



ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ЦИКЛОМАЛЬТОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ

¹Баймиев Ан.Х., ²Гильванова Е.А., ²Мильман П.Ю., ¹Матниязов Р.Т., ¹Баймиев Ал.Х.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра

Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября, 71, E-mail: baymiev@anrb.ru

²Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября, 69,

Резюме

Исследования циклических олигосахаридов из шести, семи и восьми остатков глюкозы, обозначаемых как альфа-, бета- и гамма-циклодекстрины соответственно, и всего что с ними связано насчитывают уже 130 лет. В данном обзоре кратко рассмотрена история изучения этих молекул. Интерес к циклодекстринам вызван их способностью образовывать комплексы включения с целым рядом органических и неорганических соединений, кардинально меняя некоторые их свойства, что находит широкое применение в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, причем бета-циклодекстрин даже зарегистрирован в качестве пищевой добавки E459. Получают циклодекстрины из крахмала под действием ферментов циклодекстринглюканотрансфераз (ЦГТаз), характерной особенностью которых является не строгая специфичность их действия по отношению к типам продуцируемых олигосахаридов. Основными продуцентами этих ферментов является группа бактерий порядка Bacillales, объединяющего несколько семейств (Paenibacillaceae, Bacillaceae, Thermoactinomicetaceae и др.), однако в последние годы ЦГТазы найдены у широкого круга бактерий и архей. Генетическая инженерия ЦГТаз началась в середине 1980-х гг., после того как впервые был клонирован и секвенирован ген ЦГТазы из *Paenibacillus macerans* (бывший вид *Bacillus macerans*) и за это время достигнут довольно заметный прогресс в понимании организации и функционирования этих ферментов в том числе с использованием рентгеноструктурного анализа. С помощью сайт-направленного мутагенеза, склонной к ошибкам ПЦР, а также путем создания химерных форм этих ферментов в последние десятилетия достигнуты определенные успехи в изменении (улучшении) специфичности их действия. Для повышения синтеза и секреции генно-инженерных ЦГТаз используются подходящие лидерные пептиды, а также предложены различные гетерологичные продуценты, включая бактерии *Escherichia coli*, *B.subtilis*, *Lactococcus lactis* метилотрофные дрожжи *Koagataella phaffii*.

Ключевые слова: Цикломальтодекстринглюканотрансфераза, ЦГТазы, ген, секвенирование, циклодекстрин, крахмал, штамм-продуцент

Цитирование: Баймиев Ан.Х., Гильванова Е.А., Мильман П.Ю., Матниязов Р.Т., Баймиев Ал.Х. Генно-инженерные цикломальтодекстринглюканотрансферазы // *Biomics*. 2021. Т.13(2). С. 138-152.

DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-10

© Авторы

GENETIC ENGINEERING OF CYCLOMALTODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASES

¹Baymiev An.Kh., ²Gilvanova E.A., ²Milman P.Yu., ¹Matniyazov R.T., ¹Baymiev Al.Kh.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia, E-mail: baymiev@anrb.ru

²Ufa Institute of Biology of Ufa Federal Research Centre of Russian Academy of Sciences, 69 Prospekt Oktyabra, Ufa, 450054, Russia

Resume

Studies of cyclic oligosaccharides from six, seven and eight glucose residues, designated as alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins, respectively, and everything related to them have been going on for 130 years. In this review, the history of the study of these molecules is briefly considered. The interest in cyclodextrins is caused by their ability to form inclusion complexes with a number of organic and inorganic compounds, radically changing some of their properties. This is widely used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries, and beta-cyclodextrin is even registered as a food additive E459. Cyclodextrins are obtained from starch under the action of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) enzymes, a characteristic feature of which is their non-strict specificity in relation to the types of oligosaccharides produced. The main producers of these enzymes are a group of bacteria of the order Bacillales, which unites several families (Paenibacillaceae, Bacillaceae, Thermoactinomycetaceae, etc.), but in last years CGTases have been found in a wide range of bacteria and archaea. The genetic engineering of CGTases began in the middle of 1980s, after the CGTase gene from *Paenibacillus macerans* (formerly *Bacillus macerans*) was cloned and sequenced for the first time, and during this period rather noticeable progress was made in understanding the organization and functioning of these enzymes, including using X-ray diffraction analysis. With the help of site-directed mutagenesis, error-prone PCR, as well as by creating chimeric forms of these enzymes, certain successes have been achieved in recent decades in changing (improving) the specificity of their action. Suitable leader peptides are used to increase the synthesis and secretion of genetically engineered CGTases, and various heterologous producers are also proposed, including the bacteria *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *Lactococcus lactis* and the methylotrophic yeast *Koagataella phaffii*.

Keywords: Cyclomaltodextrin glucanotransferase, CGTase, gene, sequencing, cyclodextrin, starch, producer strain

Citation: Baymiev An.Kh., Gilvanova E.A., Milman P.Yu., Matniyazov R.T., Baymiev Al.Kh. Genetic engineering of cyclomaltodextrin glucanotransferases. *Biomics*. 2021. V.13(2). P. 138-152. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-10

© The Authors

Введение

Циклодекстрины представляют собой циклические олигомеры глюкозы в виде остатков D-(+)-глюкопиранозы, объединенные в макроциклы α -D-1,4-гликозидными связями, образующимися под действием специфических ферментов некоторых видов бактерий. Интерес к этим молекулам вызван их способностью образовывать комплексы включения с различными органическими и неорганическими соединениями, в том числе даже с газами, где сам циклодекстрин служит «хозяином», а включенное вещество выступает «гостем». При таком комплексообразовании заметно меняются свойства гостевых соединений. В частности, нерастворимые в воде вещества, приобретают условную растворимость, становясь при этом более устойчивыми к действию УФ-лучей, окислению и гидролизу. Благодаря этим свойствам циклодекстрины находят широкое применение, в первую очередь в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, а бета-циклодекстрин даже зарегистрирован в качестве пищевой добавки E459. Циклодекстрины имеют хорошие перспективы использования и в других отраслях промышленности, включая очистку воды и добычу нефти.

В настоящее время мировое потребление циклодекстринов измеряется десятками тысяч тонн, доступных по относительно низким ценам, но оно может значительно возрасти при еще большем

снижении себестоимости их производства. Для этого необходимо совершенствовать технологию их получения, ключевым звеном которой является специфический фермент цикломальтодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаз), нарабатываемая некоторыми видами бактерий. И тут существуют два пути в виде поиска новых микроорганизмов, несущих ЦГТазы с отличающимися свойствами или создания с помощью генной инженерии новых ферментов с улучшенными свойствами и получения на их основе рекомбинантных штаммов-продуцентов с увеличенной наработкой данных ферментов. Причем оба пути не отрицают один другого, но в данном обзоре, помимо небольшого исторического экскурса и краткой информации о структурной организации основных циклодекстринов, будут рассмотрены именно генно-инженерные ЦГТазы, при этом внимание будет уделено лишь работам последних лет, появившимся после выхода замечательного обзора группы авторов [Han et al., 2014], подготовленном на основе без малого полутора сотен процитированных публикаций и в котором проведена систематизация буквально всех достижений в этой области на момент его написания, включающая молекулярную биоинженерию ЦГТаз, осуществляемую с помощью целого ряда подходов, а также вопросы гетерологичной экспрессии генов ЦГТаз для создания суперпродуцентов этих ферментов. К слову сказать,

ЦГТазы, наряду с амилазами, липазами, протеазами и некоторыми другими ферментами, относятся к группе так называемых промышленных ферментов.

Циклодекстрины

Поскольку ЦГТазы не строго специфичны к сайту гидролиза крахмала, то конечный продукт представляет собой смесь различных циклодекстринов и линейных олигосахаридов разной длины в различных пропорциях, что зависит как от свойств самого фермента, так и от длительности его воздействия на субстрат. Известны три основных типа

циклодекстринов: α -, β - и γ -, состоящих из 6-ти, 7-ми и 8-ми остатков глюкозы, соответственно (рис.1.). Здесь нужно заметить, что циклодекстрины с числом остатков глюкозы менее шести невозможны в силу стерических ограничений, что отражено и в 6-ти кратном характере крахмальной спирали, тогда как циклодекстрины, содержащие большее их число, не образуют аналогичного тора с единой внутренней полостью, который и является главной ценностью данных молекул.

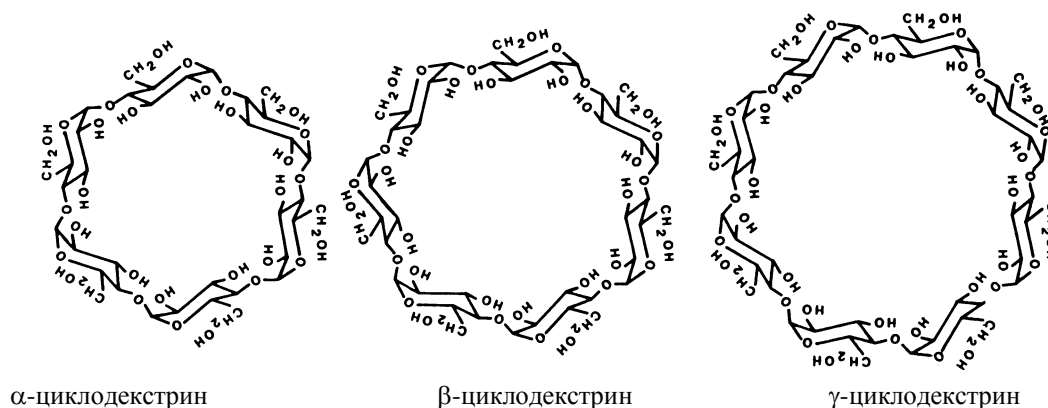


Рис 1. Схема расположения остатков глюкозы в макроцикле

Fig. 1. The scheme of the localization of glucose residues in the macrocycle

Остатки D-(+)-глюкопиранозы в молекуле циклодекстринов соединены между собой α -1,4-связями (рис. 2.) и находятся в классической конформации в виде кресла, что придает циклодекстринам тороидальную форму обрубленного конуса с широкой стороной, формируемой вторичными 2- и 3-гидроксильными группами, а первичные 6-гидроксильные группы ответственны за узкую часть тора молекулы циклодекстрина.

