЦГТазами, представленными в базах данных (PDB, Swiss-Prot), показало, что наибольшая идентичность 78.17%, наблюдается с ЦГТазой из *B. circulans* 251 (идентификатор PDB: 1CXI) и его мутантами, и 75.11-75.25% с *Bacillus* sp. 1011 (идентификатор PDB: 1PAM). Поиск в базе RefSeq обнаружил 4 ближайших последовательностей белков бактерий *P. ehimensis*, аннотированных как "alpha-amylase family glycosyl hydrolase", включающих регион "AmyAc_AmyMalt_CGTase" (cd11320) (42-432) и домен CBM20 (617-671). Уровень внутривидовой идентичности гликозилгидролаз *P. ehimensis* (WP_420872709.1; WP_411829828.1; WP_407669436.1; WP_439652536.1; WP_127486522.1; MGF9911162.1; MGF9930146.1) и ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 обнаружен очень высоким 99.56-99.85% по сравнению с ЦГТазами других видов и таксонов.

Архитектура доменов. Анализ структурных доменов (NCBI CDD, InterProScan) ЦГТазы IB-739 показал наличие мультидоменной архитектуры из пяти доменов (ABCDE), характерной для ЦГТаз (рис 1, 2), таким образом, подтвердил принадлежность исследуемой ЦГТазы к подсемейству GH13_2 суперсемейства гликозилгидролаз (GH). Домен А, включающий субдомены A1 (0-138) и A2 (203-406), имеет укладку типа β/α TIM-бочонка, характерную для семейства α -амилаз. В центре этого домена находится высококонсервативный каталитический триадный комплекс аминокислот (Asp-

Glu-Asp) (Asp229-Glu257-Asp325), отвечающий за гидролиз и трансгликозилирование. Домен В (139-202) представляет собой петлевую структуру, выступающую из домена А, и делящий его на 2 субдомена А1 и А2, с которыми формирует глубокий активный центр, содержащий связывающие участки (субсайты) для углеводной цепи. Домен С (407-495) имеет β -листовую сэндвичевую структуру и содержит специфический участок для связывания мальтозы (MBS3, Trp413), способствующий правильной ориентации субстрата перед реакцией.

Рисунок 1. Доменная структура ЦГТаза *P. ehimensis* IB-739. Домен А1 выделен розовым цветом, А2 – красным, В – синим, С – желтым, D – зеленым, Е – голубым. Визуализация выполнена в программе PyMol.

Figure 1. Domain structure of CGTase from *P. ehimensis* IB-739. Domain A1 is shown in pink, A2 – red, B – blue, C – yellow, D – green, E – light blue. Visualization was performed in PyMol.

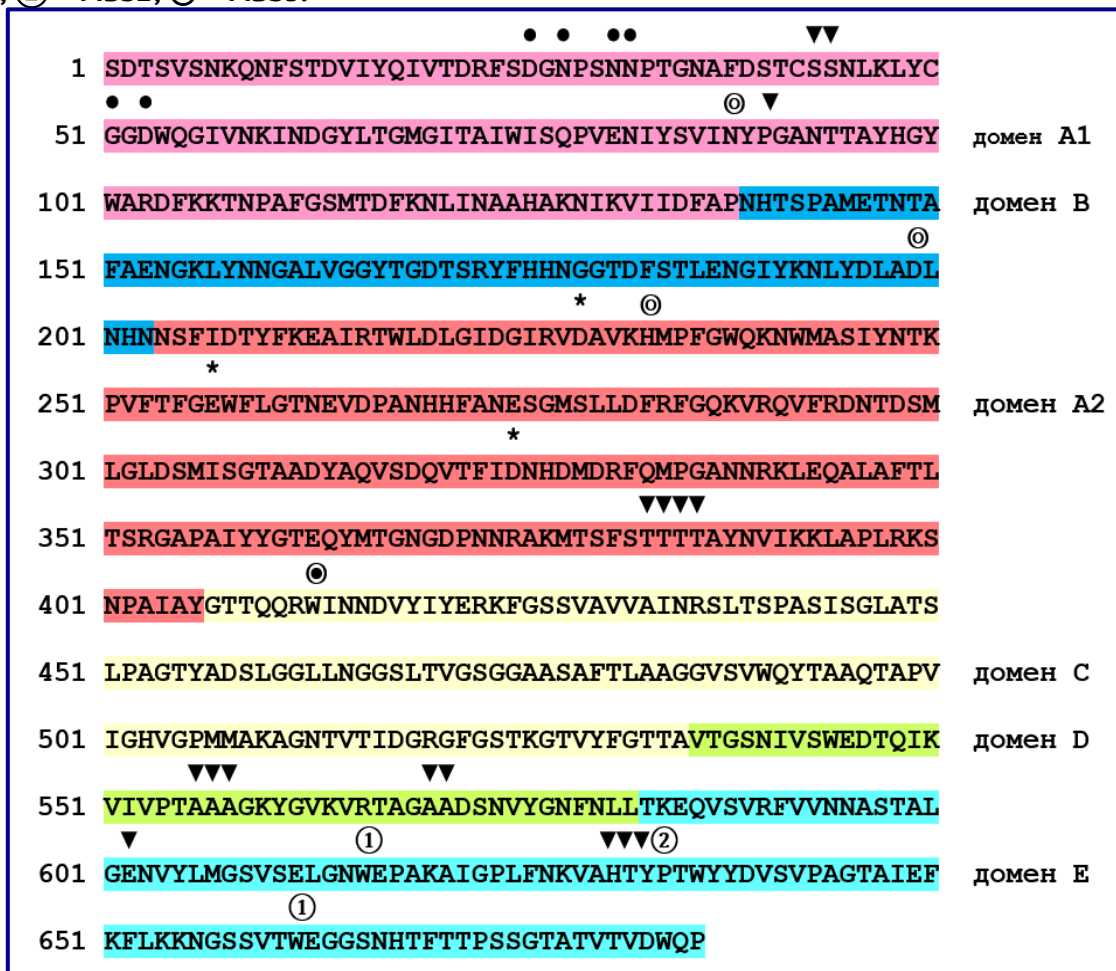


Домен D (496-582) служит гибким линкером, структурно соединяющим каталитическое ядро ABC с терминальным доменом, а домен E (583-686) содержит углеводсвязывающий модуль типа CBM20 и два сайта связывания мальтозы (MBS1, MBS2). MBS1 обеспечивает первичное связывание фермента с субстратом. Его ключевые остатки (Trp616 и Trp662) обеспечивают взаимодействие через ван-дер-ваальсовы контакты индольных групп с глюкозными кольцами, а дополнительные водородные связи с Lys653, Asn667 и молекулами воды усиливают связывание. MBS2 направляет линейные цепочки полисахаридов к активному центру фермента и его ключевой остаток (Tyr633) помогает «подвести» субстрат к каталитическому центру.

ЦГТаза IB-739 имеет два сайта связывания кальция (Ca-I, Ca-II). Взаимодействие с кальцием в Ca-I происходит за счет трех остатков домена В (Ile190, Asp199 и His233) и Asn139 из домена А2. Ca-II расположен в домене А1 и содержит шесть остатков, взаимодействующих с кальцием: Asp27, Asn29, Asn32, Asn33, Gly51 и Asp53. Ca-II представляет собой протяженный участок из петель и коротких альфа-спиралей, который по форме напоминает искажённую букву U. Ион кальция связывается прямо в центре этой «карманоподобной» структуры. [Goh *et al.* 2012].

Рисунок 2. Последовательность зрелой формы ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 с координатами и указанием доменов. Домен A1 выделен розовым цветом, B – синим, A2 – красным, C – желтым, D – зелёным, E – голубым. Значком ▼ обозначены структурные паттерны ЦГТазы IB-739). Другие обозначения: * отмечена каталитическая триада; • – Ca-I; ◎ – Ca-II; ① – MBS1; ② – MBS2; ◎ – MBS3.

Figure 2. Sequence of the mature form CGTase from *P. ehimensis* IB-739 with coordinates and domains indicated. Domain A1 is shown in pink, B – blue, A2 – red, C – yellow, D – green, E – light blue. The ▼ symbol indicates structural patterns of CGTase from *P. ehimensis* IB-739. Other legend: * marks the catalytic triad; • – Ca-I; ◎ – Ca-II; ① – MBS1; ② – MBS2; ◎ – MBS3.



