

ИЗОПРОПАНОЛ – ЭФФЕКТИВНЫЙ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАТЕЛЬ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ЦИКЛОДЕСТРИНОВ

П.Ю. Мильман, Е.А. Гильванова

Полина Юрьевна Мильман (ORCID 0000-0001-6379-7094)*, Елена Альбертовна Гильванова
Уфимский Институт биологии Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, просп. Октября, 69, Уфа, Российская Федерация, 450054
E-mail: milman.polina@gmail.com *, gelena@anrb.ru

*В качестве комплексобразователя для биотехнологии циклодекстринов предложен изопропанол. Показано, что данный сольвент обладает универсальным сродством по отношению к альфа- (α -), бета- (β -) и гамма- (γ -) гомологам циклодекстринов, что приводит к увеличению выходов в равной степени всех циклических форм. Исследуемый комплексант проявил положительный и независимый от специфичности циклизующих ферментов эффект в процессе трансформации крахмала. Выбор основного фермента циклодекстринглюканотрансферазы бактерии *Raenibacillus ehimensis* IB-739 связан с его кинетической особенностью образовывать гомологи циклодекстринов, имея стабильное и независимое от концентрации субстрата соотношение $\alpha:\beta:\gamma$ (32,7:50,3:17,0%) на выходе конверсионного процесса. Полученная с участием данного фермента смесь циклодекстринов, состоящая из трех форм, особенно востребована в процессах, где требуется получить комплекс с веществами, состав которых не является гомогенным. Синергетический эффект сольвента (5 %об.) и фермента циклодекстринглюканотрансферазы бактерии *R. ehimensis* IB-739 обеспечивал трансформацию 10%-ного картофельного крахмала с выходом циклодекстринов до 77%. Комплексант имеет ряд технических, экономических и экологических преимуществ. Во-первых, низкая токсичность, позволяющая избежать сложностей дальнейшей глубокой очистки циклодекстринов от следовых количеств растворителя (не более 1-3 промилле). Во-вторых, хорошая растворимость в воде, снижающая энергозатраты на перемешивание реакционной среды. В-третьих, присутствие изопропанола в реакционной смеси смягчает требования к асептике процесса. В-четвертых, невысокая стоимость и доступность комплексанта, производство в РФ которого превышает 30 тыс. т/г. В-пятых, температура кипения азеотропной смеси изопропанол: вода составляет 80,4 °С, что обуславливает достаточно низкие затраты на регенерацию сольвента.*

Ключевые слова: циклодекстрин, циклодекстринглюканотрансфераза, комплексобразователь, сольвент, изопропиловый спирт, изопропанол

ISOPROPANOL IS AN EFFECTIVE COMPLEXING AGENT FOR CYCLODEXTRIN BIOTECHNOLOGY

P.Yu. Milman, E.A. Gilvanova

Polina Yu. Milman (ORCID 0000-0001-6379-7094)*, Elena A. Gilvanova
Ufa Institute of Biology of Ufa Federal Research Center of the RAS, Oktyabrya ave., 69, Ufa, 450054, Russia
E-mail: milman.polina@gmail.com *, gelena@anrb.ru

Isopropanol has been proposed as a complexing agent for the biotechnology of cyclodextrins. It has been shown that this solvent has a universal affinity for the alpha- (α -), beta- (β -) and gamma- (γ -) homologues of CD, which leads to an increase in the yields of all cyclic forms equally.

The investigated complexant showed a positive effect independent of the specificity of cyclizing enzymes in the process of starch transformation. The choice of the main enzyme (CGTase) of the bacterium Paenibacillus ehimensis IB-739 is associated with its kinetic characteristic to form CD homologues, having a stable $\alpha:\beta:\gamma$ ratio independent of the substrate concentration (32.7:50.3:17.0%) at the exit of the conversion process. The mixture of cyclodextrins obtained with the participation of this enzyme, consisting of three forms, is especially in demand in processes where it is required to obtain a complex with substances whose composition is not homogeneous. The synergistic effect of the solvent (5%vol.) and the enzyme CGTase of the bacterium P. ehimensis IB-739 ensured the transformation of 10% potato starch with a CD yield of up to 77%. The complexing agent has a number of technical, economic and environmental advantages. Firstly, low toxicity, which makes it possible to avoid the difficulties of further deep purification of CD from trace amounts of solvent (no more than 1-3 ppm). Secondly, good solubility in water, which reduces energy consumption for stirring the reaction medium. Third, the presence of isopropanol in the reaction mixture softens the requirements for aseptic process. Fourth, the low cost and the availability of the complexant, the production of which in Russia exceeds 30 thousand tons per year. Fifth, the boiling point of the isopropanol: water azeotropic mixture is 80.4 °C, which leads to a fairly low cost of solvent regeneration.