Количество глюкозных остатков определяет как внешние параметры молекулы циклодекстрина, так и размер его внутренней полости. Полость циклодекстриновой молекулы выстлана водородными атомами и гликозидными кислородными мостиками. Несвязанные электронные пары гликозидных кислородных мостиков, направленные внутрь полости, образуют область высокой электронной плотности. В результате такой специфической локализации функциональных групп в молекуле циклодекстрина полость оказывается относительно гидрофобной, а внешняя поверхность – гидрофильной. В циклодекстриновой молекуле кольцо водородных связей, формирующихся интрамолекулярно между 2- и 3-гидроксильными группами соседних глюкозных остатков, обеспечивает циклодекстринам весьма прочные жесткие структуры.

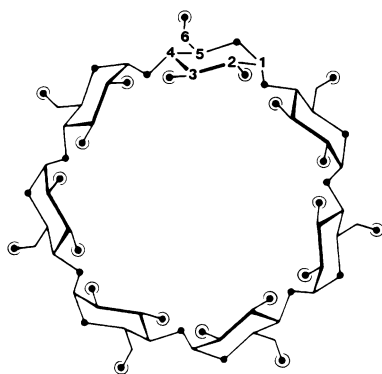


Рис. 2. Схема образования α -(1,4)-связей в циклодекстринах

Fig. 2. Scheme of formation of alpha-(1,4)-bonds in cyclodextrins

Все циклодекстрины имеют одинаковую высоту тороидальной молекулы равную 0,79 нм, но отличаются внешними размерами, а также размерами своей полости. Так, α -циклодекстрин, состоящий из 6-ти остатков глюкозы имеет молекулярную массу 972 Дальтона и характеризуется внешним размером равным 1,46 нм в диаметре, а внутренняя полость имеет диаметр 0,50 нм. Для β -циклодекстрина, состоящего из 7-ми глюкозных остатков и имеющего молекулярную массу равную 1135 Дальтон, эти

размеры составляют 1,54 и 0,62 нм. Молекулярная масса 8-ми остатков глюкозы γ -циклодекстрина равна 1297 Дальтон, а его внешний и внутренний размеры составляют 1,75 и 0,79 нм, соответственно (рис. 3.).

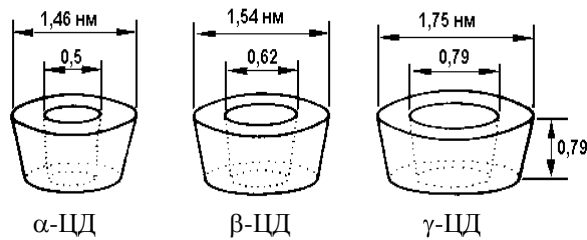


Рис. 3. Размеры молекул циклодекстринов (пояснения в тексте)

Fig. 3. Sizes of cyclodextrin molecules (explanations in the text)

За счет своей гидрофильной внешней поверхности циклодекстрины являются водорастворимыми веществами с разной степенью растворимости, которая для α -, β - и γ -циклодекстринов при 20°C в 100 мл воды составляет 14,5; 1,85 и 23,2 г соответственно.

Внутренние полости различных циклодекстринов до некоторой степени предопределяют их применение, поскольку «гостями» в них могут быть молекулы соответствующих размеров и в этой связи для производственных целей желательно иметь ферменты с увеличенной специфичностью по отношению к тому или иному типу циклодекстринов. При этом γ -циклодекстрины, обладающие наиболее крупной полостью, как правило, продуцируются в гораздо меньшем количестве по сравнению с α - и β -циклодекстринами, что вылилось в их более позднее обнаружение (см. ниже) и поэтому, помимо генно-инженерных манипуляций, направленных на некоторое изменение специфичности действия различных ЦГТаз, ведется и целенаправленный поиск новых бактериальных продуцентов ферментов с преимущественной наработкой γ -циклодекстринов [Li et al., 2007; Goo et al., 2014], в том числе и отечественными авторами [Гильванова, Мильман, 2015].

Немного истории

Циклодекстрины впервые были обнаружены в 1891 г. во Франции при исследовании продуктов метаболизма бактерий *Bacillus amylobacter* M.A.Villiers [1891], описавших эти соединения кристаллических декстринов под названием cellulose. Однако уже тогда известный микробиолог R.Koch высказал предположение, что используемая Villiers культура содержала примесь другой бациллы

*B.macerans*¹ [Crini, 2014] и к этому обстоятельству мы еще вернемся. Но наибольший вклад в те годы в исследования циклодекстринов внес немецкий ученый Ф.Шардингер (F.Schardinger), в честь которого эти молекулы длительное время (вплоть до 1970-х гг.) преимущественно назывались декстринами Шардингера. При этом их называли также просто декстринами, циклоамилозами, цикломальтоолигосахаридами. Циклодекстринами их стали называть с «легкой руки» другого немецкого ученого F.Cramer только с начала 1950-х гг. [Cramer, 1951; 1952]. Возвращаясь к Шардингеру, следует отметить, что в 1903 г. им была опубликована большая статья, в которой подробно описано соединение, как отметил сам автор, похожее на cellulose [Schardinger, 1903]; определив позже, что микроорганизм его продуцирующий является *Bacillus macerans* [Schardinger, 1904]. Причем выход целевого продукта «в руках» Шардингера оказался выше на порядок, чем у Villiers, что как раз можно объяснить нечистой бактериальной культурой, используемой последним. В период с 1903 по 1911 гг. Шардингером проведен большой цикл исследований этих соединений, в ходе которых им было предположено, что эти соединения могут иметь кольцевую структуру². Эти его исследования завершились тем, что в 1911 г. он счел нужным переименовать cellulose в α -dextrine и β -dextrine³ [Schardinger, 1911]. В той же статье в заключении Шардингер написал, что «он, понимая, что еще очень много вопросов с декстринами остается нерешенными, тем не менее, им принято решение не продолжать больше их исследования, надеясь, что это сделают другие⁴». Действительно циклодекстрины не остались без внимания, как в Европе, так и за океаном.

Долгое время декстрины Шардингера получали в результате воздействия на крахмал ферментного препарата из культуральной жидкости *B.macerans*, но в начале 1940-х гг. стали появляться работы, направленные на выделение и очистку фермента, называемого *macerans amylase* [Tilden, Hudson, 1942; Tilden et al., 1942a]. Позже было описано выделение того же фермента, названного как

¹ Спустя 90 лет было предложено для ряда бацилл организовать новый род *Paenibacillus* [Ash et al., 1993] и сейчас бактерия *Bacillus macerans* классифицирована как *Paenibacillus macerans*.

² Кольцевая структура декстринов Шардингера оказалось подтвержденной только через 40 лет [Freudenberg, Cramer, 1950].

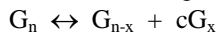
³ γ -dextrine был открыт только в 1948 г. [Freudenberg, Cramer, 1948].

⁴ Дано здесь в несколько вольном сокращенном переводе.

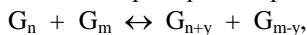
Schardinger dextrinogenase [Schwimmer, 1953]. Пожалуй, одним из первых упоминаний уже о cyclodextrin transglycosylase стала публикация в 4-ом томе серии Methods in Enzymology [French, 1962]. Впоследствии другие авторы назвали этот фермент cyclodextrin transglucosidase [Thoma et al., 1965]. Только во второй половине 1970-х гг. в литературе стало появляться современное обозначение этого фермента как cyclodextrin glycosyltransferase [Kitahata, Okada, 1976]. Приблизительно в то же время можно было встретить его упоминание как cyclodextrin glucanotransferase [Kobayashi et al., 1978]. В настоящее время, задав с этими словами «cyclodextrin glycosyltransferase» и «cyclodextrin glucanotransferase» поиск в PubMed можно найти чуть более 500 публикаций для этих вариантов, которые фактически равноправно сосуществуют.

Активное изучение механизма действия ЦГТаз позволило прийти к мнению, что данные ферменты относятся к подклассу гликозилтрансфераз и катализируют реакцию образования невосстанавливающих циклических олигосахаридов (рис. 4). Серия работ, посвященных исследованию каталитических функций ЦГТаз из микроорганизма *Klebsiella pneumoniae*, была проведена в 80- и 90-ые годы [Binder et al., 1986; Bender, 1990; 1991]. Согласно выработанной концепции ЦГТазы осуществляют два типа реакций:

1. Реакция циклизации и присоединения



2. Реакция диспропорционирования



где G - глюкоза, c - циклодекстрин (x = 6; 7; 8), G_n, G_m - линейные α-(1,4)-D-глюканы, содержащие n и m остатков глюкозы. Обе реакции обратимы и связаны с переносом части 1,4-глюканопиранозной цепи к акцептору, чаще всего к 4-атому глюкозы в конце глюкановой цепи. Первым этапом реакции является протонирование гликозидной связи субстрата и атома 1 карбоксильной группы Asp и/или Glu ЦГТазы. Если в случае α-амилазы имеет место гидролиз т.е. гликозил-ферментный комплекс гликозилирует воду, то для ЦГТазы, напротив, вода исключается из реакционного центра.