Аминокислотные остатки Asp229, Glu257 и Asp325 (согласно нумерации ЦГТазы *B. circulans* 251) образуют каталитическую триаду ЦГТазы. Остатки Asp229 и Glu257 участвуют в начальном расщеплении субстрата α -1,4-связанного глюкоолигосахарида. На первом этапе реакции синтеза ЦД Glu257 протонирует кислород гликозидной связи субстрата, образуя промежуточное соединение. Протонированное состояние Glu257 образуется водородной связью с Asp229. При связывании субстрата водородная связь разрывается, и Asp229 депротонируется. На втором этапе реакции гидроксильная группа Glu257 активируется депротонированием молекулы акцептора. Asp325 совершает нуклеофильную атаку на аномерный атом C1 молекулы донора, что приводит к образованию ЦД.

ЦГТаза из *P. ehimensis* IB-739 состоит из 716 аминокислот (ProtParam) имеет низкий индекс нестабильности (20.55), алифатический индекс (72.39), указывающий на низкую термическую стабильность, и отрицательное значение GRAVY (-0.211), указывающее на гидрофильность и хорошую растворимость в водных средах.

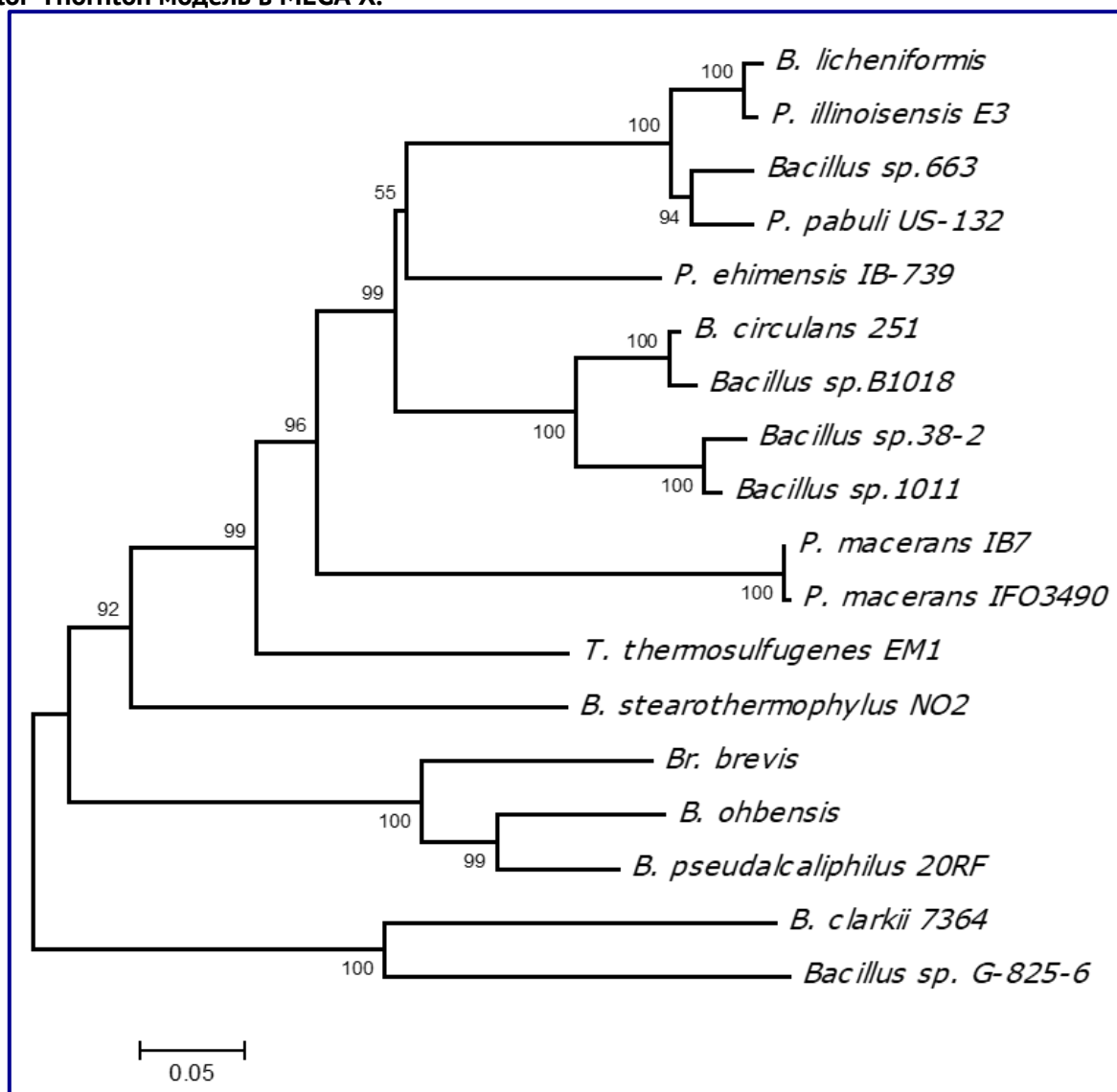
Сигнальный пептид. Анализ последовательности (SignalP) выявил наличие N-концевого сигнального пептида из 29 остатков (MKTLPKLLAAVLAMSLTTALPPLSPAASA), который удаляется при секреции ЦГТазы. Аминокислотная последовательность этого пептида с несколькими положительно заряженными аминокислотами вблизи N-конца (для взаимодействия с клеточными компонентами), за которыми следует гидрофобное аминокислотное ядро (для встраивания в клеточные мембраны), заканчивающаяся участком AlaAlaSerAla, характерным для сайта расщепления сигнальной

пептидазы и согласуется с сигнальными пептидами других грамположительных бактерий [Zhang et al. 2025].

Филогения ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739. Для установления филогенетического родства были построены бескорневые филогенетические деревья и с внешней группой (*K. pneumoniae*) методами Parsimony, Minimal Evolution и Neighbor-Joining, UPGMA, демонстрируя схожую топологию деревьев со статистически значимой бутстреп-поддержкой. ЦГТаза IB-739 на всех построенных филограммах образует отдельную ветвь в кластере α/β - и β -специфичных ЦГТаз, объединенных высоким показателем бутстрепа. На рисунке 3 представлено одно из многих деревьев, построенное методом присоединения ближайших соседей, где кластеризуются филогенетические группы микроорганизмов с различной специфичностью ЦГТаз, продуцируемых бактериями из родов *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Evansella*, *Niallia*, *Paenibacillus* и *Thermoanaerobacter* с достоверной бутстреп-поддержкой.

Рисунок 3. Неокоренное филогенетическое дерево ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 в окружении референсных гомологов ЦГТазы (семейств GH13), демонстрирующее их эволюционные взаимоотношения. Дерево было построено с использованием методом Neighbor-Joining с 1000 бутстрап-репликациями, используя Jones Taylor-Thornton модель в MEGA X.

Figure 3. Unrooted phylogenetic tree of CGTase from *P. ehimensis* IB-739 surrounded by reference CGTase homologs (GH13 families), demonstrating their evolutionary relationships. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates using the Jones Taylor-Thornton model in MEGA X.