Key words: cyclodextrin, cyclodextrin glucanotransferase, complexing agent, solvent, isopropyl alcohol, isopropanol

Для цитирования:

Мильман П.Ю., Гильванова Е.А. Изопропанол – эффективный комплексообразователь для биотехнологии циклодекстринов. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2022. Т. 65. Вып. 1. С. 76–82

For citation:

Milman P.Yu., Gilvanova E.A. Isopropanol is an effective complexing agent for cyclodextrin biotechnology. *ChemChemTech [Изв. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2022. V. 65. N 1. P. 76–82

ВВЕДЕНИЕ

Циклодекстрины (ЦД) – это циклические олигосахариды, получаемые ферментативным путем из крахмала. Наиболее известны α -, β - и γ -ЦД, состоящие соответственно из 6, 7 и 8 остатков D-глюкопиранозы, связанных α -1,4-гликозидными связями. Молекулы ЦД имеют гидрофильную внешнюю поверхность и сквозную гидрофобную полость. Гидрофильная поверхность обуславливает хорошую растворимость циклических олигосахаридов в воде, а полость является своеобразной ловушкой неполярных субстанций [1-3]. Способность ЦД образовывать комплексы включения с различными неорганическими, органическими соединениями и биологически активными веществами позволяет увеличивать их растворимость в водных средах, устойчивость к окислению и гидролизу, позволяет создавать пролонгированные формы лекарственных препаратов, обеспечивать более длительный срок их хранения и т.д. [4-8].

ЦД являются типично биотехнологической продукцией. Их получение включает в себя этап культивирования микроорганизмов, продуцирующих циклодекстринглюканотрансферазу (ЦГТазу),

стадию частичной или полной очистки этого фермента, энзиматической трансформации крахмала, очистки и выделения индивидуальных продуктов – ЦД. Ферментативная обработка крахмала осуществляется микробными ферментами класса циклодекстринглюканотрансфераз (ЦГТаз, КФ 2.4.1.19). В ходе реакции в конверсионной смеси накапливаются ЦД, ингибирующие рабочий фермент и уменьшающие степень конверсии таким образом, что даже в лучших технологических решениях биосинтез β -ЦД (основного коммерческого продукта в ряду ЦД) малоэффективен и его выход не превышает 20-30% от взятого субстрата (крахмала) [9]. Для увеличения степени конверсии крахмала в реакционную смесь вводят комплексообразователи (сольвенты, растворители, комплексанты), реагирующие с ЦД с образованием нерастворимых клатратных комплексов в виде кристаллического осадка. Равновесие реакции от присутствия комплексообразователя сдвигается в сторону увеличения выхода ЦД. Сольвент является специфичным, если после его введения возрастает выход лишь одной формы из трех. К известным специфичным сольвентам относятся толуол, широко используе-

мый в технологии бета-ЦД; деканол-1 и циклогексаден-8-ен-1-ол, способствующий накоплению α - и γ -гомологов ЦД соответственно [10-13]. В то же время существуют комплексообразователи, не образующие нерастворимых комплексов с ЦД, а лишь динамически взаимодействующие с гидрофобными участками поверхности снаружи их молекул. К таким сольвентам относят метиловый, этиловый и изопропиловый спирты, ацетон и некоторые другие [3].

Ограниченная растворимость β -ЦД (1,85 г/100 мл при 25 °С) способствовала созданию химических модификаций ЦД. Наиболее удачным можно считать синтез гидроксипропилированных производных (ГП- β -ЦД), имеющих различную степень замещения. В присутствии ГП- β -ЦД улучшается биодоступность и повышается водорастворимость многих лекарственных соединений, что является перспективным для его использования в фармацевтике [1, 14, 15].

Для нужд пищевой, фармацевтической промышленности и сельскохозяйственной отрасли возникает необходимость получить комплексы ЦД с веществами, состав которых не является гомогенным. Это могут быть вытяжки или экстракты растений, ароматические вещества природного происхождения и др. В этом случае использование индивидуальных ЦД не обеспечивает полноту включения всех компонентов системы и, тем самым, ограничивает потенциальные возможности получения комплексов. Таким образом, задача поиска новых эффективных, малотоксичных и недорогих сольвентов, позволяющих с высоким выходом осуществить конверсию крахмала одновременно в смесь трех гомологов ЦД, и на сегодняшний день остается актуальной.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для получения ЦД использовали ЦГТазы бактерий, *P. ehimensis* IB-739, *P. illinoisensis* IB-1087, *P. macerans* IB-14 из коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Для продуцентов ЦГТаз проведена таксономическая идентификация методом анализа гена 16S рРНК, прочитанные последовательности депонированы в Генбанке (NCBI) под номерами FN582329.1, FN422001.1 и AM406669.1 соответственно.

Наработку ЦГТазы исследуемых культур осуществляли в 250 мл качалочных колбах, содержащих 60 мл среды, при скорости 250 об/мин и температуре 40 °С в течение 68-72 ч на шейкер-инкубаторе Innova 40R («New Brunswick Scientific», USA), на среде, содержащей (% масс.): крахмал

картофельный – 1,0; пептон – 0,4; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,1; Na_2HPO_4 – 0,1; CaCO_3 – 0,5; при стартовых рН 7,4-7,6.

