

ANNA KONIECZNA-MOLENDA

**ZASTOSOWANIE GLUKOZYLTRANSFERAZY CYKLODEKSTRYNOWEJ (CGTazy) IMMOBILIZOWANEJ NA SKROBI DIALDEHYDOWEJ (DAS) DO OTRZYMYWANIA CYKLODEKSTRYN**

## Streszczenie

**Wprowadzenie.** Unieruchomienie enzymu na nośniku może przynieść korzyści nie tylko z powodu obniżenia kosztów poprzez ponowne wykorzystanie lub zapewnienie ciągłości procesu, ale także przez zmianę specyficzności katalizatora względem produktów. Dużym wyzwaniem w reakcjach enzymatycznych jest zmiana specyficzności ilości produktów, co utrudnia powszechne stosowanie reakcji enzymatycznych, zwiększa koszty oddzielania i oczyszczania produktów. Cennym podejściem do generowania enzymów dostosowanych do potrzeb klienta stała się ukierunkowana zmiana enzymów na przykład w wyniku immobilizacji.

**Wyniki i wnioski.** W pracy zaprezentowano badania nad unieruchomieniem glukozylotransferazy cyklodekstrynowej (CGTaza) EC 2.4.1.19 na skrobi dialdehydowej (DAS), uzyskanej w wyniku utleniania skrobi ziemniaczanej. Dzięki dużej zawartości grup aldehydowych CGTaza była nieaktywna katalitycznie w stosunku do skrobi dialdehydowej. Uzyskany w wyniku immobilizacji biokatalizator CGTaza-DAS był aktywny w sześciu cyklach reakcji otrzymywania cyklodekstryn ze skrobi ziemniaczanej. Wyższą wydajność niż w katalizie homogenicznej uzyskano w czterech cyklach reakcji katalizowanych immobilizowaną CGTazą. W kolejnych cyklach biokatalizator nadal był aktywny, ale reakcja przebiegała z mniejszą wydajnością w porównaniu z reakcją z enzymem w stanie wolnym. Zaobserwowano zmianę stosunku otrzymywanych cyklodekstryn  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ . W reakcji z enzymem nieimmobilizowanym uzyskano najwięcej  $\beta$ -CD. W reakcji katalizy heterogenicznej w cyklach I-III otrzymano więcej  $\alpha$ -CD, w kolejnych cyklach wydajność  $\gamma$ -CD była większa niż  $\beta$ -CD. Dzięki wielokrotnemu zastosowaniu heterogenicznej biokatalizy znacznie zwiększono sumaryczną ilość otrzymanych cyklodekstryn. Zaprezentowany biokatalizator CGTaza-DAS może być z sukcesem zastosowany w procesach technologicznych w celu obniżenia kosztów otrzymywania cyklodekstryn.

**Słowa kluczowe:** immobilizacja, CGTaza, skrobia dialdehydowa DAS, cyklodekstryny

**Wprowadzenie**

Cyklodekstryny (CD) to klasa naturalnych maltooligosacharydów o unikalnych właściwościach. Są to jednorodne, krystaliczne i niehigroskopijne struktury cykliczne.

---

*Dr hab., prof. URK A. Konieczna-Molenda ORCID: 0000-0002-1283-0306; Katedra Chemii, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków.  
Kontakt e-mail: anna.konieczna-molenda@urk.edu.pl*

Najczęstszymi formami CD są  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny, które składają się z 6, 7 lub 8 jednostek D-glukopiranozydu połączonych wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi [6]. CD posiadające kształt stożka z hydrofilową powierzchnią i hydrofobową wnęką wykazują niezwykłą zdolność do rozpuszczania w środowisku wodnym i tworzenia kompleksów inkluzyjnych/koacerwatów z polarnymi i niepolarnymi cząsteczkami o różnych rozmiarach.  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -Cyklodekstryny są ogólnie uznawane za bezpieczne (GRAS), co pozwala na ich stosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [1, 14].

Właściwości amfifilowe, nietoksyczność i zdolność do tworzenia kompleksów z cennymi, słabo rozpuszczalnymi związkami bioaktywnymi i lekami pozwala na znalezienie nowych zastosowań dla cyklodekstryn. CD, ze względu na swoje unikalne właściwości, świetnie sprawdzają się w zastosowaniach, które wymagają zwiększania rozpuszczalności w wodzie [9], zwiększania stabilności związków przed reakcjami fotodegradacji [4] lub ochrony przed utlenianiem [11, 24]. Dzięki zastosowaniu CD można wydłużyć okres przydatności do spożycia produktów spożywczych, maskować smaki/zapachy w żywności i lekach [2, 4, 12] i skutecznie uwalniać leki lub związki bioaktywne w organizmie lub systemach żywnościowych [7, 19, 23]. Rynek cyklodekstryn doświadczył na całym świecie w ciągu ostatniej dekady szybkiego wzrostu napędzanego dużym popytem w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz kosmetycznym.