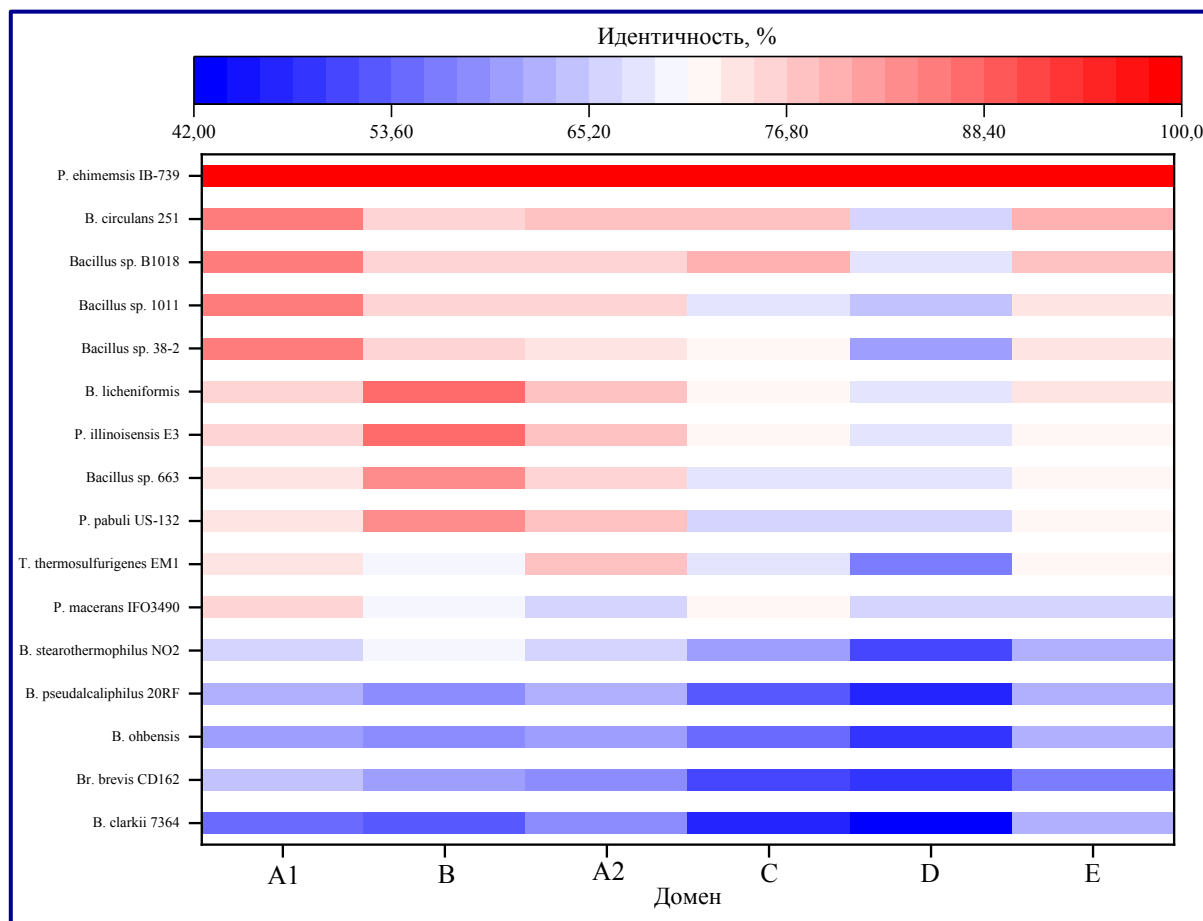


Определение уровня сходства доменов ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 с доменами гомологов. Попарное сравнение доменов ЦГТазы IB-739 с доменами выбранных ЦГТаз показал неравномерную идентичность по всей структуре белка (рис. 4). Особенно это заметно в субдоменах

A1 и В, где локализовано большинство как консервативных мотивов, так и значимых отличий в структуре, влияющих на специфичность (каталитические свойства) фермента (петлевые структуры 87-93, 145-152). Уровень гомологии субдомена A1 ЦГТазы IB-739 с аналогичными субдоменами β -ЦГТаз составляет порядка 85.6-87%, тогда как с α/β -ЦГТазами сходство меньше (74.1-76.3%). Уровень идентичности домена В выглядит зеркальным отображением в обозначенном кластере ЦГТаз, то есть наиболее близкими становятся α/β -ЦГТазы с 84.4-87.5%, а с β -ЦГТазами гомология ниже (75-76.5%). Тепловая карта идентичности доменов может отражать результат «эволюционного шаффлинга», который привел к появлению ЦГТазы IB-739, с уникальными каталитическими свойствами, у которой структура домена A1 близка к аналогичному домену алкалофильных β -ЦГТаз, а домена В – к домену нормофильных α/β и β -ЦГТаз, что наглядно демонстрирует достоверно поддержанная эволюционная история на филогенетическом дереве (рис. 3). Подобный шаффлинг, проведенный не природой, а в лабораторных экспериментах, когда домены A1, В, A2 и CDE γ -ЦГТазы алкалофильного штамма *Bacillus* sp. G825-6 были заменены соответствующими доменами ЦГТазы термофильного *G. stearothermophilus* ET1/NO2 (GeoT) С в различных сочетаниях, привел к появлению двух вариантов с увеличенной продукцией γ -ЦД [Sonnendecker, Zimmermann 2019]. Не исключено также, что наблюдаемый феномен у ЦГТазы IB-739 обусловлен дивергентной эволюцией доменов A1 и В. Далее, в отношении домена A2 ранжирование сходства более равномерное, и находится в соответствии с уровнем сходства полной аминокислотной последовательности ЦГТазы IB-739 с последовательностями выбранных ЦГТаз, 58.8-74.8%. Профили доменов С и Е схожи, за исключением небольших зеркальных вариаций для *P. macerans*/*T. thermosulfugenens* и *P. pabuli*/*Bacillus* sp. 663. Менее гомологичные домены D (42-67.8%) более открыты для изменений по сравнению, например, с каталитическими A1 и В (85-87%), важными участками для функционирования белка.

Рисунок 4. Тепловая карта, отображающая уровень сходства доменной организации различных ЦГТаз. Цветовая шкала показывает идентичность доменов, %: синий обозначает низкие значения, красный – высокие.

Figure 4. Heat map showing the level of similarity in the domain organization of different CGTases. The color scale indicates domain identity (%): blue indicates low values, red indicates high values.



Сравнение аминокислотных последовательностей ЦГТаз из различных источников.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей 18 гомологов ЦГТаз (по базе PDB) выявило наличие высоко консервативных и варьируемых участков (Табл. 2). Консервативные локусы характерны не только для локаций уже описанных ранее субсайтов связывания с субстратом в каталитических доменах A1/A2 и B, но и для остальных трех доменов. В рамках обзора информации по сайт-направленному мутагенезу в консервативных субсайтах связывания (триаде) ЦГТазы, установлено, что подобные замены приводят к падению циклизующей и увеличению гидролизующей активности фермента [Xie *et al.* 2014]. Также методами белковой инженерии получены убедительные результаты после вводимых мутаций в активном центре, которые изменили специфичность, позволяя превращать ЦГТазу в α -амилазу [Kelly *et al.* 2007]. Тем не менее, субсайты связывания углеводов, более удаленные от каталитического центра, могут влиять на специфичность ЦГТазы, и изменения сродства к остаткам углеводов в этих субсайтах, могут привести к изменению соотношения образующихся ЦД, увеличить выход целевых ЦД и линейных олигосахаридов [van der Veen *et al.* 2000b; Kelly *et al.* 2009].

Таким образом, вариации в консервативных участках не учитывали при анализе, равно как и мотивы и полиморфизм отдельных позиций, где наблюдали допустимый уровень вариаций (более 3 аминокислотных остатков) между сравниваемыми последовательностями. Для дальнейшего анализа были отобраны те позиции, где обнаружены аминокислотные остатки, свойственные только для ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739. Множественное выравнивание ЦГТазы IB-739 с гликозилгидролазами *P. ehimensis* подтвердило идентичность обнаруженных отличий, что позволяет в дальнейшем обозначать их как структурные паттерны ЦГТазы *P. ehimensis* (Табл. 2).

Таблица 2. Сравнение специфических аминокислотных остатков ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 с варьируемыми мотивами и остатками различных ЦГТаз (согласно нумерации ЦГТазы *B. circulans* 251)

Table 2. Comparison of specific amino acid residues of CGTase from *P. ehimensis* IB-739 with variable motifs and residues of different CGTases (according to the numbering of CGTase *B. circulans* 251)

Локализация остатка	Источник ЦГТазы					
	<i>P. ehimensis</i> IB-739 ($\alpha/\beta/\gamma$)const	<i>B. circulans</i> 251 (β)	<i>P. macerans</i> IFO3490 (α)	<i>B. stearothermophilus</i> NO2 (α/β)	<i>B. pseudocalicophilus</i> 20RF (β/γ)	<i>B. clarkii</i> (γ)
Домен A1, 44-45	CSSNLKLYC	CT-NLRLYC	RS-NLKLYF	CT-NLRKYC	CS-DLHKYC	CS-DLTKYC
Домен A1, субсайт-3, 87-93	INYPGAN	INYSGVN	IKYSGVN	MNDASGS	HPSG----	HPEG----
Домен B субсайт-7 145-152	METNTAFA	SSDQPSFA	DRDNPGFA	SETNPSYM	LETDPITYA	D-----I
Домен A2 около MBS3 383-386, 392-393	TTTT, KK	TSTT, QK	TGTT, QA	KNTR, QK	RSTT, SS	QTTT, QK
Домен D, 556-558, 570-571	AAA, AA	VAG, GT	VAA, GT	VSP, GQ	VT A, DS	TLG, GV
Домен E MBS2, 607, 625, 628	M, L, K	T, M, Q	V, M, Q	V, M, Q	V, M, Q	V, M, Q

Петлевые структуры, имеющие локализацию около субсайтов связывания с субстратом -3 (87-93) и -7 (145-152), влияние которых на специфичность и регуляцию активности подробно исследовано и подтверждено [Kelly *et al.* 2009], были включены в анализ (рис. 5).