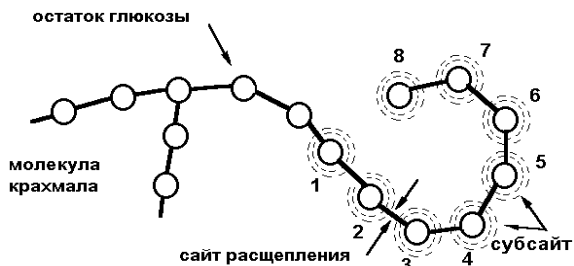


Рис.4. Механизм действия фермента ЦГТазы
Fig. 4. Mechanism of action of the CGTase

Впервые ген ЦГТазы *B.macerans* был клонирован японскими авторами в 1986 г. [Takano et al. 1986]. В этой работе была также определена его нуклеотидная последовательность, составившая вместе с терминирующим кодоном в длину 2145 п.н., кодирующих 714 аминокислот, из которых 27 пришлось на лидерный пептид, а молекулярный вес ЦГТазы составил 76994 Дальтон, что подтвердило ранее высказанное предложение о размере данного фермента от 67 до 100 кДальтон, сделанное путем определения коэффициента седиментации [Schwimmer, 1953]. Ген ЦГТазы был в рамках той же работы [Takano et al., 1986] переклонирован в бациллярный вектор pUB110 и экспрессирован в клетках другой бациллы *B.subtilis*. Таким образом, с этой публикации можно считать, что началась эра молекулярно-биологических и генно-инженерных работ в области продукции циклодекстринов.

Структурная организация ЦГТаз

Со второй половины 1980-х гг. клонирование различных генов ЦГТаз продолжилось и в настоящее время таковых клонировано несколько десятков. Ранее нашими коллегами в Уфе были клонированы гены α- и β-ЦГТаз из *B.macerans* и *Bacillus sp.* соответственно [Чемерис и др., 1999; Вахитов и др., 1999]. После чего был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей 19 секвенированных ЦГТаз с целью установления филогенетического родства различных видов и штаммов микроорганизмов - продуцентов цикломальтодекстринглюканотрансфераз [Бикбулатова и др., 2000]. Построенное древо ясно продемонстрировало существование различных филогенетических групп микроорганизмов с ЦГТазной активностью и дивергенцию α-, β- и γ-ЦГТаз, продуцируемых бактериями из родов *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* и *Thermoanaerobacter*, от их общего предка, тогда как происхождение ЦГТазы *Klebsiella pneumoniae* было независимым и является результатом конвергенции признаков. Было показано, что степень гомологии лидирующих пептидных последовательностей ЦГТаз может служить критерием межвидового родства у продуцирующих ЦГТазы микроорганизмов.

Клонирование и секвенирование генов ЦГТаз позволило более детально проанализировать элементы вторичной структуры, доменную и субсайтную организацию данных генов. Было убедительно показано, что именно один фермент, а не их смесь продуцируют α-, β- и γ-циклодекстрины одновременно [Makela et al., 1988]. В настоящее время известно, что ЦГТазы большинства бактерий состоят из пяти доменов, причем А домен доменом В подразделяется на два субдомена (рис. 5). Протяженность этих участков у секвенированной ЦГТазы из штамма

Bacillus sp. 6.6.3 [Вахитов и др., 1999] составила 138 аминокислотных остатков (A1), 64 (B), 204 (A2), 88 (C), 86 (D) и 104 аминокислоты (E). Схожие размеры доменов и субдоменов характерны и для других бациллярных ЦГТаз. Из табл. 1. можно видеть, что β–ЦГТазы довольно высокоомологичны друг другу, тогда как α–ЦГТазы весьма заметно от них отличается.

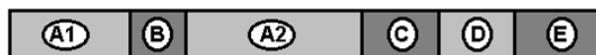


Рис.5. Доменная организация ЦГТаз
Fig. 5. Domain organization of CGTases

Табл.1

Уровень гомологии аминокислотных последовательностей доменов некоторых цикломальтодекстринглюканотрансфераз в сравнении с ЦГТазой *Bacillus sp.* штамма 6.6.3. (в %)
Table 1 - The level of homology of amino acid sequences of domains of some cyclomalto-dextrin glucanotransferases in comparison with *Bacillus sp* CGTase. strain 6.6.3. (in %)

| Штаммы / Strains | Домены / Domains | | | | | | ЦГТазы / CGTase |
|--------------------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|-----------------|
| | A1 | B | A2 | C | D | E | |
| <i>Bacillus sp.</i> 6.6.3 (β) ¹ | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>B. circulans</i> 8 (β) ² | 98,5 | 98,4 | 99,0 | 93,2 | 97,7 | 95,2 | 97,7 |
| <i>B. licheniformis</i> (β) ³ | 94,9 | 95,3 | 94,1 | 85,2 | 93,0 | 84,6 | 91,5 |
| <i>B. macerans</i> (α) ⁴ | 70,3 | 70,3 | 65,2 | 61,4 | 65,1 | 49,0 | 66,4 |

1 - Вахитов и др. (Vakhitov et al.), 1999; 2 - Nitschke et al., 1990; 3 - Hill et al., 1990; 4 - Чемерис и др. (Chemeris et al.), 1999

Большое количество исследований было направлено на выяснение третичной организации ЦГТаз с помощью рентгеноструктурного анализа, в том числе со-кристаллизованных с молекулами субстратов, что дало лучшее понимание циклизующей и трансгликозилирующей активностей ЦГТаз и заложило основы направленного изменения с помощью генной инженерии свойств этих ферментов.

Молекулярная инженерия ЦГТаз

Как уже говорилось выше, в прекрасном обзоре, вышедшем в 2014 г. [Han et al., 2014], авторам удалось систематизировать всевозможные генно-инженерные улучшения ЦГТаз с помощью случайного, делеционного, сайт-направленного мутагенеза, а также путем создания химер. Так, в цитируемой статье собрана информация из 31 литературного источника, 23 из которых описывают применение сайт-направленного мутагенеза с целью изменения специфичности действия ЦГТаз в плане соотношения разных типов циклодекстринов, повышения термостабильности ЦГТаз, а также некоторых других свойств этих ферментов. Единичные работы посвящены случайному мутагенезу, созданию делеций в генах этих ферментов и образованию химерных форм. В последующие годы практически все эти подходы продолжали использовать для улучшения ферментативных свойств ЦГТаз, что и будет рассмотрено нами в данном разделе, не повторяя информации прежних лет, описанной в обзоре Han [2014].

Как и прежде большинство работ по модификации генов ЦГТаз выполнены с помощью сайт-направленного мутагенеза. Во многих публикациях сообщается об увеличении циклизующей

активности ферментов и увеличения выхода β-циклодекстринов после сайт-направленного мутагенеза, в результате чего оказывались заменены как единичные аминокислоты, так и ряд оных в разных доменах ферментов [Huang et al., 2014; Li et al., 2014; 2016; Song et al., 2014; Ban et al., 2015; Wang et al., 2017; 2018; Tao et al., 2020]. Показано также изменение специфичности действия ЦГТазы и увеличение продукции γ-циклодекстрина в ответ на различные мутации единичных нуклеотидов [Xie et al., 2014; 2014a; Chen et al., 2015]. Были произведены замены ряда аминокислот в субсайтах, влияющих на специфичность действия ЦГТаз *B. clarkii* и в итоге после создания мутантной формы Y186W выход гамма-циклодекстрина увеличился до 94,6% по сравнению с 77,1% у дикого штамма [Wang et al., 2020].

Сообщается о мутантных формах β-ЦГТазы, в которой лейцин в 600-ом положении заменен на ряд других аминокислот, что привело к снижению ингибирующего эффекта от накапливающегося в ходе обратимой реакции циклодекстрина [Chen et al., 2018; 2019]. Помимо мутаций в структурной части гена произведены также мутации в сигнальном пептиде, что способствовало лучшей секреции фермента в культуральную жидкость [Ismail, Ilias, 2017] Отдельные мутации в различных доменах ЦГТаз приводили к формированию продуктов с увеличенным числом остатков глюкозы (до 12) в кольце [Sonnendecker et al., 2018]. Единичные мутации в гене ЦГТазы из *P. barengoltzii* привели к тому, что снизилась продукция циклодекстринов и стали в еще большей степени накапливаться линейные олигосахариды [Castillo et al., 2019].

В двух статьях описывается применение «склонной к ошибкам» ПЦР, что привело к образованию случайных мутаций, при этом для одного фермента отмечено изменение специфичности его действия в виде некоторого увеличения выхода γ -циклодекстрина [Melzer et al., 2015], а для другого показано снижение его циклизующей активности из-за двух мутаций (K73E и S382P) в каталитических доменах [Jemli et al., 2016].

Химерные формы ЦГТаз на основе ферментов из *Geobacillus sp.* и *B.circulans* показали увеличение продукции α -циклодекстрина на 40,2%, а γ -циклодекстрина на 181,58% [Jia et al., 2017]. Созданная химерная форма на основе двух ЦГТаз из *Geobacillus stearothermophilus* и *Bacillus sp.* G8256, в которой были произведены замены ряда доменов этих ферментов привела к повышенной наработке ЦГТаз, продуцирующих циклодекстрины с увеличенным числом остатков глюкозы, варьирующим от 9 до 12 [Sonnendecker, Zimmermann, 2019].