Cyklodekstryny uzyskiwane są wyłącznie poprzez działanie enzymu glukozylotransferazy cyklodekstrynowej (CGTaza) EC 2.4.1.19. Stosowana jest ona nie tylko do biotransformacji skrobi w celu otrzymywania cyklicznych oligosacharydów, ale też szeregu innych produktów transglikozylacji [3, 17]. Produkty te mają szerokie zastosowanie w różnych sektorach przemysłu, w tym w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, tekstylnym, kosmetycznym i agrochemicznym [15]. Ostatnie odkrycia nowych CGTaz z różnych mikroorganizmów dodatkowo jeszcze rozszerzyły jej zastosowania. Główną jednak wadą naturalnej CGTazy jest niska wydajność, która połączona z wysokim popytem na cyklodekstryny doprowadziła do znacznego wzrostu badań nad CGTazami [6]. W celu zwiększenia produktywności stosowana jest heterologiczna ekspresja, zmiany struktury molekularnej CGTazy oraz inne podejścia inżynierii molekularnej mające na celu poprawę właściwości enzymu, w tym specyficzności w stosunku do produktu i substratu, wydajności katalitycznej i stabilności termicznej.

Duże wyzwanie stanowi zmiana specyficzności ilości uzyskiwanych CD  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ - oraz wielkości mieszanin CD otrzymywanych w reakcjach katalizowanych przez CGTazy. Utrudnia to ich powszechne stosowanie, stwarza problemy w oddzielaniu i oczyszczaniu cyklodekstryn, przez co zwiększa koszty produkcji. Dlatego konieczne jest opracowanie opłacalnych strategii ukierunkowania zmiany enzymów w celu generowania CGTaz dostosowanych do potrzeb klienta [16].

Immobilizacja CGTazy może poprawić znacznie specyficzność, stabilność wobec zmian temperatury i pH, a także wpływu rozpuszczalników organicznych oraz umożliwić ponowne użycie enzymu. Przejście z katalizy homogenicznej do heterogenicznej w wyniku unieruchomienia enzymu może prowadzić do poprawy aktywności i swoistości CGTazy.

Po raz pierwszy jako nośnik do unieruchomienia CGTazy zastosowano skrobię dialdehydową (DAS), która jest jednym z rodzajów skrobi utlenionej [26]. Utlenianie jest powszechnie stosowaną metodą modyfikacji chemicznej, która wprowadza grupy funkcyjne (np. grupy karbonyłowe i karboksylowe) do skrobi [13]. DAS posiada inne właściwości fizykochemiczne niż skrobia natywna. Podczas utleniania łańcuchy skrobi zwykle ulegają fragmentacji i utlenianiu, zmieniając w ten sposób właściwości fizykochemiczne skrobi (np. właściwości termiczne, właściwości żelowania, właściwości reologiczne, lepkość, siłę pęcznienia i rozpuszczalność w wodzie) [16, 28]. Wprowadzenie grup aldehydowych nadaje skrobi dodatkowe właściwości przeciwutleniające i przeciwdrobnoustrojowe [26], które są ważne w zastosowaniach spożywczych i farmaceutycznych [13, 18].

Ponadto skrobia dialdehydowa wykazuje dobre właściwości sieciujące. Dzięki tym właściwościom funkcjonalnym DAS znalazła zastosowanie w: opakowaniach do żywności, produkcji tworzyw termoplastycznych, unieruchomieniu enzymów, adsorpcji jonów metali ciężkich, dostarczaniu leków, przyleganiu do drewna i garbowaniu skóry. Dodatkowo wysoce reaktywne grupy aldehydowe w DAS mogą reagować z substancjami zawierającymi grupy aminowe i grupy karbonyłowe/hydroksylowe odpowiednio poprzez reakcje otrzymywania zasad Schiffa i aldolowe [8, 10].

Celem pracy było zbadanie zastosowania skrobi dialdehydowej (DAS) jako nośnika CGTazy i otrzymanie biokatalizatora o wyższej aktywności i zmienionej specyficzności w stosunku do produktów, co stanowi punkt odniesienia przy przygotowywaniu innych unieruchomionych enzymów o pożądanym właściwościach.