Рисунок 5. Сравнение аминокислотных последовательностей петлевых структур различных ЦГТаз, имеющих локализацию около субсайтов связывания с субстратом -3 (87-93) и -7 (145-152).

Figure 5. Comparison of amino acid sequences of loop structures of various CGTases localized near the substrate-binding subsites -3 (87-93) and -7 (145-152).

	87	88	89	90	91	92	93	94	94	96		145	146	147	148	149	150	151	152	153
<i>P. ehimensis</i> IB-739	I	N	Y	P	G	A	N	-	T	T		A	M	E	T	N	T	A	F	A
<i>P. macerans</i> IFO3490	I	K	Y	S	G	V	N	-	N	T		A	D	R	D	N	P	G	F	A
<i>P. macerans</i> sIB7	I	K	Y	S	G	V	N	-	N	T		A	D	R	D	N	P	G	F	A
<i>B. circulans</i> 251	I	N	Y	S	G	V	N	-	N	T		A	S	S	D	Q	P	S	F	A
<i>Bacillus</i> sp. B1018	I	N	Y	S	G	V	N	-	N	T		A	S	S	D	Q	P	S	F	A
<i>Bacillus</i> sp. 663	I	N	Y	S	G	V	T	-	N	T		A	M	E	T	D	T	S	F	A
<i>P. illinoisensis</i> E3	I	N	Y	S	G	V	T	-	N	T		A	M	E	T	D	T	S	F	A
<i>B. licheniformis</i>	I	N	Y	S	G	V	T	-	N	T		A	M	E	T	D	T	S	F	A
<i>P. pabuli</i> US-132	I	N	Y	G	G	V	I	-	N	T		A	M	E	T	D	T	S	F	A
<i>Bacillus</i> sp. 1011	I	N	Y	S	G	V	N	-	N	T		A	S	S	D	D	P	S	F	A
<i>Bacillus</i> sp. 38-2	I	N	Y	S	G	V	H	-	N	T		A	S	S	D	D	P	S	F	A
<i>T. thermosulfugenens</i> EM1	L	P	D	S	T	F	G	G	S	T		A	S	E	T	D	P	T	Y	A
<i>B. stearothermophilus</i> NO2	M	N	D	A	S	G	-	-	S	A		A	S	E	T	N	P	S	Y	M
<i>B. pseudocaliphilus</i> 20RF	H	P	S	G	-	-	-	-	Y	T		A	L	E	T	D	P	T	Y	A
<i>B. ohbensis</i>	H	P	S	G	-	-	-	-	Y	T		A	L	E	T	D	P	S	Y	A
<i>Br. brevis</i>	H	P	S	G	-	-	-	-	Y	T		A	L	E	T	N	P	N	Y	V
<i>B. clarkii</i> 7364	H	P	E	G	-	-	-	-	F	S		V	D	-	-	-	-	-	-	I
<i>Bacillus</i> sp. G-825-6	H	P	G	G	-	-	-	-	F	A		V	D	-	-	-	-	-	-	I

Участок 44-45. Локализация двух последовательно соединенных остатков серина (Ser44, Ser45) в домене A1 может влиять на локальную конформацию геометрии петли, замыкаемой дисульфидной связью, образованной двумя цистеинами (Cys43, Cys51). Для других ЦГТаз также свойственно наличие коротких повторов, содержащих два или три остатка серина в других позициях, тогда как у IB-739 данный гоморепит расположен около субсайта связывания субстрата (-3), мутации в котором приводят к изменению специфичности ЦГТазы. В частности, замены Arg47Leu и Arg47Gln в β -ЦГТазе *B. circulans* 251 привели к сдвигу в сторону образования γ -ЦД и сопутствующему снижению активности циклизации [van der Veen *et al.* 2000a]. Мутация His47Tyr в β/γ -ЦГТазе *Bacillus* sp. G1 привела к увеличению выхода γ -ЦД [Goh *et al.* 2009].

Петля 87-93. Область петли 87-93 с высокой вариабельностью обеспечивает взаимодействие с субстратом в субсайте -3 [Kelly *et al.* 2009]. Мутации проводимые в этой области влияют на специфичность образуемых продуктов. Было показано, что изменение ориентации углевода в субсайте -3 оказывает значительное влияние на положение углеводов в более отдаленных субсайтах [Uitdehaag *et al.* 1999]. Проведенные мутации в ЦГТазе *B. circulans* 251, в частности, Asn88Pro, удаление Tyr89, Val92, или Asn94 приведших к увеличению выхода β - и γ -ЦД, представлены в манускрипте как направляющие рекомендации по получению необходимого спектра циклических продуктов [Dijkhuizen *et al.* 1999] α - и β -ЦГТазы имеют последовательность IKYSGVN и INYSGVN соответственно; а последовательности HP(E/S/G)G- встречается в β/γ - и γ -ЦГТазах (рис. 5). Тот факт, что петли в γ -ЦГТазах короче, чем в других типах ЦГТаз, указывает на то, что для более высокого уровня γ -циклизирующей активности требуется больше места для связанной гликозильной цепи в этом участке [Hirano *et al.* 2006].

Исследуемая ЦГТаза IB-739 на участке 87-93 единственная содержит аминокислоту пролин в 90 позиции. У α -, α/β - и β -ЦГТаз в этой позиции находится серин, у β/γ - и γ -ЦГТаз – глицин. Мутации в ЦГТазе *B. circulans* 251 за счет удаления позиции 90 или замены Ser90Gly/Ser90Ala приводили к накоплению только β - и γ -ЦД, α -ЦД не образовывался [Dijkhuizen *et al.* 1999]. Пролин в позиции 90 блокирует -NH- основной цепи и нарушает водородные связи с предполагаемым углеводным фрагментом в субсайта -3. Таким образом, прослеживается конформационное сходство петли 83INYPGAN89 с укороченной петлей γ -ЦГТаз в субсайте -3, что может быть причиной наблюдаемого сдвига в специфичности размера ЦД. Также близкое родство с петлей алкалофильных β -ЦГТаз наглядно визуализируется на тепловой карте (рис. 4).

Петля 145-152. Участок, расположенный в субсайте -7 (остатки 145-152) в начале домена В, тоже связан со специфичностью ЦГТаз. Мутация участка 145-151 в β -ЦГТазе *B. circulans* 8, вызванная заменой одним остатком аспарагиновой кислоты, привела к увеличению выработки γ -ЦД из-за отсутствия специфических взаимодействий [Parsiegla *et al.* 1998]. Мутации Arg146Pro и Asp147Pro в α -ЦГТазе *P. macerans* JFB05-01 способствуют увеличению выработки α -ЦД и снижению образования β -ЦД [Wang *et al.* 2016].

Различия в специфичности продукта ЦГТаз вызваны вариабельностью мотива аминокислот, следующего за консервативным Pro143. В ЦГТазах, продуцирующих преимущественно β -ЦД, это либо ASSD (для алкалофильных *Bacillus* sp. 38-2, *Bacillus* sp. 1011, *B. circulans* 251), либо AMET (для нормофильных ЦГТаз), тогда как в термостабильных ЦГТазах, продуцирующих α - и β -ЦД (*T. thermosulfogenes* EM1 и *B. stearothermophilus* NO2), обнаруживается участок ASET, а в β/γ -ЦГТазах, продуцирующих мало или совсем не продуцирующих α -ЦД (*B. stearothermophilus* 20RF, *B. ohbensis*, *B. brevis* CD162) – ALET. γ -ЦГТаза полностью лишены остатков в этом регионе, участвующих в связывании субстрата. Для исследуемой ЦГТаза IB-739 на этом участке AMET, что относит его к нормофильным β -ЦГТазам, что подтверждается более высоким уровнем гомологии домена D на тепловой карте (рис. 4). При этом петля с мотивом 146METNTAFA153 является более жесткой, ввиду появления объёмного MET и создает локальный барьер в петле, меняя жесткость контура по сравнению с гибким участком SSDQ в петле ЦГТаза *B. circulans* 251, имеющей мотив 145SSDQPSFA152. Подобная жесткая петля ускоряет отщепление определенного числа глюкозных остатков, меняя преобладающий тип продукта и скорость циклизации [Uitdehaag *et al.* 1999].