Гетерологичная экспрессия генов ЦГТаз

Создание любой генно-инженерной ЦГТазы с уникальными свойствами это только полдела, поскольку необходимо, чтобы такой фермент был доступен в промышленных масштабах, для чего требуется получение штаммов-суперпродуцентов. В уже неоднократно цитируемой статье [Hao et al., 2014] этим вопросам также уделено значительное внимание. Так, ими сделана подборка информации из 34 публикаций, в которых сообщалось о гетерологичной экспрессии генов ЦГТаз разного происхождения, что сейчас мы бегло рассмотрим.

Современные технологии генно-инженерных работ основаны на клонировании того или иного гена в кишечной палочке *Escherichia coli* с последующим секвенированием клонированного фрагмента ДНК и прочими манипуляциями, направленными на изменения свойств кодируемого им белка, а также дальнейшим переклонированием в другой подходящий вектор, способный реплицироваться в иных хозяевах. При этом существует возможность экспрессии клонированного гена и в клетках *E.coli* с использованием специальных экспрессионных систем. Поэтому неудивительно, что из тех 34 публикаций в 28 описаны гетерологичные системы экспрессии на основе *E.coli*, в том числе в одной из таких работ применялась также бацилла *B.subtilis*, которая самостоятельно использовалась еще в трех случаях. По одной публикации посвящены гетерологичной экспрессии ЦГТаз в бактерии *B.megaterium* и в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

Однако если в бациллах ЦГТаз является экскретируемым ферментом, то в *E.coli* данный белок остается внутри клеток в периплазматическом

пространстве и образует также нерастворимые тельца включения, что затрудняет его очистку и концентрирование. В этом случае обеспечить секрецию генно-инженерной ЦГТазы помогает специальный лидерный пептид или присутствие в среде для культивирования различных добавок. Ввиду того, что разные организмы используют преимущественно определенные кодоны, то для более эффективного процесса трансляции в ряде работ производились оптимизации кодонного состава генов ЦГТаз. И это все присутствовало в работах по гетерологичной экспрессии ЦГТаз, выполненных до 2014 г. В целом, можно отметить, что с помощью гетерологичной экспрессии генов ЦГТаз удавалось повысить выход фермента по сравнению с дикими штаммами в десятки и даже сотни раз. Например, в одной из ранних работ [Schmid, 1989] сообщалось, что выход ЦГТазы из *K.oxytoca* по сравнению с диким штаммом увеличился в *E.coli* приблизительно в 20 раз, а при экспрессии с использованием системы на основе *B.subtilis* даже в 300 раз.

В последующие годы подобные исследования продолжались, причем использование *E.coli* как продуцента генно-инженерных ЦГТаз также превалирует. При этом во многих работах оказываются задействованными конструкции, несущие модифицированные ранее гены ЦГТаз. В большинстве случаев применяется индуцибельная система экспрессии в векторах семейства pET, где целевой ген находится под контролем промотора фага T7. Одним из преимуществ данной технологии служит относительно легкая очистка рекомбинантных ЦГТаз на аффинных колонках с никелем, поскольку в используемых векторах находится последовательность из шести гистидинов, связывающихся с этим металлом. В частности, такой подход был применен для обнаруженной α -ЦГТазы из морской бактерии *B.agaradhaerens*, нарабатываемой в *E.coli* внутриклеточно [Hao et al., 2017]. Также подобная внутриклеточная продукция в *E.coli* ЦГТазы из *P.macerans* описана в других работах [Yang et al., 2017; Jiang et al., 2018]. Причем в первой из них использовался 500-литровый ферментер и авторы сообщают, что проведенная оптимизация культивирования позволила дополнительно повысить выход фермента в 2,1 раза.

В одной из работ для секреции ЦГТазы в культуральную среду был использован сигнальный пептид *pelB*, причем было обнаружено, что двухтемпературный режим культивирования на 45% повышает выход фермента [Li et al., 2017]. Другими авторами, наряду с этим же лидерным пептидом, применялись и другие, среди которых *dacD* показал наибольшую эффективность и обеспечил увеличенный выход ЦГТазы в культуральную среду в

7,3 раза, превысивший таковой при использовании природного лидерного пептида этой ЦГТазы [Sonnendecker et al., 2017]. Перепробовав в плазмиде рЕТ29а целый ряд лидерных пептидов (dacD, OmpA, OmpT) для β -ЦГТазы из *Paenibacillus campinasensis*, был достигнут высокий уровень секреции белка в культуральную среду в лучшем варианте, превысившим таковую без сигнального пептида в 9,74 раза [Zheng et al., 2019]. В одной из работ были исследованы 173 варианта сигнальных пептидов [Su et al., 2021]. Был достигнут уровень экспрессии в виде 151,93 ед.акт/мл, но при этом отмечалось образование большого количества телец включения, которые удалось существенно снизить заменив лидерный пептид из 12 аминокислот на 15-ти аминокислотный той же группы и одновременно увеличить выход ЦГТазы до 249,35 ед.акт./мл.

Меня в одном из рЕТ векторов T7 промотор на целый ряд других, и модифицируя также последовательность downstream box, с промотором P_{tac}, удалось повысить внутриклеточную наработку ЦГТазы *Geobacillus stearothermophilis* в *E.coli* в более чем 7 раз [Deng et al., 2018]. При этом авторы отмечают, что промотор T7 плох тем, что обеспечивает очень быструю наработку продукта, что приводит к агрегации белка и формированию нерастворимых телец включения. Ген my20 ЦГТазы, найденный с помощью метагеномного секвенирования у морских микроорганизмов, поднятых из Марианской впадины, был клонирован в векторе рЕТ24а(+) также под промотором T7 и внедрен в штамм *E.coli* BL21(DE3) и после 67-кратной очистки фермента на никелевой колонке его активность составила 63,3 ед. акт./мг [Song et al., 2021].

Весьма интересна работа китайских авторов, в ходе которой за счет использования в качестве химического шаперона недорогого β -циклодекстрина (причем в небольшом количестве – в концентрации всего 7,5 мМ) удалось в 1,71 раза повысить выход дорогостоящего γ -циклодекстрина из *B.clarkii*, при этом ген данной ЦГТазы был клонирован в векторе рЕТ24а и нес лидерный пептид OmpA [Wang et al., 2018]. Относительно недавно [Nik-Pa et al., 2020] сообщено об улучшенной секреции ЦГТазы с лидерным пептидом OmpA, кодирующий ген которую был оптимизирован путем замены ряда кодонов (о чем уже упоминалось выше), достигнутой за счет добавления в среду культивирования глицина в концентрации 1,2 мМ.

Специалистами из Южной Америки (Бразилия, Аргентина) сообщено о гетерологичной экспрессии клонированного ими гена ЦГТазы из *B.firmus* в бактерию *B.subtilis* WB800 в составе векторе рWB980, что обеспечило увеличение

ферментной активности очищенного препарата фермента по сравнению с диким штаммом более чем в 15 раз [Gimenez et al., 2019]. Ранее, используя экспрессионную систему с двойным промотором P_{HpaII}-P_{amyQ} был достигнут весьма высокий уровень секретлируемой ЦГТазы из клеток *B.subtilis*, оцененный в 571,2 ед. акт. фермента на 1 мл [Zhang et al., 2017a]. В одной из работ изучалось влияние сигнального пептида на эффективность секреции ЦГТазы, помещенной в бактерию *Lactococcus lactis* [Mahmud et al., 2019]. Еще одним видом-хозяином экспрессионной системы для наработки ЦГТаз выступили метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii*. Так, оптимизированная в плане использования кодонов β -ЦГТазы из *B.pseudocaliphilus* обеспечила самый высокий из известных уровень наработки секретлируемого белка, показавший присутствие 3885,1 ед. акт. фермента в 1 мл [Zhang et al., 2017b]. В своей следующей работе эта группа авторов исследовала оптимизацию культивирования данного рекомбинантного штамма дрожжей *K.phaffii* с целью дальнейшего улучшения выхода ЦГТазы [Zhang et al., 2019].

Таким образом, можно констатировать, что в мире ведутся активные исследования, ставящие целью повысить выход различных ЦГТаз при культивировании рекомбинантных штаммов ряда организмов, среди которых наибольшее внимание уделяется *E.coli*.

Заключение

За 130-ти летнюю историю исследований циклодекстринов и всего что с ними связано большой армией ученых разных стран уже достигнут огромный прогресс в этой области, а циклодекстрины за это время нашли весьма широкое применение в различных отраслях промышленности, включая пищевую. Причем, если в первые 100 лет наибольший вклад в изучение и применение циклодекстринов был внесен химиками и микробиологами, а также технологами разных специальностей, то в последние три-четыре десятилетия к этому процессу присоединились и молекулярные биологи, сумевшие клонировать и секвенировать гены многих ЦГТаз из различных источников. Затем с помощью физиков рентгенструктурным анализом удалось установить трехмерные структуры этих ферментов, что позволило тем же молекулярным биологам с помощью генной инженерии приступить к направленному изменению их свойств и обеспечить наработку рекомбинантных ЦГТаз в количествах, заметно превышающих таковые, продуцируемые дикими штаммами. Однако не все проблемы с наработкой циклодекстринов еще решены и предстоит дальнейшая работа, по совершенствованию уже известных ЦГТаз и

обеспечению их высокорентабельного производства. Продолжается и поиск новых природных продуцентов этих важных ферментов, поскольку ЦГТаы с уникальными свойствами могут служить хорошим источником для последующих генно-инженерных манипуляций. Так, из почв Судана удалось выделить штамм микроорганизм *Granibacillus alcaliphilus* и клонировать из него ген термофильной β -ЦГТаы [Abdalla et al., 2020]. Сообщено об обнаружении с помощью метагеномного секвенирования у морских микроорганизмов, поднятых из Марианской впадины интересной ЦГТаы, обозначенной mu20 [Song et al., 2021], о чем уже говорилось выше. Нами также недавно секвенирован полный геном бациллы *Paenibacillus ehimensis* IB-739 – продуцента ЦГТаы с необычными свойствами и сейчас ведется его сборка, после чего будет найден и клонирован ген данного фермента. Бактерии вида *P.ehimensis* секретируют ЦГТау широкой специфичности, инициирующую превращение крахмала до смесей, пригодных для одновременного синтеза всех трех циклических декстринов. Для данного фермента характерно образование относительно постоянных соотношений α : β : γ ЦД, мало зависящих от дозы внесенной ЦГТаы и концентрации субстрата [Федорова и др., 2011].