## **Material i metody badań**

### *Enzym zastosowany do reakcji otrzymywania cyklodekstryn*

Zastosowano enzym CGTazę z *Thermoanaerobacter* sp. (EC 2.4.1.19) w postaci roztworu o komercyjnej nazwie Toruzyme 3.0 L (Novozymes, Dania), który jest 4- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glukano)-transferazą 1,4- $\alpha$ -D-glukanu. Toruzyme 3.0 L katalizuje powstawanie  $\alpha$ - i  $\beta$ -cyklodekstryny w równych ilościach, ale przy dłuższym czasie reakcji dominującym składnikiem staje się  $\beta$ -cyklodekstryna. Optymalna temperatura nie powinna przekraczać 80 ÷ 90 °C, a zakres pH to 5,0 - 6,5.

*Skrobia zastosowana do reakcji otrzymywania cyklodekstryn*

Aktywność katalityczną CGTazy wolnej i immobilizowanej testowano w reakcjach z użyciem skrobi ziemniaczanej (Sigma-Aldrich, Polska).

*Nośnik do immobilizacji CGTazy*

Jako nośnik do immobilizacji CGTazy zastosowano skrobię dialdehydową DAS uzyskaną według procedury, w której przed utlenianiem jodanem(VII) sodu skrobię naświetlano przez 24 godziny światłem widzialnym liniowo spolaryzowanym [20]. Do utleniania zastosowano skrobię ziemniaczaną (Sigma-Aldrich, Polska).

*Oznaczenie zawartości grup aldehydowych*

Zawartość grup aldehydowych w DAS wyznaczono na podstawie miareczkowania kwasem [25]. DAS zmielono, 2,0 g umieszczono w 50 cm<sup>3</sup> wody destylowanej w kolbie o pojemności 250 cm<sup>3</sup> i ogrzewano we wrzącej wodzie przez 60 minut. Następnie roztwór schłodzono i doprowadzono do pH 3,2 za pomocą 0,1 M HCl. Do zawiesiny dodano 30 cm<sup>3</sup> roztworu hydroksyloaminy. Roztwór hydroksyloaminy przygotowano przez rozpuszczenie 25 g chlorowodoru hydroksyloaminy w 100 cm<sup>3</sup> 0,5 M NaOH, a następnie doprowadzono do 500 cm<sup>3</sup> za pomocą wody destylowanej. Na koniec kolbę inkubowano w temperaturze 40 °C w łaźni wodnej przez 5 godz. przy 120 obr./min. Mieszaninę reakcyjną miareczkowano w celu określenia nadmiaru hydroksyloaminy, mianowanym roztworem HCl o stężeniu 0,1 mol/dm<sup>3</sup> do punktu końcowego pH 3,2. Wykonano ślepą próbę z wodą destylowaną i odczynnikiem hydroksyloaminy, stosując tę samą procedurę. Zawartość grup aldehydowych w DAS obliczono, stosując równanie (1):

$$\text{zawartość grup aldehydowych \%} = [100\% \cdot (V_0 - V_p) \cdot C_M \cdot M_W] / (m \cdot 1000) \quad (1)$$

gdzie: V [cm<sup>3</sup>] – objętość roztworu HCl zużytego podczas miareczkowania; C<sub>M</sub> [0,1 mol/dm<sup>3</sup>] – stężenie HCl; M<sub>W</sub> – średnia masa cząsteczkowa powtarzalnej jednostki w skrobi dialdehydowej (161 g/mol); m – masa DAS (2,0 g). Oznaczenie zawartości grup aldehydowych wykonano dla 6 próbek DAS.

*Immobilizacja CGTazy na nośniku DAS*

Do 0,2 ± 0,01 g nośnika dodano 19,50 cm<sup>3</sup> buforu fosforanowego o pH 7,0 i stężeniu 0,03 mol/dm<sup>3</sup> oraz 0,50 cm<sup>3</sup> enzymu i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 120 minut. Następnie mieszaninę przesączono na lejku Büchnera przez sączone celulozowy o średnicy porów 0,2 μm (Whatman). W przesączu po immobilizacji oznaczono ilość białka. Immobilizowaną CGTazę przemywano po kolei roztworami buforowymi: fosforanowym pH 7,0, fosforanowym pH 7,0 + 0,5 M NaCl, octanowym pH 5,5 i TRIS-Cl pH 7,2. Schemat immobilizacji przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat immobilizacji CGTazy na nośniku DAS (opracowanie własne z użyciem programu CorelDRAW 2024)