Участок 392-393. Дуплеты LysLys (так называемые «лизиновые мостики») обладают высокой относительной доступностью (около 50%) на поверхности белковой глобулы и участвуют в структурной организации белка и формировании поверхности, взаимодействующей с субстратом [Rojas *et al.* 2019]. Ранее для ЦГТаза *T. thermosulfogenes* EM1 (содержащего 3 таких остатка) сообщалось, что наличия таких мотивов связано с термостабильностью фермента [Wind *et al.* 1995]. Однако позже была показана связь LysLys-мотивов со стабильностью ферментов, а не с его термостабильностью [Rojas *et al.* 2019]. В ЦГТазе *B. circulans* 251 обнаружены 2 таких дуплета, тогда как в IB-739 – 3, при этом фермент не обладает устойчивостью к повышенной температуре [Федорова *и др.* 2012]. Такие заряженные мотивы часто работают как «якоря», помогая стабилизировать третичную структуру фермента, компенсируя снижение гибкости за счёт образования дополнительных ионных связей (солевых мостиков) для поддержания устойчивости фермента в неблагоприятных условиях [Pedersen *et al.* 2019].

Участок 384-387. Наличие четырех последовательно соединенных остатков треонина в позициях (Thr384-387) в домене A2, расположенного около субсайта -3, на границе с доменом С, обладает высокой склонностью к образованию β -слоёв. Данный мотив из четырех треонинов в этой же позиции присутствует у алкалофильных β -ЦГТаз (*Bacillus* sp. 38-2, *Bacillus* sp. 1011). У *P. pabuli* US-132 и *B. clarkii* 7364 в этой позиции присутствует триплет из треонинов. Мотив из четырёх треонинов (TTTT) предпочтительнее мотива TSTT (*B. circulans* 251), т.к. поддержание стабильного «кармана» для удержания углевода вблизи сайта связывания мальтозы (MBS3) в домене С, требует устранения излишней гибкости петли/полипептидной цепи, а повышенная подвижность, вызванная остатком серина, может приводить к срыву правильной укладки или ослаблению сайта связывания [Centeno-Leija *et al.* 2022].

Участки 556-558, 570-571. В домене D между двумя β -листами для ЦГТаза IB-739 обнаружены триплет 556AAA558 и дуплет 570AA571 из остатков аланина. Наличие таких кодонов подряд усиливают гидрофобность участка цепи, что влияет на сворачивание белка, его взаимодействие с другими молекулами и стабильность [Makowska *et al.* 2008]. Для α -ЦГТаз (*P. macerans* IFO3490, *P. macerans* IB7) свойственно наличие дуплетов из остатков аланина в позиции 557-558, для β -ЦГТаз (*Bacillus* sp. 663, *P. pabuli* US-132) 557-558, для алкалофильных β - и β/γ -ЦГТаз (*Bacillus* sp. 38-2, *Bacillus* sp. 1011, *B. firmus* 37) 568-569 также находящихся в домене D. Домен D вариабельный по аминокислотному составу (рис. 4). Обильное наличие коротких аланиновых повторов, свойственное всем представленным ЦГТахам, может влиять на формирование поворотов в β -листовой структуре домена D. Подобные повторы создают участки с повышенной подвижностью, что критически важно для изменения направления цепи и обеспечения гибкости активного центра ферментов, связанных с правильным позиционированием домена E [Zhou *et al.* 2021].

Позиции 607, 625, 628. Присутствие метионина в позиции 607 (Met607) обеспечивает более высокую гибкость и гидрофобность белковой цепи домена Е по сравнению с валином (у α -, β/γ -, γ -ЦГТаз) и треонином (у нормофильных и алкалофильных β -ЦГТаз), оптимизируя структуру сайта MBS2 для эффективного связывания крахмала [Gastón *et al.* 2009]. Метионин обеспечивает оптимальный баланс гидрофобности, необходимой для связывания сахаров, и структурной гибкости, чего не могут дать более жесткий валин и полярный треонин.

Присутствие Leu625 и Lys628 характерно только для IB-739 из всей подборки ЦГТаз. У других в этих позициях на консервативном участке 622-629 находятся Met625 и Gln628. Мутации Met625Leu и Gln628Lys для ЦГТазы *B. circulans* 251 показали улучшение связывания субстрата и стабильности фермента по сравнению с диким типом [Dijkhuizen *et al.* 1999]. Leu625 обеспечивает плотную упаковку в гидрофобном кармане и правильную ориентацию сайта связывания мальтозы (MBS). Замена Met625 на более гидрофобный Leu625 обычно стабилизирует белок лучше, чем Met625.

Lys628 обеспечивает электростатические взаимодействия с молекулами субстрата (крахмала или ЦД) и участвует в стабилизации каталитического кармана. Напротив, Gln628 (как в ЦГТазе *B. circulans* 251) является нейтральным и не может обеспечить такое же сильное сродство, так как лизиновый «мостик» критически важен для удержания отрицательно заряженных участков сахаров [Rojas *et al.* 2019].

Таким образом, за специфичность ЦГТазы отвечает не вся петля целиком как жёсткая структура, а конкретные аминокислотные остатки внутри неё, которые формируют специфические водородные связи и/или электростатические взаимодействия с субстратом (глюкозидным остатком), что меняет геометрию субстрат-связывающего кармана, что в свою очередь, приводит к сдвигу соотношения синтеза α -, β - или γ -ЦД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования впервые был проведён анализ первичной структуры ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739, определены ближайшие гомологи в семействе ЦГТаз. Обнаруженные паттерны у исследуемой ЦГТазы IB-739, свойственные гликозилгидролазам *P. ehimensis*, локализованы практически во всех доменах и в каталитических A1, A2 и B, наиболее значимых для продуктивной специфичности у ЦГТаз. Все обнаруженные паттерны, в частности отличия в гибких петлях, приводящие к локальным конформационным изменениям (гибкость/жёсткость сегмента), усиливают тенденцию к определённой укладке полипептидной цепи и вносят свою лепту в общую функциональную работу исследуемого фермента, проявляющего свои уникальные каталитические свойства. Построение филогенетических деревьев различными методами, двумя подходами (безкорневые деревья и с внешней группой), выдающими похожую топологию с высокой бутстреп-поддержкой для ключевых кластеров, позволило достоверно подтвердить отдельную эволюционную историю, обоснованную обнаруженными структурными отличиями. Результаты проведенного структурного анализа архитектуры аминокислотной последовательности ЦГТазы IB-739, равно как и проведение молекулярного моделирования и сайт-направленного мутагенеза, послужат в дальнейшем раскрытию механизмов, лежащих в основе уникальных каталитических свойств фермента, а также созданию фермента с улучшенными каталитическими свойствами.

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

- Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Акуганов Г.Э., Усанов Н.Г. (2012) Очистка и свойства циклодекстринглюканотрансферазы из бактериального штамма *Paenibacillus ehimensis* ВКМ В-2680D (IB-739). *Биотехнология*. (4): 31–38. EDN: [PEMMIX](#)
- Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г. (2011) Сравнение кинетических свойств различных циклодекстринглюканотрансфераз. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 13(5–3): 203–206. EDN: [PFLHKB](#)