Литература

1. Бикбулатова С.М., Чемерис А.В., Усанов Н.Г., Вахитов В.А. Установление филогенетического родства различных видов и штаммов микроорганизмов - продуцентов циклодекстринглюканотрансфераз на основе сравнительного анализа их аминокислотных последовательностей // Микробиология. 2000. Т.69(5). С. 686-693.
2. Вахитов В.А., Ахметзянов А.А., Бикбулатова С.М., Усанов Н.Г., Чемерис А.В. Молекулярное клонирование, определение нуклеотидной последовательности гена β -циклодекстринглюканотрансферазы *Bacillus* sp. штамма 6.6.3. и ее сравнительный анализ // Биотехнология. 1999. №1. С. 3-10.
3. Гильванова Е.А., Мильман П.Ю. Скрининг микроорганизмов-продуцентов γ -циклодекстринглюканотрансфераз // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. № 4(1). С. 29-31
4. Федорова П.Ю., Усанов Н.Г., Гильванова Е.А. Сравнение кинетических свойств различных циклодекстринглюканотрансфераз // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13, №5(3). С. 203-206.
5. Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Актуганов Г.Э., Усанов Н.Г. Очистка и свойства циклодекстринглюканотрансферазы бактерий *Paenibacillus ehimensis* ВКМ В-2680D // Биотехнология. 2012. № 4. С. 31-38.
6. Чемерис А.В., Бикбулатова С.М., Усанов Н.Г., Вахитов В.А. Молекулярное клонирование, определение нуклеотидной последовательности гена α -циклодекстринглюканотрансферазы *Paenibacillus macerans* штамма ИБ-7 и сравнительный анализ первичной структуры α - и β -ЦГТаы // Биотехнология. 1999. №6. С.11-18.
7. Abdalla M., Hassanin H.A.M., Yao X., Iqbal M.W., Karrar E., Jiang B. Genetic and biochemical characterization of thermophilic β -cyclodextrin glucanotransferase from *Gracilibacillus alcaliphilus* SK51.001 // Science of Food and Agriculture. 2021. V.101(8). P. 3308-3318
8. Ash C., Priest F.G., Collins M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus* // Antonie Van Leeuwenhoek. 1993-1994. V.64(3-4). P. 253-260. doi: 10.1007/BF00873085.
9. Ban X., Gu Z., Li C., Huang M., Cheng L., Hong Y., Li Z. Mutations at calcium binding site III in cyclodextrin glycosyltransferase improve β -cyclodextrin specificity // Int J Biol Macromol. 2015. V.76. P.224-229. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.036.
10. Bender H. Branched saccharides formed by the action of His-modified cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al on starch // Carbohydr Res. 1991. V.222. P.239-244. doi: 10.1016/0008-6215(91)89022-8
11. Bender H. Studies of the mechanism of the cyclisation reaction catalysed by the wildtype and a truncated alpha-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* strain M 5 al, and the beta-cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 8 // Carbohydr Res. 1990. V.206(2). P.257-267. doi: 10.1016/0008-6215(90)80065-b
12. Binder F., Huber O., Böck A. Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence and expression // Gene. 1986. V.47(2-3). P.269-277. doi: 10.1016/0378-1119(86)90070-3
13. Castillo J., Caminata Landriel S., Sánchez Costa M., Taboga O.A., Berenguer J., Hidalgo A., Ferrarotti S.A., Costa H. A single mutation in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus barengoltzii* changes cyclodextrin and maltooligosaccharides production // Protein Eng Des Sel. 2018. V. 31(10). P. 399-407. doi: 10.1093/protein/gzy034.
14. Chen F., Xie T., Yue Y., Qian S., Chao Y., Pei J. Molecular dynamic analysis of mutant Y195I α -cyclodextrin glycosyltransferase with switched product specificity from α -cyclodextrin to γ -cyclodextrin // J Mol Model. 2015. V.21(8). P.208. doi: 10.1007/s00894-015-

2734-х.

15. Chen S., Li Z., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Holler T.P., Li C. Leu600 mutations decrease product inhibition of the β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* STB01 // *Int J Biol Macromol.* 2018. V.115. P.1194-1201. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.006.
16. Chen S., Li Z., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Li C. Variants at position 603 of the CGTase from *Bacillus circulans* STB01 for reducing product inhibition // *Int J Biol Macromol.* 2019. V.1(136). P.460-468. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.160.
17. Cramer F. Einschlußverbindungen der Cyclodextrine // *Angewandte chemie.* 1952. V.64(5). P.136-136 doi: 10.1002/ange.19520640506
18. Cramer F. Über Einschlußverbindungen, I. Mitteil.: Additionsverbindungen der Cycloamylosen // *Chemische berichte.* 1951. V.84(9). P.851-854. doi: 10.1002/cber.19510840912
19. Crini G. Review: a history of cyclodextrins // *Chem Rev.* 2014. V.114(21). P. 10940-10975. doi: 10.1021/cr500081p
20. Deng C., Li J., Shin H.D., Du G., Chen J., Liu L. Efficient expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* by promoter engineering and downstream box evolution // *J Biotechnol.* 2018. V.266. P.77-83. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.12.009.
21. French D. Cyclodextrin Transglycosylase (*Bacillus macerans* Amylase): $G_n \rightleftharpoons G_{(n-6)} + \alpha$ (Eq. 1); $G_n \rightleftharpoons G_{(n-7)} + \beta$ (Eq. 2), etc.; Cyclization $\rightarrow \leftarrow$ Coupling: $G_n + G_m \rightleftharpoons G_{(n+x)} + G_{(m-x)}$ (Eq. 3); Homologizing or disproportionation // *Methods in Enzymology.* 1962. V.5. P.148-155. doi: 10.1016/S0076-6879(62)05197-6
22. Freudenberg K., Cramer F. Die constitution der Schardinger-dextrine dextrine-alpha, dextrin-beta and dextrin-gamma // *Z. Naturforsch.* 1948. V.3, P.464-464.
23. Freudenberg, K., Cramer, F. Über die Schardinger-dextrine aus stärke. *Chem. Ber. Recl.* 1950. V.83. P. 296-304.
24. Gimenez G.G., Costa H., de Lima Neto Q.A., Fernandez M.A., Ferrarotti S.A., Matioli G. Sequencing, cloning, and heterologous expression of cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Bacillus firmus* strain 37 in *Bacillus subtilis* WB800 // *Bioprocess Biosyst Eng.* 2019. V.42(4). P.621-629. doi: 10.1007/s00449-018-02068-4.
25. Goo B.G., Hwang Y.J., Park J.K. *Bacillus thuringiensis*: a specific gamma-cyclodextrin producer strain. // *Carbohydr Res.* 2014. V. 11(386). P. 12-17. doi: 10.1016/j.carres.2013.12.005.
26. Han R, Li J, Shin H.D, Chen R.R, Du G, Liu L, Chen J. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications // *Biotechnol Adv.* 2014. V.32(2). P.415-28. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.004.
27. Hao J.H., Huang L.P., Chen X.T., Sun J.J., Liu J.Z., Wang W., Sun M. Identification, cloning and expression analysis of an alpha-CGTase produced by stain Y112 // *Protein Expr Purif.* 2017. V.140. P.8-15. doi: 10.1016/j.pep.2017.07.015.
28. Huang M., Li C., Gu Z., Cheng L., Hong Y., Li Z. Mutations in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* enhance β -cyclization activity and β -cyclodextrin production // *J Agric Food Chem.* 2014. V. 62(46). P. 11209-11214. doi: 10.1021/jf503523z.
29. Ismail A., Illias R.M. Site-saturation mutagenesis of mutant L-asparaginase II signal peptide hydrophobic region for improved excretion of cyclodextrin glucanotransferase // *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2017. V.44(12). P.1627-1641. doi: 10.1007/s10295-017-1980-6.
30. Jemli S., Jaoua M., Bejar S. US132 Cyclodextrin Glucanotransferase Engineering by Random Mutagenesis for an Anti-Staling Purpose // *Mol Biotechnol.* 2016. V.58(8-9). P.551-557. doi: 10.1007/s12033-016-9952-z.
31. Jia X., Guo Y., Lin X., You M., Lin C., Chen L., Chen J. Fusion of a family 20 carbohydrate-binding module (CBM20) with cyclodextrin glycosyltransferase of *Geobacillus* sp. CHB1 improves catalytic efficiency // *J Basic Microbiol.* 2017. V.57(6). P.471-480. doi: 10.1002/jobm.201600628.
32. Jiang Y., Zhou J., Wu R., Xin F., Zhang W., Fang Y., Ma J., Dong W., Jiang M. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* in *Escherichia coli* and its application in 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid production // *BMC Biotechnol.* 2018. V.18(1). P.53. doi: 10.1186/s12896-018-0463-9.
33. Kitahata S., Okada S. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase. IV. Enzymatic synthesis of 3-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-sorbose and 4-O-alpha-D-glucopyranosyl-D-xylose using cyclodextrin glycosyltransferase // *Biochem.* 1976. V.79(3). P. 641-648. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131108
34. Kobayashi S, Kainuma K, Suzuki S. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase // *Carbohydr Res.* 1978. V. 61. P. (229-238). doi: 10.1016/s0008-6215(00)84484-5.
35. Li Y., Liu J., Wang Y., Liu B., Xie X., Jia R., Li C., Li Z. A two-stage temperature control strategy enhances extracellular secretion of recombinant α -cyclodextrin glucosyltransferase in *Escherichia coli* // *AMB Express.* 2017. V.7(1). P.165. doi: 10.1186/s13568-017-0465-3.
36. Li Z., Ban X., Gu Z., Li C., Huang M., Hong Y., Cheng L. Mutations enhance β -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* // *Carbohydr Polym.* 2014. V.108. P. 112-117. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.03.015.