Figure 1. Diagram of CGTase immobilization on the DAS carrier (own work using CorelDRAW 2024)

### Reakcja otrzymywania cyklodekstryn

Skrobię ziemniaczaną zawieszoną w buforze fosforanowym o pH 5,5 i stężeniu  $0,03 \text{ mol/dm}^3$  ogrzewano w temperaturze  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 10 min. Kleiki skrobiowe o stężeniu  $0,1000 \pm 0,0001 \text{ mg/dm}^3$  termostatowano w temp.  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  i dodano do jednego biokatalizator, do drugiego wolny enzym o aktywność  $0,50 \text{ U/dm}^3$ . Rozpoczęto pomiar czasu reakcji, próbki inkubowano mieszając w temp.  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  i w określonych odstępach czasu, pobierano po  $1,5 \text{ cm}^3$  mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadzono przez 8 godzin. Próbki mieszaniny reakcyjnej ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez  $5 \div 7$  min. Po zakończeniu reakcji enzymatycznej oznaczono stężenie  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -CD metodą HPLC.

Po każdym cyklu reakcji odzyskiwano enzym immobilizowany na nośniku i używano go w kolejnych cyklach z nowymi roztworami skrobi. Każdą reakcję otrzymywania cyklodekstryn wykonano trzy razy.

Wykonano ślepą próbę, w celu sprawdzenia czy DAS ulega reakcji enzymatycznej pod wpływem CGTazy. Reakcję powtórzono 3 razy stosując enzym o trzech różnych aktywnościach :  $0,50 \text{ U/dm}^3$ ,  $1,00 \text{ U/dm}^3$ ,  $1,50 \text{ U/dm}^3$ .

### Sposób oznaczania $\alpha$ -, $\beta$ - i $\gamma$ -CD

Mieszaniny reakcyjne filtrowano przez filtry membranowe z azotanu celulozy o średnicy porów  $5 \text{ }\mu\text{m}$  (Whatman, Wielka Brytania) i analizowano metodą chromatografii HPLC. Zestaw zbudowany był z pompy Shimadzu LC 10A (Shimadzu, Tokio, Japonia), iniektora Rheodyne 1020 (Rheodyne, Palo Alto CA, USA), kolumny Hyperasil APS-2 (Thermoelectron Corp., Londyn, Wielka Brytania;  $300 \text{ mm} \times 4,5 \text{ mm}$ ) i detektora współczynnika załamania światła (L-7490 Merck, Darmstadt, Niemcy). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitryl:woda ( $80:20 \text{ v/v}$ ) z szybkością przepływu  $0,5 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Stężenia cyklodekstryn obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej przy użyciu standardów  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -CD (Sigma-Aldrich, Polska).

### *Oznaczenie zawartości białka metodą Lowry'ego*

Ilość CGTazy unieruchomionej na nośniku wyznaczono metodą Lowry'ego [22] na podstawie różnicy pomiędzy ilością enzymu w próbce do immobilizacji a ilością enzymu pozostającego w roztworze po immobilizacji. Pomiary wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis 2101PC Shimadzu (Japonia), a ilość białka w badanych próbkach obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla tyrozyny jako substancji wzorcowej (Sigma-Aldrich, Polska) w zakresie stężeń  $5 \div 100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Na podstawie oznaczeń obliczono zawartości białka enzymatycznego na powierzchni nośnika DAS.

### *Analiza statystyczna wyników*

Jednoczynnikową analizę wariancji przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA 13 (Dell Inc., Tulsa, USA). Do porównania zawartości cyklodekstryn w mieszaninach reakcyjnych wykorzystano test HSD Tukeya. Porównanie średnich przeprowadzono na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## **Wyniki i dyskusja**

### *Zawartość grup aldehydowych w DAS*

Zawartość grup aldehydowych w DAS użytej do immobilizacji CGTazy wynosiła  $36,4 \pm 0,72 \%$  ( $p < 0,05$ ); jest to stosunkowo wysoka zawartość grup aldehydowych w porównaniu z danymi literaturowymi ( $5,1 \div 20,2 \%$ ) [21]. Wysoki stopień utlenienia skrobi i duża zawartość grup C=O ograniczyły selektywność substratową CGTazy w stosunku do DAS. W żadnej z próbek nie stwierdzono obecności cyklodekstryn w mieszaninach reakcji wykonanych jako ślepa próba czyli DAS z CGTazą.