- Atanasova N., Kitayska T., Bojadjieva I., Yankov D., Tonkova A. (2011) A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process Biochemistry*. **46**(1): 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.027>
- Bikbulatova S.M., Chemeris A. V., Usanov N.G., Vakhitov V.A. (2000) Establishment of the phylogenetic relationships between the microbial producers of cyclodextrin glucanotransferases using complete amino acid sequences. *Microbiology*. **69**(5): 575–581. <https://doi.org/10.1007/BF02756811> EDN: LGHUCD
- Binder F., Huber O., Böck A. (1986) Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence and expression. *Gene*. **47**(2–3): 269–277. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90070-3)
- Centeno-Leija S., Espinosa-Barrera L., Velazquez-Cruz B., Cárdenas-Conejo Y., Virgen-Ortiz R., Valencia-Cruz G., Saenz R.A., Marín-Tovar Y., Gómez-Manzo S., Hernández-Ochoa B. et al. (2022) Mining for novel cyclomalto-dextrin glucanotransferases unravels the carbohydrate metabolism pathway via cyclodextrins in *Thermoanaerobacterales*. *Scientific Reports*. **12**(1): 730. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04569-x> EDN: HVNZPY
- Dijkhuizen L., Dijkstra B.W., Andersen C., von der Osten C. (1999) Cyclomalto-dextrin glucanotransferase variants. Patent № US 6004790 A.
- Doukyu N., Kuwahara H., Aono R. (2003) Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **67**(2): 334–340. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.334>
- Fujiwara S., Kakihara H., Sakaguchi K., Imanaka T. (1992) Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *Journal of Bacteriology*. **174**(22): 7478–7481. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7478-7481.1992>
- Gastón J.A.R., Szerman N., Costa H., Krymkiewicz N., Ferrarotti S.A. (2009) Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: Activity and kinetic studies. *Enzyme and Microbial Technology*. **45**(1): 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.04.002>
- Goh K.M., Mahadi N.M., Hassan O., Rahman R.N.Z.R.A., Illias R.M. (2009) A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **57**(1–4): 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.09.016>
- Goh P.H., Illias R.Md., Goh K.M. (2012) Rational mutagenesis of cyclodextrin glucanotransferase at the calcium binding regions for enhancement of thermostability. *International Journal of Molecular Sciences*. **13**(5): 5307–5323. <https://doi.org/10.3390/ijms13055307> EDN: PPMYFX
- Han R., Li J., Shin H., Chen R.R., Du G., Liu L., Chen J. (2014) Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnology Advances*. **32**(2): 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.004>
- Hill D.E., Aldape R., Rozzell J.D. (1990) Nucleotide sequence of a cyclodextrin glucosyltransferase gene, *cgt* A, from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Research*. **18**(1): 199–199. <https://doi.org/10.1093/nar/18.1.199> EDN: IUBEHJ
- Hirano K., Ishihara T., Ogasawara S., Maeda H., Abe K., Nakajima T., Yamagata Y. (2006) Molecular cloning and characterization of a novel γ -CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **70**(2): 193–201. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0041-7> EDN: KMYYSYH
- Itkor P., Tsukagoshi N., Udaka S. (1990) Nucleotide sequence of the raw-starch-digesting amylase gene from *Bacillus* sp. B1018 and its strong homology to the cyclodextrin glucanotransferase genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **166**(2): 630–636. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)90855-H](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)90855-H)
- Janecek Š., MacGregor E.A., Svensson B. (1995) Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from α -amylases. *Biochemical Journal*. **305**(2): 685–686. <https://doi.org/10.1042/bj3050685>
- Jemli S., Ben Messaoud E., Ben Mabrouk S., Bejar S. (2008) The cyclodextrin glycosyltransferase of *Paenibacillus pabuli* US132 strain: molecular characterization and overproduction of the recombinant enzyme. *BioMed Research International*. **2008**(1). <https://doi.org/10.1155/2008/692573>
- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A. et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596**(7873): 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2> EDN: GEXUCN

- Kato T., Horikoshi K. (1984) Immobilized cyclomalto-dextrin glucanotransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. No. 38-2. *Biotechnology and Bioengineering*. **26**(6): 595–598. <https://doi.org/10.1002/bit.260260606>
- Kelly R.M., Dijkhuizen L., Leemhuis H. (2009) The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **84**(1): 119–133. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1988-6> EDN: PAKAQQ
- Kelly R.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2007) Conversion of a cyclodextrin glucanotransferase into an α -amylase: assessment of directed evolution strategies. *Biochemistry*. **46**(39): 11216–11222. <https://doi.org/10.1021/bi701160h>
- Kim M.H., Sohn C.B., Oh T.K. (1998) Cloning and sequencing of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Brevibacillus brevis* CD162 and its expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **164**(2): 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13117.x> EDN: MNZZXR
- Kimura K., Kataoka S., Ishii Y., Takano T., Yamane K. (1987) Nucleotide sequence of the beta-cyclodextrin glucanotransferase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1011 and similarity of its amino acid sequence to those of alpha-amylases. *Journal of Bacteriology*. **169**(9): 4399–4402. <https://doi.org/10.1128/jb.169.9.4399-4402.1987>
- Klein C., Hollender J., Bender H., Schulz G.E. (1992) Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from x-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. **31**(37): 8740–8746. <https://doi.org/10.1021/bi00152a009>
- Klein C., Schulz G.E. (1991) Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. **217**(4): 737–750. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90530-J](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90530-J)
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. **35**(6): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096> EDN: NORMGO
- Kumar V. (2010) Analysis of the key active subsites of glycoside hydrolase 13 family members. *Carbohydrate Research*. **345**(7): 893–898. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.02.007>
- Lawson C.L., van Montfort R., Strokopytov B., Rozeboom H.J., Kalk K.H., de Vries G.E., Penninga D., Dijkhuizen L., Dijkstra B.W. (1994) Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *Journal of Molecular Biology*. **236**(2): 590–600. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1168>
- Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2003) Engineering of hydrolysis reaction specificity in the transglycosylase cyclodextrin glycosyltransferase. *Biocatalysis and Biotransformation*. **21**(4–5): 261–270. <https://doi.org/10.1080/10242420310001614333>
- Leemhuis H., Kelly R.M., Dijkhuizen L. (2010) Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **85**(4): 823–835. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2221-3> EDN: MYGXSBB
- 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
- Machovič M., Janeček Š. (2006) Starch-binding domains in the post-genome era. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **63**(23): 2710–2724. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6246-9> EDN: WMWRCL
- Makowska J., Bagińska K., Liwo A., Chmurzyński L., Scheraga H.A. (2008) Acidic-basic properties of three alanine-based peptides containing acidic and basic side chains: Comparison between theory and experiment. *Peptide Science*. **90**(5): 724–732. <https://doi.org/10.1002/bip.21046> EDN: LNOOHE
- Pardhi D.S., Rabadiya K.J., Panchal R.R., Raval V.H., Joshi R.G., Rajput K.N. (2023) Cyclodextrin glucanotransferase: fundamentals and biotechnological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **107**(19): 5899–5907. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12708-9> EDN: GVNFYI
- Parsiegla G., Schmidt A.K., Schulz G.E. (1998) Substrate binding to a cyclodextrin glycosyltransferase and mutations increasing the γ -cyclodextrin production. *European Journal of Biochemistry*. **255**(3): 710–717. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550710.x>
- Pedersen J.N., Zhou Y., Guo Z., Pérez B. (2019) Genetic and chemical approaches for surface charge engineering of enzymes and their applicability in biocatalysis: A review. *Biotechnology and Bioengineering*. **116**(7): 1795–1812. <https://doi.org/10.1002/bit.26979> EDN: IIVBKY
- 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
- Qi Q., Zimmermann W. (2005) Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **66**(5): 475–485. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1781-5> EDN: MCGGVR