37. Li Z., Huang M., Gu Z., Holler T.P., Cheng L., Hong Y., Li C.. Asp577 mutations enhance the catalytic efficiency of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* // *Int J Biol Macromol.* 2016. V.83. P.111-116. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.042.
38. Li Z., Wang M., Wang F., Gu Z., Du G., Wu J., Chen J. Gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. V.77(2). P.245-55. doi: 10.1007/s00253-007-1166-7.
39. Mahmud H., Ismail A., Abdul Rahim R., Low K.O., Md Illias R. Enhanced secretion of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) by *Lactococcus lactis* using heterologous signal peptides and optimization of cultivation conditions // *J Biotechnol.* 2019. V.296. P.22-31. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.02.013.
40. Makela M., Mattsson P., Schinina M.E., Korpela T. Purification and properties of cyclomalto-dextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus sp.* 7-12 // *Biotechn. Appl. Biochem.* 1988. V. 10. P. 414-427. doi: 10.1111/j.1745-4514.2004.04603.x
41. Melzer S., Sonnendecker C., Föllner C., Zimmermann W. Stepwise error-prone PCR and DNA shuffling changed the pH activity range and product specificity of the cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* // *FEBS Open Bio.* 2015. V.11(5). P. 528-34. doi: 10.1016/j.fob.2015.06.002.
42. Nik-Pa N. I. M., Sobri M.F.M., Abd-Aziz S., Ibrahim M.F., Bahrin E.K., Alitheen N. B. M., Ramli N. Combined Optimization of Codon Usage and Glycine Supplementation Enhances the Extracellular Production of a β -Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus sp.* NR5 UPM in *Escherichia coli* // *Int J Mol Sci.* 2020. V.21(11). P.3919. doi: 10.3390/ijms21113919.
43. Schardinger F. Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus särkekleister durch mikrobien // *Centralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskrankh. Hyg. Abt. II.* 1911. V.29. P.188–197
44. Schardinger F. Mitteilung aus der staatlichen untersuchungsanstalt für lebensmittel in wien Azetorgärung // *Wien. Klin. Wochenschr.* 1904. V.17. P. 207–209
45. Schardinger F. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch. *Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahr.-u. // Genußmittel.* 1903. V.6. P. 865–880. doi: 10.1007/BF02067497
46. Schmid G. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes // *Trends in Biotechnology.* 1989. V.7(9). P. 244-248. doi: 10.1016/0167-7799(89)90015-2
47. Schwimmer S. Evidence for the purity of Schardinger dextrinogenase // *Arch Biochem Biophys.* 1953. V.43(1). P.108-117. doi: 10.1016/0003-9861(53)90089-7.
48. Song B., Yue Y, Xie T., Qian S., Chao Y. Mutation of tyrosine167histidine at remote substrate binding subsite -6 in α -cyclodextrin glycosyltransferase enhancing α -cyclodextrin specificity by directed evolution // *Mol Biotechnol.* 2014. V.56(3). P.232-239. doi: 10.1007/s12033-013-9699-8.
49. Song K., Sun J., Wang W., Hao J. Heterologous Expression of Cyclodextrin Glycosyltransferase my20 in *Escherichia coli* and Its Application in 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid Production // *Front Microbiol.* 2021. V.12. P.664339. doi: 10.3389/fmicb.2021.664339.
50. Sonnendecker C., Melzer S., Zimmermann W. Engineered cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus sp.* G-825-6 produce large-ring cyclodextrins with high specificity // *MicrobiologyOpen.* 2019. V.8(6). e00757. doi: 10.1002/mbo3.757.
51. Sonnendecker C., Wei R., Kurze E., Wang J., Oeser T., Zimmermann W. Efficient extracellular recombinant production and purification of a *Bacillus* cyclodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli* // *Microb Cell Fact.* 2017. V.16(1). P.87. doi: 10.1186/s12934-017-0701-1.
52. Sonnendecker C., Zimmermann W. Domain shuffling of cyclodextrin glucanotransferases for tailored product specificity and thermal stability // *FEBS Open Bio.* 2019. V.9(2). P.384-395. doi: 10.1002/2211-5463.12588.
53. Su L., Li Y., Wu J. Efficient secretory expression of *Bacillus stearothermophilus* α/β -cyclodextrin glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* // *J Biotechnol.* 2021. V.331. P.74-82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.03.011.
54. Takano T., Fukuda M., Monma M., Kobayashi S., Kainuma K., Yamane K. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene // *J. Bacteriol.* 1986. V.166(3). P.1118-1122. doi: 10.1128/jb.166.3.1118-1122.1986
55. Tao X., Su L., Wang L., Chen X., Wu J. Improved production of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* NO₂ in *Escherichia coli* via directed evolution // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020. V.104(1). P.173-185. doi: 10.1007/s00253-019-10249-8.
56. Thoma J.A., Dygert S., Hsue K. A simple and specific assay for cyclodextrin transglucosidase // *Analytical Biochemistry.* 1965. V. 13(1). P.91-99. doi: 10.1016/0003-2697(65)90122-3
57. Tilden E.B., Adams M., Hudson C.S. Purification of the Amylase of *Bacillus macerans* // *J. Am. Chem. Soc.* 1942. V.64(6). P.1432–1433. doi: 10.1021/ja01258a052
58. Tilden E.B., Hudson C.S. Preparation and Properties of the Amylases Produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa* // *J Bacteriol.* 1942. V.43(4). P.527-544. doi: 10.1128/jb.43.4.527-544.1942.
59. Villiers A. Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique // *Compt. Rendu.* 1891.

V.112. P. 435-438.

60. Wang H., Zhou W., Li H., Bu R. Optimization of the fermentation conditions for the mutant strain of β -cyclodextrin glycosyltransferase H167C to produce cyclodextrins // *Biotech.* 2018. V.8(3). P.165. doi: 10.1007/s13205-018-1182-6.
61. Wang H., Zhou W., Li H., Rie B., Piao C. Improved activity of β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sp.* N-227 via mutagenesis of the conserved residues // *Biotech.* 2017. V.7(2). P.149. doi: 10.1007/s13205-017-0725-6.
62. Wang L., Chen S., Wu J. Cyclodextrin enhanced the soluble expression of *Bacillus clarkii* γ -CGTase in *Escherichia coli* // *BMC Biotechnol.* 2018. V.18(1). P.72. doi: 10.1186/s12896-018-0480-8.
63. Wang L., Xia Y., Su L., Wu J. Modification of *Bacillus clarkii* γ -Cyclodextrin Glycosyltransferase and Addition of Complexing Agents to Increase γ -Cyclodextrin Production // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2020. V.68(43). P.12079-12085. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05408
64. Xie T., Hou Y., Li D., Yue Y., Qian S., Chao Y. Structural basis of a mutant Y195I α -cyclodextrin glycosyltransferase with switched product specificity from α -cyclodextrin to β -/ γ -cyclodextrin // *J Biotechnol.* 2014. V.20(182-183). P. 92-96. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.014.
65. Xie T., Song B., Yue Y., Chao Y., Qian S. Site-saturation mutagenesis of central tyrosine 195 leading to diverse product specificities of an α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.* 602-1 // *J Biotechnol.* 2014. V. 20(170). P.10-16. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.10.032.
66. Yang L., Jia L., Yinglan W., Bingjie L., Xiaofang X., Rui J., Caiming L., Zhaofeng L. A two-stage temperature control strategy enhances extracellular secretion of recombinant α -cyclodextrin glucosyltransferase in *Escherichia coli* // *AMB Express.* 2017. V.7(1). P.165. doi: 10.1186/s13568-017-0465-3.
67. Zhang J., Zhang Y., Li M. High-level secretion and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Komagataella phaffii* // *J Biotechnol.* 2017b. V.259. P.126-134. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.07.031.
68. Zhang J., Zhao Y., Li M., Liu T. Optimization of defined medium for recombinant *Komagataella phaffii* expressing cyclodextrin glycosyltransferase // *Biotechnol Prog.* 2019. V35(5). e2867. doi: 10.1002/btpr.2867.
69. Zhang K., Su L., Duan X., Liu L., Wu J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system // *Microb Cell Fact.* 2017a. V.16(1). P.32. doi: 10.1186/s12934-017-0649-1.
70. Zheng J., Li X., Wu H. High-level extracellular secretion and characterization of the thermophilic β -cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus campinasensis* in *Escherichia coli* // *Biotech.* 2019. V.9(10). P.372. doi: 10.1007/s13205-019-1909-z