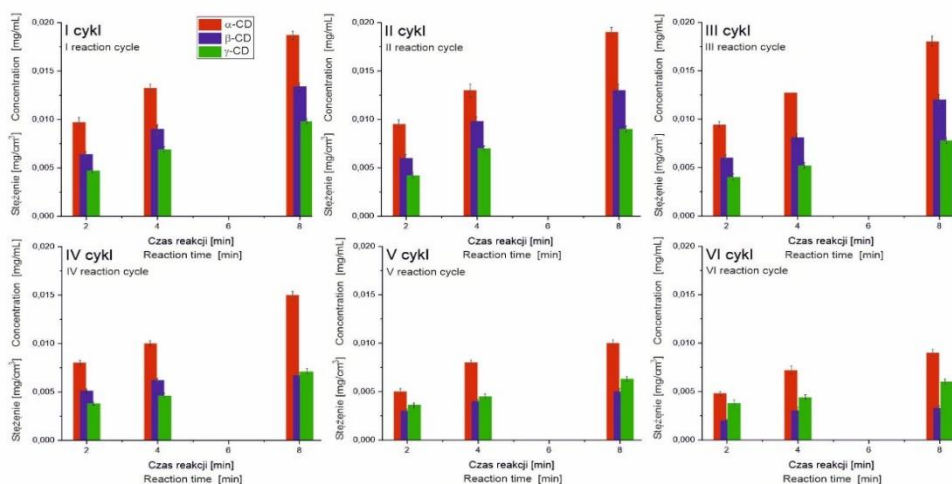
### *Ilość enzymu immobilizowanego na nośniku*

Ilość enzymu unieruchomionego na DAS określono jako procent wyznaczony z próbki roztworu użytego do immobilizacji. Na nośniku immobilizacji uległo  $86 \pm 6,7 \%$  zastosowanego preparatu enzymatycznego. Odpowiadało to ilości wolnej CGTazy pozwalającej uzyskać aktywność w reakcji wynoszącą  $0,50 \pm 0,039 \text{ U}/\text{cm}^3$ .

### *Badania aktywności biokatalizatora CGTaza-DAS*

Wykonano reakcje otrzymywania cyklodekstryn z zastosowaniem CGTazy unieruchomionej na skrobi dialdehydowej. Biokatalizator zastosowano w sześciu cyklach reakcji (rysunek 2). W trzech pierwszych cyklach reakcji otrzymano najwięcej  $\alpha$ -CD  $>$   $\beta$ -CD  $>$   $\gamma$ -CD. Od IV cyklu reakcji zmienia się stosunek ilości cyklodekstryn  $\alpha$ -CD  $>$   $\gamma$ -CD  $>$   $\beta$ -CD. Uzyskany biokatalizator CGTaza-DAS został użyty w reakcji wielokrotnie i był on aktywny w sześciu cyklach reakcji (rycina 2). Biokatalizatora nie za-

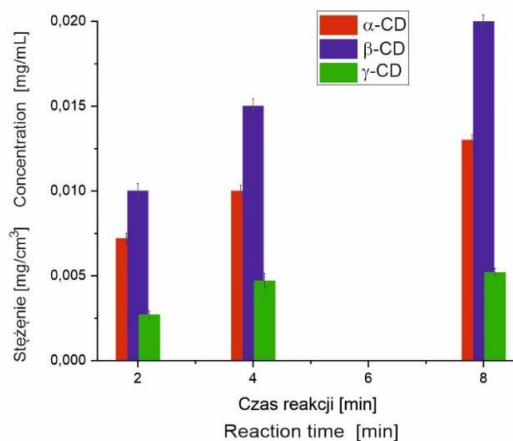
stosowano w siódmym cyklu, nie z powodu utraty aktywności, lecz z powodu utrudnionego odzyskania z mieszaniny, wynikającego z dużej rozpuszczalności w wodzie w porównaniu ze skrobią natywną.



Rycina 2. Zależność stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji: ■  $\alpha$ -CD, ■  $\beta$ -CD, ■  $\gamma$ -CD, I-VI cykl reakcji z zastosowaniem biokatalizatora CGTaza-DAS

Figure 2. Dependence of cyclodextrin concentration on reaction time: ■  $\alpha$ -CD, ■  $\beta$ -CD, ■  $\gamma$ -CD, I-VI reaction cycle with the use of biocatalyst CGTase-DAS

Na rycinie 3 przedstawiono zależność stężenia cyklodekstryn  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  od czasu reakcji katalizowanej CGTazą w stanie wolnym.