- 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
- Rimphanitchayakit V., Tonozuka T., Sakano Y. (2005) Construction of chimeric cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus circulans* A11 and *Paenibacillus macerans* IAM1243 and analysis of their product specificity. *Carbohydrate Research*. **340**(14): 2279–2289. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.07.013>
- Rojas M.J., Amaral-Fonseca M., Zanin G.M., Fernandez-Lafuente R., Giordano R. de L.C., Tardioli P.W. (2019) Preparation of crosslinked enzyme aggregates of a thermostable cyclodextrin glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. critical effect of the crosslinking agent. *Catalysts*. **9**(2): 120. <https://doi.org/10.3390/catal9020120>
- 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**(1–2): 65–93. <https://doi.org/10.1007/s10847-025-01323-y> EDN: VLFMNB
- Sharma P., Mondal K., Tamang S., Kumar S., Najar I.N., Das S., Mondal K.C., Thakur N. (2026) A novel and thermostable cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Anoxybacillus rupiensis* PSO2 isolated from Yumthang hot spring: cloning and functional characterisation. *Enzyme and Microbial Technology*. **197**: 110840. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2026.110840>
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J. et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. **7**(1): MSB201175. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75> EDN: GHXFOX
- Sin K.-A., Nakamura A., Kobayashi K., Masaki H., Uozumi T. (1991) Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **35**(5). <https://doi.org/10.1007/BF00169623> EDN: DZXGUS
- Sonnendecker C., Zimmermann W. (2019) Domain shuffling of cyclodextrin glucanotransferases for tailored product specificity and thermal stability. *FEBS Open Bio*. **9**(2): 384–395. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12588> EDN: RBEQUL
- Takada M., Nakagawa Y., Yamamoto M. (2003) Biochemical and genetic analyses of a novel γ -cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *Journal of Biochemistry*. **133**(3): 317–324. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg043> EDN: IRBXKZ
- Uitdehaag J.C.M., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen L., Dijkstra B.W. (1999) The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. **274**(49): 34868–34876. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34868>
- van der Veen B.A., Uitdehaag J.C.M., Dijkstra B.W., Dijkhuizen L. (2000a) The role of arginine 47 in the cyclization and coupling reactions of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *European Journal of Biochemistry*. **267**(12): 3432–3441. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01353.x> EDN: EUCPZY
- van der Veen B.A., Uitdehaag J.C.M., Penninga D., van Alebeek G.-J.W.M., Smith L.M., Dijkstra B.W., Dijkhuizen L. (2000b) Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *Journal of Molecular Biology*. **296**(4): 1027–1038. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3528> EDN: KFOBIB
- Wang L., Duan X., Wu J. (2016) Enhancing the α -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* by mutagenesis masking subsite –7. *Applied and Environmental Microbiology*. **82**(8): 2247–2255. <https://doi.org/10.1128/AEM.03535-15>
- Wind R.D., Liebl W., Buitelaar R.M., Penninga D., Spreinat A., Dijkhuizen L., Bahl H. (1995) Cyclodextrin formation by the thermostable α -amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(4): 1257–1265. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1257-1265.1995>
- Xie T., Song B., Yue Y., Chao Y., Qian S. (2014) Site-saturation mutagenesis of central tyrosine 195 leading to diverse product specificities of an α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. 602-1. *Journal of Biotechnology*. **170**: 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.032>

- Zhang S., He Z., Wang H., Zhai J. (2025) Signal peptides: From molecular mechanisms to applications in protein and vaccine engineering. *Biomolecules*. **15**(6): 897. <https://doi.org/10.3390/biom15060897> EDN: MYUDGU
- Zhou J., Feng Z., Liu S., Wei F., Shi Y., Zhao L., Huang W., Zhou Y., Feng H., Zhu H. (2021) CGTase, a novel antimicrobial protein from *Bacillus cereus* YUPP-10, suppresses *Verticillium dahliae* and mediates plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*. **22**(1): 130–144. <https://doi.org/10.1111/mpp.13014> EDN: HERUME
- Zuo F., Su L., Kong D., Wang L., Wu J., Chen S. (2022) Molecular modification of *Bacillus stearothermophilus* NO₂ cyclodextrin glucosyltransferase and preparation of α -cyclodextrin. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. **2**(4): 695–704. <https://doi.org/10.1007/s43393-022-00099-3> EDN: FLVPKT

REFERENCES

- Fedorova P.Yu., Gil'vanova E.A., Aktuganov G.E., Usanov N.G. (2012) Isolation and properties of cyclodextrin glucanotransferase from a *Paenibacillus ehimensis* VKM B-2680D (IB-739) bacteria strain. *Biotechnology in Russia*. (4): 31–38. EDN: PEMMIX (in Russian)
- Fedorova P.Y., Gilvanova E.A., Usanov N.G. (2011) Cyclodextrin glycosyltransferases of different *Paenibacillus* species. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. **13**(5–3): 203–206. EDN: PFLHKB (in Russian)
- Atanasova N., Kitayska T., Bojadjieva I., Yankov D., Tonkova A. (2011) A novel cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 20RF: Purification and properties. *Process Biochemistry*. **46**(1): 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.027>
- Bikbulatova S.M., Chemeris A. V., Usanov N.G., Vakhitov V.A. (2000) Establishment of the phylogenetic relationships between the microbial producers of cyclodextrin glucanotransferases using complete amino acid sequences. *Microbiology*. **69**(5): 575–581. <https://doi.org/10.1007/BF02756811> EDN: LGHUCD
- Binder F., Huber O., Böck A. (1986) Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence and expression. *Gene*. **47**(2–3): 269–277. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90070-3)
- Centeno-Leija S., Espinosa-Barrera L., Velazquez-Cruz B., Cárdenas-Conejo Y., Virgen-Ortiz R., Valencia-Cruz G., Saenz R.A., Marín-Tovar Y., Gómez-Manzo S., Hernández-Ochoa B. *et al.* (2022) Mining for novel cyclomaltodextrin glucanotransferases unravels the carbohydrate metabolism pathway via cyclodextrins in *Thermoanaerobacterales*. *Scientific Reports*. **12**(1): 730. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04569-x> EDN: HVNZPY
- Dijkhuizen L., Dijkstra B.W., Andersen C., von der Osten C. (1999) Cyclomaltodextrin glucanotransferase variants. Patent № US 6004790 A.
- Doukyu N., Kuwahara H., Aono R. (2003) Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin glucanotransferase resistant to organic solvents. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **67**(2): 334–340. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.334>
- Fujiwara S., Kakiwara H., Sakaguchi K., Imanaka T. (1992) Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *Journal of Bacteriology*. **174**(22): 7478–7481. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7478-7481.1992>
- Gastón J.A.R., Szyman N., Costa H., Krymkiewicz N., Ferrarotti S.A. (2009) Cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: Activity and kinetic studies. *Enzyme and Microbial Technology*. **45**(1): 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.04.002>
- Goh K.M., Mahadi N.M., Hassan O., Rahman R.N.Z.R.A., Illias R.M. (2009) A predominant β -CGTase G1 engineered to elucidate the relationship between protein structure and product specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **57**(1–4): 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.09.016>
- Goh P.H., Illias R.M., Goh K.M. (2012) Rational mutagenesis of cyclodextrin glucanotransferase at the calcium binding regions for enhancement of thermostability. *International Journal of Molecular Sciences*. **13**(5): 5307–5323. <https://doi.org/10.3390/ijms13055307> EDN: PPMYFX
- Han R., Li J., Shin H., Chen R.R., Du G., Liu L., Chen J. (2014) Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnology Advances*. **32**(2): 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.004>
- Hill D.E., Aldape R., Rozzell J.D. (1990) Nucleotide sequence of a cyclodextrin glucosyltransferase gene, *cgt A*, from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Research*. **18**(1): 199–199. <https://doi.org/10.1093/nar/18.1.199> EDN: IUBEHI

- Hirano K., Ishihara T., Ogasawara S., Maeda H., Abe K., Nakajima T., Yamagata Y. (2006) Molecular cloning and characterization of a novel γ -CGTase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **70**(2): 193–201. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0041-7> EDN: KMYYSH
- Itkor P., Tsukagoshi N., Uda S. (1990) Nucleotide sequence of the raw-starch-digesting amylase gene from *Bacillus* sp. B1018 and its strong homology to the cyclodextrin glucanotransferase genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **166**(2): 630–636. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)90855-H](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)90855-H)
- Janecek Š., MacGregor E.A., Svensson B. (1995) Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from α -amylases. *Biochemical Journal*. **305**(2): 685–686. <https://doi.org/10.1042/bj3050685>
- Jemli S., Ben Messaoud E., Ben Mabrouk S., Bejar S. (2008) The cyclodextrin glycosyltransferase of *Paenibacillus pabuli* US132 strain: molecular characterization and overproduction of the recombinant enzyme. *BioMed Research International*. **2008**(1). <https://doi.org/10.1155/2008/692573>
- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A. et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596**(7873): 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2> EDN: GEXUCN
- Kato T., Horikoshi K. (1984) Immobilized cyclomaltodextrin glucanotransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. No. 38-2. *Biotechnology and Bioengineering*. **26**(6): 595–598. <https://doi.org/10.1002/bit.260260606>
- Kelly R.M., Dijkhuizen L., Leemhuis H. (2009) The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **84**(1): 119–133. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1988-6> EDN: PAKAQQ
- Kelly R.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2007) Conversion of a cyclodextrin glucanotransferase into an α -amylase: assessment of directed evolution strategies. *Biochemistry*. **46**(39): 11216–11222. <https://doi.org/10.1021/bi701160h>
- Kim M.H., Sohn C.B., Oh T.K. (1998) Cloning and sequencing of a cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Brevibacillus brevis* CD162 and its expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. **164**(2): 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13117.x> EDN: MNZZXR
- Kimura K., Kataoka S., Ishii Y., Takano T., Yamane K. (1987) Nucleotide sequence of the beta-cyclodextrin glucanotransferase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1011 and similarity of its amino acid sequence to those of alpha-amylases. *Journal of Bacteriology*. **169**(9): 4399–4402. <https://doi.org/10.1128/jb.169.9.4399-4402.1987>
- Klein C., Hollender J., Bender H., Schulz G.E. (1992) Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from x-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. **31**(37): 8740–8746. <https://doi.org/10.1021/bi00152a009>
- Klein C., Schulz G.E. (1991) Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. **217**(4): 737–750. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90530-J](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90530-J)
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. **35**(6): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096> EDN: NORMGQ
- Kumar V. (2010) Analysis of the key active subsites of glycoside hydrolase 13 family members. *Carbohydrate Research*. **345**(7): 893–898. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.02.007>
- Lawson C.L., van Montfort R., Strokopytov B., Rozeboom H.J., Kalk K.H., de Vries G.E., Penninga D., Dijkhuizen L., Dijkstra B.W. (1994) Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *Journal of Molecular Biology*. **236**(2): 590–600. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1168>
- Leemhuis H., Dijkhuizen L. (2003) Engineering of hydrolysis reaction specificity in the transglycosylase cyclodextrin glycosyltransferase. *Biocatalysis and Biotransformation*. **21**(4–5): 261–270. <https://doi.org/10.1080/10242420310001614333>
- Leemhuis H., Kelly R.M., Dijkhuizen L. (2010) Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **85**(4): 823–835. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2221-3> EDN: MYGXSB
- 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
- Machovič M., Janeček Š. (2006) Starch-binding domains in the post-genome era. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **63**(23): 2710–2724. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6246-9> EDN: WMWRCL