References

1. Abdalla M., Hassanin H.A.M., Yao X., Iqbal M.W., Karrar E., Jiang B. Genetic and biochemical characterization of thermophilic β -cyclodextrin glucanotransferase from *Gracilibacillus alcaliphilus* SK51.001. *Science of Food and Agriculture.* 2021. V.101(8). P. 3308-3318
2. Ash C., Priest F.G., Collins M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1993-1994. V.64(3-4). P. 253-260. doi: 10.1007/BF00873085.
3. Ban X., Gu Z., Li C., Huang M., Cheng L., Hong Y., Li Z. Mutations at calcium binding site III in cyclodextrin glycosyltransferase improve β -cyclodextrin specificity. *Int J Biol Macromol.* 2015. V.76. P.224-229. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.036.
4. Bender H. Branched saccharides formed by the action of His-modified cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al on starch. *Carbohydr Res.* 1991. V.222. P.239-244. doi: 10.1016/0008-6215(91)89022-8
5. Bender H. Studies of the mechanism of the cyclisation reaction catalysed by the wildtype and a truncated alpha-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* strain M 5 al, and the beta-cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 8. *Carbohydr Res.* 1990. V.206(2). P.257-267. doi: 10.1016/0008-6215(90)80065-b
6. Bikbulatova S.M., Chemeris A.V., Usanov N.G., Vahitov. V.A. Establishment of the phylogenetic relationship between the microbial producers of cyclodextrin glucanotransferases using their complete amino acid sequences. *Microbiology (Mikrobiologiya).* 2000. V. 69(5). P. 575-581.
7. Binder F., Huber O., Böck A. Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence and expression. *Gene.* 1986. V.47(2-3). P.269-277. doi: 10.1016/0378-1119(86)90070-3
8. Castillo J., Caminata Landriel S., Sánchez Costa M., Taboga O.A., Berenguer J., Hidalgo A., Ferrarotti S.A., Costa H. A single mutation in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus barengoltzii* changes cyclodextrin and maltooligosaccharides production. *Protein Eng Des Sel.* 2018. V. 31(10). P. 399-407. doi: 10.1093/protein/gzy034.
9. Chemeris A.V., Bikbulatova S.M., Usanov N.G., Vakhitov. V.A. Молекулярное клонирование, определение нуклеотидной последовательности гена α -циклодекстрин-глюканотрансферазы *Paenibacillus macerans*

- shtamma IB-7 i sravnitel'nyj analiz pervichnoj struktury alpha- i beta-CGTaz. *Biotehnologija*. 1999. No.6. S.11-18. [Molecular cloning, determination of the nucleotide sequence of the gene alpha-cyclodextringlucanotransferase *Paenibacillus macerans* strain IB-7 and comparative analysis of the primary structure of alpha- and beta-CGTases] (In Russian)
10. Chen F., Xie T., Yue Y., Qian S., Chao Y., Pei J. Molecular dynamic analysis of mutant Y195I α -cyclodextrin glycosyltransferase with switched product specificity from α -cyclodextrin to γ -cyclodextrin. *J Mol Model*. 2015. V.21(8). P.208. doi: 10.1007/s00894-015-2734-x.
 11. Chen S., Li Z., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Holler T.P., Li C. Leu600 mutations decrease product inhibition of the β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* STB01. *Int J Biol Macromol*. 2018. V.115. P.1194-1201. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.006.
 12. Chen S., Li Z., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Li C. Variants at position 603 of the CGTase from *Bacillus circulans* STB01 for reducing product inhibition. *Int J Biol Macromol*. 2019. V.1(136). P.460-468. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.160.
 13. Cramer F. Einschlußverbindungen der Cyclodextrine. *Angewandte chemie*. 1952. V.64(5). P.136-136 doi: 10.1002/ange.19520640506
 14. Cramer F. Über Einschlußverbindungen, I. Mitteil.: Additionsverbindungen der Cycloamylosen. *Chemische berichte*. 1951. V.84(9). P.851-854. doi: 10.1002/cber.19510840912
 15. Crini G. Review: a history of cyclodextrins. *Chem Rev*. 2014. V.114(21). P. 10940-10975. doi: 10.1021/cr500081p
 16. Deng C., Li J., Shin H.D., Du G., Chen J., Liu L. Efficient expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* by promoter engineering and downstream box evolution. *J Biotechnol*. 2018. V.266. P.77-83. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.12.009.
 17. Fedorova P.Ju., Usanov N.G., Gil'vanova E.A. Sravnenie kineticheskikh svojstv razlichnyh ciklodekstringljukanotferaz. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2011. V. 13, No.5(3). S. 203-206. [Comparison of kinetic properties of various cyclodextringlucanotransferases] (In Russian)
 18. Fedorova P.Ju., Gil'vanova E.A., Aktuganov G.Je., Usanov N.G. Ochistka i svojstva ciklodekstringljukanotferazy bakterij *Paenibacillus ehimensis* VKM B-2680D. *Biotehnologija*. 2012. № 4. S. 31-38. [Purification and properties of cyclodextringlucanotransferase of bacteria *Paenibacillus ehimensis* VCM B-2680D] (In Russian)
 19. French D. Cyclodextrin Transglycosylase (*Bacillus macerans* Amylase): $G_n \rightleftharpoons G_{(n-6)} + \alpha$ (Eq. 1); $G_n \rightleftharpoons G_{(n-7)} + \beta$ (Eq. 2), etc.; Cyclization $\rightarrow \leftarrow$ Coupling; $G_n + G_m \rightleftharpoons G_{(n+x)} + G_{(m-x)}$ (Eq. 3); Homologizing or disproportionation. *Methods in Enzymology*. 1962. V.5. P.148-155. doi: 10.1016/S0076-6879(62)05197-6
 20. Freudenberg K., Cramer F. Die constitution der Schardinger-dextrine dextrine-alpha, dextrin-beta and dextrin-gamma. *Z. Naturforsch.* 1948. V. 3. P.464-464.
 21. Freudenberg, K., Cramer, F. Über die Schardinger-dextrine aus stärke. *Chem. Ber. Recl.* 1950. V.83. P. 296-304.
 22. Gimenez G.G., Costa H., de Lima Neto Q.A., Fernandez M.A., Ferrarotti S.A., Mاتيoli G. Sequencing, cloning, and heterologous expression of cyclomaltodextrin glucanotransferase of *Bacillus firmus* strain 37 in *Bacillus subtilis* WB800. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2019. V.42(4). P.621-629. doi: 10.1007/s00449-018-02068-4.
 23. Gilvanova E.A., Milman P.U. Skrinig mikroorganizmov-producentov γ -ciklodekstringljukanotferaz // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAN*. 2015. № 4(1). S. 29-31. [Screening of microorganisms producing γ -cyclodextringlucanotransferases] (In Russian)
 24. Goo B.G., Hwang Y.J., Park J.K. *Bacillus thuringiensis*: a specific gamma-cyclodextrin producer strain. *Carbohydr Res*. 2014. V. 11(386). P. 12-17. doi: 10.1016/j.carres.2013.12.005.
 25. Han R, Li J, Shin H.D, Chen R.R, Du G, Liu L, Chen J. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnol Adv*. 2014. V.32(2). P.415-28. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.004.
 26. Hao J.H., Huang L.P., Chen X.T., Sun J.J., Liu J.Z., Wang W., Sun M. Identification, cloning and expression analysis of an alpha-CGTase produced by stain Y112. *Protein Expr Purif*. 2017. V.140. P.8-15. doi: 10.1016/j.pep.2017.07.015.
 27. Huang M., Li C., Gu Z., Cheng L., Hong Y., Li Z. Mutations in cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* enhance β -cyclization activity and β -cyclodextrin production. *J Agric Food Chem*. 2014. V. 62(46). P. 11209-11214. doi: 10.1021/jf503523z.
 28. Ismail A., Illias R.M. Site-saturation mutagenesis of mutant L-asparaginase II signal peptide hydrophobic region for improved excretion of cyclodextrin glucanotransferase. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2017. V.44(12). P.1627-1641. doi: 10.1007/s10295-017-1980-6.
 29. Jemli S., Jaoua M., Bejar S. US132 Cyclodextrin Glucanotransferase Engineering by Random Mutagenesis for an Anti-Staling Purpose. *Mol Biotechnol*. 2016. V.58(8-9). P.551-557. doi: 10.1007/s12033-016-9952-z.
 30. Jia X., Guo Y., Lin X., You M., Lin C., Chen L., Chen J. Fusion of a family 20 carbohydrate-binding module (CBM20) with cyclodextrin glycosyltransferase of *Geobacillus* sp. CHB1 improves catalytic efficiency. *J*