Rycina 3. Zależność stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji: ■  $\alpha$ -CD, ■  $\beta$ -CD, ■  $\gamma$ -CD w reakcji z wolną CGTazą

Figure 3. Dependence of cyclodextrin concentration on reaction time: ■  $\alpha$ -CD, ■  $\beta$ -CD, ■  $\gamma$ -CD in the reaction with free CGTase

W wyniku reakcji katalizowanej wolną CGTazą otrzymano najwięcej  $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD >  $\gamma$ -CD. Ilość cyklodekstryn otrzymanych w poszczególnych reakcjach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wydajność reakcji otrzymywania cyklodekstryn z zastosowaniem CGTazy wolnej i immobilizowanej na DAS

Table 1. Efficiency of reaction for obtaining cyclodextrins using free and immobilized CGTase on DAS

CGTaza		Produkty / Products	Wydajność reakcji po 8 godz. / Reaction yield after 8 hours $\times 10^{-3}$ [mg/cm <sup>3</sup> ]	Stosunek otrzymanych CD / CD Received Ratio $\alpha : \beta : \gamma$
Immobilizowana / immobilized	I cykl / cycle	$\alpha$ -CD	18,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,37	1,9 : 1,4 : 1
		$\beta$ -CD	13,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21	
		$\gamma$ -CD	9,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	
	II cykl / cycle	$\alpha$ -CD	19,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	2,1 : 1,45 : 1
		$\beta$ -CD	13,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	
		$\gamma$ -CD	9,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09	
	III cykl / cycle	$\alpha$ -CD	18,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	2,3 : 1,54 : 1
		$\beta$ -CD	12,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14	
		$\gamma$ -CD	7,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	
	IV cykl / cycle	$\alpha$ -CD	15,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	2,2 : 1 : 1
		$\beta$ -CD	7,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05	
		$\gamma$ -CD	7,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03	
	V cykl / cycle	$\alpha$ -CD	10,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	1,6 : 0,78 : 1
		$\beta$ -CD	4,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02	
		$\gamma$ -CD	6,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	
	VI cykl / cycle	$\alpha$ -CD	9,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09	1,48 : 0,54 : 1
		$\beta$ -CD	3,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02	
		$\gamma$ -CD	6,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02	
nieimmobilizowana / not immobilized	$\alpha$ -CD	13,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21	2,5 : 4 : 1	
	$\beta$ -CD	20,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19		
	$\gamma$ -CD	5,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05		

Objaśnienia / Explanatory notes:

Średnie  $\pm$  odchylenie standardowe; wartości liczbowe w wierszu oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy  $p < 0,05$  ( $n = 3$ ) / Means  $\pm$  standard deviation; numerical values in the line labelled with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$  ( $n = 3$ ).

Sumarycznie we wszystkich sześciu cyklach reakcji katalizowanej CGTazą immobilizowaną otrzymano 0,1297 mg/cm<sup>3</sup>  $\alpha$ -CD, 0,0537 mg/cm<sup>3</sup>  $\beta$ -CD i 0,0461 mg/cm<sup>3</sup>  $\gamma$ -CD, co stanowi odpowiednio 998 %, 256 % i 883 % więcej niż w przypadku reakcji katalizowanej enzymem wolnym.



## Wnioski

1. Skrobię dialdehydową (DAS) otrzymaną w wyniku utleniania skrobi ziemniaczanej zastosowano jako nośnik do immobilizacji enzymu. Dzięki wysokiej zawartości grup aldehydowych (36,4 %) CGTaza była nieaktywna katalitycznie w stosunku do DAS. Opracowano optymalne warunki reakcji umożliwiające immobilizację CGTazy na dialdehydowej skrobi.
2. Uzyskano aktywny biokatalizator CGTaza-DAS, którego wielokrotnie użyto w reakcji otrzymywania cyklodekstryn. Biokatalizator wykazywał aktywność w sześciu cyklach reakcji. Uzyskano wyższą wydajność w czterech cyklach reakcji katalizowanych immobilizowaną CGTazą. W V i VI cyklu biokatalizator nadal był aktywny, ale reakcja przebiegała z mniejszą wydajnością w porównaniu z reakcją z enzymem nieimmobilizowanym.
3. Zaobserwowano zmianę stosunku otrzymywanych cyklodekstryn  $\alpha:\beta:\gamma$ . W reakcji z enzymem nieimmobilizowanym uzyskano najwięcej  $\beta$ -CD, a w reakcjach katalizy heterogenicznej w cyklach I-III otrzymano więcej  $\alpha$ -CD. W kolejnych cyklach wydajność  $\gamma$ -CD była większa niż  $\beta$ -CD.
4. Dzięki wielokrotnemu zastosowaniu heterogenicznej biokatalizy znacznie zwiększono ilość otrzymanych cyklodekstryn 998 % więcej  $\alpha$ -CD, 256 %  $\beta$ -CD i 883 %  $\gamma$ -CD.
5. Zaprezentowany biokatalizator CGTaza-DAS może być z sukcesem zastosowany w procesach technologicznych w celu obniżenia kosztów otrzymywania cyklodekstryn. Ukierunkowana zmiana enzymu w wyniku immobilizacji może stać się cennym podejściem do generowania enzymów dostosowanych do potrzeb klienta.