- Makowska J., Bagińska K., Liwo A., Chmurzyński L., Scheraga H.A. (2008) Acidic-basic properties of three alanine-based peptides containing acidic and basic side chains: Comparison between theory and experiment. *Peptide Science*. **90**(5): 724–732. <https://doi.org/10.1002/bip.21046> EDN: LNOOHF
- Pardhi D.S., Rabadiya K.J., Panchal R.R., Raval V.H., Joshi R.G., Rajput K.N. (2023) Cyclodextrin glucanotransferase: fundamentals and biotechnological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **107**(19): 5899–5907. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12708-9> EDN: GVNFI
- Parsiegla G., Schmidt A.K., Schulz G.E. (1998) Substrate binding to a cyclodextrin glycosyltransferase and mutations increasing the γ -cyclodextrin production. *European Journal of Biochemistry*. **255**(3): 710–717. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550710.x>
- Pedersen J.N., Zhou Y., Guo Z., Pérez B. (2019) Genetic and chemical approaches for surface charge engineering of enzymes and their applicability in biocatalysis: A review. *Biotechnology and Bioengineering*. **116**(7): 1795–1812. <https://doi.org/10.1002/bit.26979> EDN: IIVBKY
- 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
- Qi Q., Zimmermann W. (2005) Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **66**(5): 475–485. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1781-5> EDN: MCGGVR
- 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
- Rimphanitchayakit V., Tonoizuka T., Sakano Y. (2005) Construction of chimeric cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus circulans* A11 and *Paenibacillus macerans* IAM1243 and analysis of their product specificity. *Carbohydrate Research*. **340**(14): 2279–2289. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.07.013>
- Rojas M.J., Amaral-Fonseca M., Zanin G.M., Fernandez-Lafuente R., Giordano R. de L.C., Tardioli P.W. (2019) Preparation of crosslinked enzyme aggregates of a thermostable cyclodextrin glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. critical effect of the crosslinking agent. *Catalysts*. **9**(2): 120. <https://doi.org/10.3390/catal9020120>
- 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**(1–2): 65–93. <https://doi.org/10.1007/s10847-025-01323-y> EDN: VLFMNB
- Sharma P., Mondal K., Tamang S., Kumar S., Najar I.N., Das S., Mondal K.C., Thakur N. (2026) A novel and thermostable cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Anoxybacillus rupiensis* PSO2 isolated from Yumthang hot spring: cloning and functional characterisation. *Enzyme and Microbial Technology*. **197**: 110840. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2026.110840>
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J. et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. **7**(1): MSB201175. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75> EDN: GHXFOX
- Sin K.-A., Nakamura A., Kobayashi K., Masaki H., Uozumi T. (1991) Cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **35**(5). <https://doi.org/10.1007/BF00169623> EDN: DZXGUS
- Sonnendecker C., Zimmermann W. (2019) Domain shuffling of cyclodextrin glucanotransferases for tailored product specificity and thermal stability. *FEBS Open Bio*. **9**(2): 384–395. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12588> EDN: RBEQUL
- Takada M., Nakagawa Y., Yamamoto M. (2003) Biochemical and genetic analyses of a novel γ -cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *Journal of Biochemistry*. **133**(3): 317–324. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg043> EDN: IRBXKZ
- Uitdehaag J.C.M., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen L., Dijkstra B.W. (1999) The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. **274**(49): 34868–34876. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34868>
- van der Veen B.A., Uitdehaag J.C.M., Dijkstra B.W., Dijkhuizen L. (2000a) The role of arginine 47 in the cyclization and coupling reactions of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*

- strain 251. *European Journal of Biochemistry*. **267**(12): 3432–3441. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01353.x> EDN: EUCPZY
- van der Veen B.A., Uitdehaag J.C.M., Penninga D., van Alebeek G.-J.W.M., Smith L.M., Dijkstra B.W., Dijkhuizen L. (2000b) Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *Journal of Molecular Biology*. **296**(4): 1027–1038. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3528> EDN: KFOBIB
- Wang L., Duan X., Wu J. (2016) Enhancing the α -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* by mutagenesis masking subsite –7. *Applied and Environmental Microbiology*. **82**(8): 2247–2255. <https://doi.org/10.1128/AEM.03535-15>
- Wind R.D., Liebl W., Buitelaar R.M., Penninga D., Spreinat A., Dijkhuizen L., Bahl H. (1995) Cyclodextrin formation by the thermostable alpha-amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**(4): 1257–1265. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1257-1265.1995>
- Xie T., Song B., Yue Y., Chao Y., Qian S. (2014) Site-saturation mutagenesis of central tyrosine 195 leading to diverse product specificities of an α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. 602-1. *Journal of Biotechnology*. **170**: 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.032>
- Zhang S., He Z., Wang H., Zhai J. (2025) Signal peptides: From molecular mechanisms to applications in protein and vaccine engineering. *Biomolecules*. **15**(6): 897. <https://doi.org/10.3390/biom15060897> EDN: MYUDGU
- Zhou J., Feng Z., Liu S., Wei F., Shi Y., Zhao L., Huang W., Zhou Y., Feng H., Zhu H. (2021) CGTase, a novel antimicrobial protein from *Bacillus cereus* YUPP-10, suppresses *Verticillium dahliae* and mediates plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*. **22**(1): 130–144. <https://doi.org/10.1111/mpp.13014> EDN: HERUME
- Zuo F., Su L., Kong D., Wang L., Wu J., Chen S. (2022) Molecular modification of *Bacillus stearothermophilus* NO₂ cyclodextrin glucosyltransferase and preparation of α -cyclodextrin. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. **2**(4): 695–704. <https://doi.org/10.1007/s43393-022-00099-3> EDN: FLVPKT

Цитировать как

Гильванова Е.А., Мильман П.Ю., Усанов Н.Н. (2026). Анализ структурного паттерна циклодекстрин глюканотрансферазы *Paenibacillus ehimensis* IB-739. *Экобиотех*. **9**(3): 365-383. DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-28> EDN: <https://www.elibrary.ru/lmjomq>

Cited as

Gilvanova E.A., Milman P.Yu., Usanov N.N. (2026). Analysis of the structural pattern of cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus ehimensis* IB-739. *Ecobiotech*. **9**(3): 365-383. DOI: <http://doi.org/10.31163/2618-964X/2026-28> EDN: <https://www.elibrary.ru/lmjomq>

Сведения об авторах

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.

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.

Николай Николаевич Усанов, химик, старший инженер технической поддержки, АО «Лаборатория Касперского», Москва, Россия. E-mail: Unn.eimb@gmail.com, ORCID: 0009-0006-5831-2455.

Information About the Authors

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.

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.

Nikolai N. Usanov, chemist, senior technical support engineer, Kaspersky Lab JSC, Moscow, Russia. E-mail: Unn.eimb@gmail.com, ORCID: 0009-0006-5831-2455.