- Basic Microbiol.* 2017. V.57(6). P.471-480. doi: 10.1002/jobm.201600628.
31. Jiang Y., Zhou J., Wu R., Xin F., Zhang W., Fang Y., Ma J., Dong W., Jiang M. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* in *Escherichia coli* and its application in 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid production. *BMC Biotechnol.* 2018. V.18(1). P.53. doi: 10.1186/s12896-018-0463-9.
32. Kitahata S., Okada S. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase. IV. Enzymatic synthesis of 3-O- α -D-glucopyranosyl-L-sorbose and 4-O- α -D-glucopyranosyl-D-xylose using cyclodextrin glycosyltransferase. *Biochem.* 1976. V.79(3). P. 641-648. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131108.
33. Kobayashi S, Kainuma K, Suzuki S. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cyclodextrin (cyclodextrin) glucanotransferase. *Carbohydr Res.* 1978. V. 61. P. (229-238). doi: 10.1016/s0008-6215(00)84484-5.
34. Li Y., Liu J., Wang Y., Liu B., Xie X., Jia R., Li C., Li Z. A two-stage temperature control strategy enhances extracellular secretion of recombinant α -cyclodextrin glucosyltransferase in *Escherichia coli*. *AMB Express.* 2017. V.7(1). P.165. doi: 10.1186/s13568-017-0465-3.
35. Li Z., Ban X., Gu Z., Li C., Huang M., Hong Y., Cheng L. Mutations enhance β -cyclodextrin specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Carbohydr Polym.* 2014. V.108. P. 112-117. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.03.015.
36. Li Z., Huang M., Gu Z., Holler T.P., Cheng L., Hong Y., Li C.. Asp577 mutations enhance the catalytic efficiency of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Int J Biol Macromol.* 2016. V.83. P.111-116. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.042.
37. Li Z., Wang M., Wang F., Gu Z., Du G., Wu J., Chen J. Gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. V.77(2). P.245-55. doi: 10.1007/s00253-007-1166-7.
38. Mahmud H., Ismail A., Abdul Rahim R., Low K.O., Md Illias R. Enhanced secretion of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) by *Lactococcus lactis* using heterologous signal peptides and optimization of cultivation conditions. *J Biotechnol.* 2019. V.296. P.22-31. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.02.013.
39. Makela M., Mattsson P., Schinina M.E., Korpela T. Purification and properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* sp. 7-12. *Biotechn. Appl. Biochem.* 1988. V. 10. P. 414-427. doi: 10.1111/j.1745-4514.2004.04603.x
40. Melzer S., Sonnendecker C., Föllner C., Zimmermann W. Stepwise error-prone PCR and DNA shuffling changed the pH activity range and product specificity of the cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *FEBS Open Bio.* 2015. V.11(5). P. 528-34. doi: 10.1016/j.fob.2015.06.002.
41. Nik-Pa N. I. M., Sobri M.F.M., Abd-Aziz S., Ibrahim M.F., Bahrin E.K., Alitheen N. B. M., Ramli N. Combined Optimization of Codon Usage and Glycine Supplementation Enhances the Extracellular Production of a β -Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus* sp. NR5 UPM in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci.* 2020. V.21(11). P.3919. doi: 10.3390/ijms21113919.
42. Schardinger F. Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus särkekleister durch mikroben. *Centralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskrankh. Hyg. Abt. II.* 1911. V.29. P.188-197.
43. Schardinger F. Mitteilung aus der staatlichen untersuchungsanstalt für lebensmittel in Wien Azetorgärung. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1904. V.17. P. 207-209
44. Schardinger F. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch. *Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahr.-u. Genußmittel.* 1903. V.6. P. 865-880. doi: 10.1007/BF02067497
45. Schmid G. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends in Biotechnology.* 1989. V.7(9). P. 244-248. doi: 10.1016/0167-7799(89)90015-2
46. Schwimmer S. Evidence for the purity of Schardinger dextrinogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1953. V.43(1). P.108-117. doi: 10.1016/0003-9861(53)90089-7.
47. Song B., Yue Y, Xie T., Qian S., Chao Y. Mutation of tyrosine167histidine at remote substrate binding subsite -6 in α -cyclodextrin glycosyltransferase enhancing α -cyclodextrin specificity by directed evolution. *Mol Biotechnol.* 2014. V.56(3). P.232-239. doi: 10.1007/s12033-013-9699-8.
48. Song K., Sun J., Wang W., Hao J. Heterologous Expression of Cyclodextrin Glycosyltransferase my20 in *Escherichia coli* and Its Application in 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic Acid Production. *Front Microbiol.* 2021. V.12. P.664339. doi: 10.3389/fmicb.2021.664339.
49. Sonnendecker C., Melzer S., Zimmermann W. Engineered cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus* sp. G-825-6 produce large-ring cyclodextrins with high specificity. *MicrobiologyOpen.* 2019. V.8(6). e00757. doi: 10.1002/mbo3.757.
50. Sonnendecker C., Wei R., Kurze E., Wang J., Oeser T., Zimmermann W. Efficient extracellular recombinant production and purification of a *Bacillus* cyclodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2017. V.16(1). P.87. doi: 10.1186/s12934-017-0701-1.
51. Sonnendecker C., Zimmermann W. Domain shuffling of cyclodextrin glucanotransferases for tailored

- product specificity and thermal stability. *FEBS Open Bio*. 2019. V.9(2). P.384-395. doi: 10.1002/2211-5463.12588.
52. Su L., Li Y., Wu J. Efficient secretory expression of *Bacillus stearothermophilus* α/β -cyclodextrin glycosyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol*. 2021. V.331. P.74-82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.03.011.
53. Takano T., Fukuda M., Monma M., Kobayashi S., Kainuma K., Yamane K. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *J. Bacteriol.* 1986. V.166(3). P.1118-1122. doi: 10.1128/jb.166.3.1118-1122.1986
54. Tao X., Su L., Wang L., Chen X., Wu J. Improved production of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* NO₂ in *Escherichia coli* via directed evolution. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020. V.104(1). P.173-185. doi: 10.1007/s00253-019-10249-8.
55. Thoma J.A., Dygert S., Hsue K. A simple and specific assay for cyclodextrin transglucosidase. *Analytical Biochemistry*. 1965. V. 13(1). P.91-99. doi: 10.1016/0003-2697(65)90122-3
56. Tilden E.B., Adams M., Hudson C.S. Purification of the Amylase of *Bacillus macerans*. *J. Am. Chem. Soc.* 1942. V.64(6). P.1432-1433. doi: 10.1021/ja01258a052
57. Tilden E.B., Hudson C.S. Preparation and Properties of the Amylases Produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol.* 1942. V.43(4). P.527-544. doi: 10.1128/jb.43.4.527-544.1942.
58. Vakhitov V.A., Ahmetzjanov A.A., Bikbulatova S.M., Usanov N.G., Chemeris A.V. Molekuljarnoe klonirovanie, opredelenie nukleotidnoj posledovatel'nosti gena beta-ciklodekstringljukanotransferazy *Bacillus sp.* shtamma 6.6.3. i ee sravnitel'nyj analiz. *Biotehnologija*. 1999. No.1. P. 3-10. [Molecular cloning, determination of the nucleotide sequence of the gene - cyclodextringlucanotransferase *Bacillus sp.* strain 6.6.3. and its comparative analysis] (In Russian)
59. Villiers A. Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. *Compt. Rendu*. 1891. V.112. P. 435-438.
60. Wang H., Zhou W., Li H., Bu R. Optimization of the fermentation conditions for the mutant strain of β -cyclodextrin glycosyltransferase H167C to produce cyclodextrins. *Biotech*. 2018. V.8(3). P.165. doi: 10.1007/s13205-018-1182-6.
61. Wang H., Zhou W., Li H., Rie B., Piao C. Improved activity of β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sp.* N-227 via mutagenesis of the conserved residues. *Biotech*. 2017. V.7(2). P.149. doi: 10.1007/s13205-017-0725-6.
62. Wang L., Chen S., Wu J. Cyclodextrin enhanced the soluble expression of *Bacillus clarkii* γ -CGTase in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*. 2018. V.18(1). P.72. doi: 10.1186/s12896-018-0480-8.
63. Wang L., Xia Y., Su L., Wu J. Modification of *Bacillus clarkii* γ -Cyclodextrin Glycosyltransferase and Addition of Complexing Agents to Increase γ -Cyclodextrin Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020. V.68(43). P.12079-12085. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05408
64. Xie T., Hou Y., Li D., Yue Y., Qian S., Chao Y. Structural basis of a mutant Y195I α -cyclodextrin glycosyltransferase with switched product specificity from α -cyclodextrin to β -/ γ -cyclodextrin. *J Biotechnol*. 2014. V.20(182-183). P. 92-96. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.014.
65. Xie T., Song B., Yue Y., Chao Y., Qian S. Site-saturation mutagenesis of central tyrosine 195 leading to diverse product specificities of an α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus sp.* 602-1. *J Biotechnol*. 2014. V. 20(170). P.10-16. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.10.032.
66. Yang L., Jia L., Yinglan W., Bingjie L., Xiaofang X., Rui J., Caiming L., Zhaofeng L. A two-stage temperature control strategy enhances extracellular secretion of recombinant α -cyclodextrin glucosyltransferase in *Escherichia coli*. *AMB Express*. 2017. V.7(1). P.165. doi: 10.1186/s13568-017-0465-3.
67. Zhang J., Zhang Y., Li M. High-level secretion and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Komagataella phaffii*. *J Biotechnol*. 2017b. V.259. P.126-134. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.07.031.
68. Zhang J., Zhao Y., Li M., Liu T. Optimization of defined medium for recombinant *Komagataella phaffii* expressing cyclodextrin glycosyltransferase. *Biotechnol Prog*. 2019. V35(5). e2867. doi: 10.1002/btpr.2867.
69. Zhang K., Su L., Duan X., Liu L., Wu J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. *Microb Cell Fact*. 2017a. V.16(1). P.32. doi: 10.1186/s12934-017-0649-1.
70. Zheng J., Li X., Wu H. High-level extracellular secretion and characterization of the thermophilic β -cyclodextrin glucanotranferase from *Paenibacillus campinasensis* in *Escherichia coli*. *Biotech*. 2019. V.9(10). P.372. doi: 10.1007/s13205-019-1909-z