## Literatura

- [1] Aree T.: Understanding structures and thermodynamics of  $\beta$ -cyclodextrin encapsulation of chlorogenic, caffeic and quinic acids: implications for enriching antioxidant capacity and masking bitterness in coffee. *Food Chem.*, 2019, 293, 550-560.
- [2] Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B.: The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, D233-238.
- [3] Carmo C.S., Maia C., Poejo J., Lychko I., Gamito P., Nogueira I., Bronze M.R., Serra A.T., Duarte C.M.M.: Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol with zein and  $\beta$ -cyclodextrin using spray drying for colour stability and shelf-life improvement of fruit beverages. *RSC Adv.*, 2017, 7, 32065-32075.
- [4] [Carmo C.S., Pais R., Simplício A.L., Mateus M., Duarte C.M.M.: Improvement of aroma and shelf-life of non-alcoholic beverages through cyclodextrins-limonene inclusion complexes. *Food Bioproc. Technol.*, 2017, 10, 1297-1309.

- [5] Carvalho Batista Muniz I., Barbosa Santos J., Moura de Oliveira R., Godoy Santos F., Cardozo de Souza Junior E., Oyama L., da Costa Ilh'eu Fontan R., Ferreira Bonomo R.C.: Current advances in obtaining novel cyclodextrin glycosyltransferases for optimizing the synthesis of cyclodextrins. *Process Biochem.*, 2024, 145, 95-209.
- [6] Chen H., Li L., Ma Y., McDonald T.P., Wang Y.: Development of active packaging film containing bioactive components encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin and its application. *Food Hydrocoll.*, 2019, 90, 360-366.
- [7] Ding W., Wu Y.: Sustainable dialdehyde polysaccharides as versatile building blocks for fabricating functional materials: an overview. *Carbohydr. Polym.*, 2020, 248, #116801.
- [8] Dong Q., Yuan E., Huang M., Zheng J.: Increased solubility and taste masking of a ternary system of neodiosmin with  $\beta$ -cyclodextrin and lysine. *Starch/Staerke*, 2017, 69, 5-6, #1600322.
- [9] Falsafi S.R., Topuz F., Rostamabadi H.: Dialdehyde carbohydrates—advanced functional materials for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.*, 2023, 321(9), #121276.
- [10] Ghorbanzade T., Akhavan-Mahdavi S., Kharazmi M.S., Ibrahim S.A., Jafari S.M., Loading of fish oil into  $\beta$ -cyclodextrin nanocomplexes for the production of a functional yogurt, *Food Chemistry*, 2022,
- [11] Ho S., Thoo Y.Y., Young D.J., Siow L.F.: Stability and recovery of cyclodextrin encapsulated catechin in various food matrices. *Food Chem.*, 2019, 275, 594-599.
- [12] Hu, H., Yong H., Yao X., Yun D., Huang J., Liu J.: Highly efficient synthesis and characterization of starch aldehyde-catechin conjugate with potent antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, 173, 13-25.
- [13] Jicsinszky L., Martina K., Cravotto G.: Cyclodextrins in the antiviral therapy. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2021, 64, #102589.
- [14] Khushbu R., Dimple P., Khushali T., Jaimini P., Kiransinh R., Rushikesh J.: A review on recent upgradation and strategies to enhance cyclodextrin glucanotransferase properties for its applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2024, 259, #129315.
- [15] Kuchaiyaphum P., Chotichayapong C., Butwong N., Bua-Ngern W.: Silk fibroin/poly (vinyl alcohol) hydrogel cross-linked with dialdehyde starch for wound dressing applications. *Macromol. Res.*, 2020,
- [16] 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, 28, 844-850.
- [17] Li Y., Wang J.-H., Han Y., Yue F.-H., Zeng X.-A., Chen B.-R., Zeng M.-Q., Woo M.-W., Han Z.: The effects of pulsed electric fields treatment on the structure and physicochemical properties of dialdehyde starch. *Food Chem.*, 2023, 408, 135231.
- [18] Oliveira A.C., de Lima G.R.F., Klein R.S., Souza P.R., Vilsinski B.H., Garcia F.P., Nakamura C.V., Martins A.F.: Thermo- and pH-responsive chitosan/gellan gum hydrogels incorporated with the  $\beta$ -cyclodextrin/curcumin inclusion complex for efficient curcumin delivery. *React. Funct. Polym.*, 2021, 165, #104955.
- [19] Para A., Konieczna-Molenda A.: Starch dialdehyde from potato starch illuminated with linearly polarized visible light. *Carbohydr. Polym.*, 2010, 79, 445-448.
- [20] Rahman N.H.A., Jaafar N.R., Annuar N.A.S., Rahman R.A., Murad A.M.A., El-Enshasy H.A., Illias R.M.: Efficient substrate accessibility of cross-linked levanase aggregates using dialdehyde starch as a macromolecular cross-linker. *Carbohydr. Polym.*, 2021, 267, 118159.
- [21] Shen Y.X., Xiao K., Ling P., Ma Y.W., Huang X.: Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 2013, 97(9), 4167-4178.

- [22] Simionato I., Domingues F.C., Nerin C., Silva F.: Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin nanosponges and their potential use for antimicrobial food packaging. *Food Chem. Toxicol.*, 2019, 132, #110647.
- [23] Vilanova N., Solans C.: Vitamin A Palmitate- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: Characterization, protection and emulsification properties. *Food Chem.* 2015, 175, 529-535.
- [24] Wongsagon R., Shobsngob S., Varavinit S.: Preparation and physicochemical properties of dialdehyde tapioca starch. *Starch/Staerke*, 2005, 57, 3-4, 166-172.
- [25] Yong H., Liu J.: Recent advances on the preparation conditions, structural characteristics, physicochemical properties, functional properties and potential applications of dialdehyde starch: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2024, 259, #129261.
- [26] Yong H., Bai R., Bi F., Liu J., Qin Y., Liu J.: Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities of starch aldehyde-querceetin conjugate. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 156, 462-470.
- [27] Zuo Y., Liu W., Xiao J., Zhao X., Zhu Y., Wu Y.: Preparation and characterization of dialdehyde starch by one-step acid hydrolysis and oxidation, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, 103, 1257-1264.

#### APPLICATION OF CYCLODEXTRIN GLUCOSYLTRANSFERASE (CGTASE) IMMOBILIZED ON DIALDEHYDE STARCH (DAS) FOR OBTAINING CYCLODEXTRINS

##### S u m m a r y

**Background.** Enzyme immobilization on a support can bring benefits not only due to cost reduction through reuse or ensuring process continuity, but also by changing the specificity of the catalyst for products. A major challenge in enzymatic reactions is the variability of the specificity of the amount of products, which makes the widespread use of enzymatic reactions difficult, increases the costs of product separation and purification. A directed change of enzymes, for example by immobilization, has become a valuable approach to generating enzymes tailored to customer needs.

**Results and conclusions.** This paper presents studies on the immobilization of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) EC 2.4.1.19 on dialdehyde starch (DAS), obtained by oxidation of potato starch. Due to the high content of aldehyde groups, CGTase was catalytically inactive towards dialdehyde starch. The CGTase-DAS biocatalyst obtained as a result of immobilization was active in six reaction cycles of obtaining cyclodextrins from potato starch. Higher efficiency than in homogeneous catalysis was obtained in four reaction cycles catalyzed by immobilized CGTase. The biocatalyst was still active in the subsequent cycles, but the reaction proceeded with lower efficiency compared to the reaction with the enzyme in the free state. A change in the ratio of obtained  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$  cyclodextrins was observed. The most  $\beta$ -CD was obtained in the reaction with the non-immobilized enzyme. More  $\alpha$ -CD was obtained in the reaction with the heterogeneous catalyst in cycles I-III, in subsequent cycles the efficiency of  $\gamma$ -CD was higher than  $\beta$ -CD. Due to the multiple use of the heterogeneous biocatalyst, the total amount of obtained cyclodextrins was significantly increased. The presented CGTase-DAS biocatalyst can be successfully used in technological processes to reduce the costs of obtaining cyclodextrins.

**Key words:** immobilization, CGTase, dialdehyde starch DAS, cyclodextrins 