Культуральную жидкость (КЖ) освобождали от клеток центрифугированием и сгущали на волоконном ультрафильтре ВПУ-50 с пределом отсека 50 кДа, далее концентрат подвергали лиофильной сушке в аппарате «ИНЕЙ-6» (Россия).

ЦГТазную активность измеряли спектрофотометрическим методом и выполняли в стеклянных кюветах с длиной оптического пути 1 см на приборе СФ-56 («ЛОМО», Россия) с системой интерфейса на базе персонального компьютера при ширине щели монохроматора 1 нм. Повторность единичных измерений пятикратная, с последующим усреднением результата. За 1 единицу активности ЦГТазы принимали количество фермента, катализировавшего образование 1 мкМ β -ЦД из 2%-ного раствора картофельного крахмала (рН 5,9) в течение 1 мин при 40 °С [16].

Трансформацию крахмала в ЦД осуществляли в 180 мл герметичных стеклянных реакторах с рубашкой термостатирования и магнитным устройством перемешивания. Коэффициент заполнения биореактора составляет 0,45-0,6. Клейстеризованный картофельный крахмал необходимой концентрации (10-20% по АСВ) вносили в реактор весовым методом, затем в реакционную смесь добавляли препарат ЦГТазы из расчета 12 ед/г АСВ субстрата, перемешивали в течение 6 ч, после чего вносили необходимое количество комплексообразующего сольвента. Реакцию трансформации проводили при температуре 50-55 °С в течение 68-72 ч. Для удаления основной массы растворителя перед ВЭЖХ анализом пробы упаривали в открытом стакане на 50%.

Количественное определение ЦД в продуктах конверсии осуществляли методом ВЭЖХ при помощи прибора ГПЦ (Чехия), на колонке Serapon SGX-NH2 (150×3,3мм×7мкм). Перед измерением, исследуемые пробы разбавляли ацетонитрилом 1:1 по объему, осадок удаляли центрифугированием. Подачу элюента (ацетонитрил : вода 63:37 по объему) осуществляли с помощью насоса высокого давления НРР-5001 со скоростью 0,7 мл/мин. В качестве детектора использовали проточный рефрактометр RIDK-102. Сигнал детектора регистрировали аналого-цифровым преобразователем ADC 7710, обработку хроматограмм осуществляли в программе «Мультихром 1.70».

Остаточные растворители в продуктах конверсии определяли при помощи ГЖХ на хроматографе Кристалл 5000.1 в капиллярной кварцевой

колонке Rtx®-1 PONA 100м×0,25мм×0,5 мкм, с использованием гелия в качестве газа носителя и пламенно-ионизационного детектора. Порцию конверсионной смеси (30 г) помещали в открытый 75 мл стакан, затем упаривали жидкость на 50% по массе, используя магнитную мешалку с подогревом при 100 об/мин. Порцию 100 мкл реакционного раствора переносили в 20 мл мерную колбу, добавляли 100 мг хлорида кальция и 3000 ед. бактериальной α -амилазы (для гидролиза ЦД), разбавляли дистиллированной водой до необходимого объема и подвергали 6 ч инкубации при 50 °С в закрытой колбе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Источниками редкого (уникального) фермента ЦГТазы почти всегда служат аэробные спорообразующие бактерии родов *Bacillus* и *Paenibacillus*. ЦГТазы из известных бактериальных источников катализируют трансформацию крахмала одновременно в смесь гомологов ЦД. В зависимости от того, какой продукт доминирует в продуктах конверсии, различают α -, β - и γ -ЦГТазы, кинетические параметры которых в свою очередь зависят от ге-

нетически-видовых особенностей штамма-продуцента [17]. Таким образом, бактериальный источник ЦГТазы является ключевым фактором для получения разных типов ЦД, наряду с такими параметрами как тип используемого субстрата, температура и pH реакции конверсии [18, 19].

В качестве продуцента, секретирующего ЦГТазу широкой специфичности, т.е. катализирующего одновременное образование α -, β - и γ -ЦД, в работе использован штамм циклодекстриногенных бактерий *P. ehimensis* IB-739. Данный фермент отличается от ЦГТаз продуцентов других видов и родов достаточно стабильным соотношением индивидуальных форм ЦД при различных соотношениях фермент/субстрат (α : β : γ = 32,7:50,3:17,0%), и по всей вероятности эта уникальная кинетическая особенность присуща именно ЦГТазам вида *Paenibacillus ehimensis* [20] (Табл. 1). Суммарный выход ЦД после «чистой» (без сольвента) конверсии крахмала с участием этого фермента не превышает 50%. Это связано с тем, что ЦД, накапливаясь в реакторе, ингибируют прямое ферментативное действие ЦГТазы, в результате чего большая часть исходного субстрата остается нетрансформированной.

Таблица

Результаты конверсии 10%-ного (АСВ) картофельного крахмала различными типами ЦГТаз из *Paenibacillus* в присутствии изопропанола

Table. Results of conversion of 10% (ADW) potato starch by different types of CGTases from *Paenibacillus* in the presence of isopropanol

Источник ЦГТазы (соотношение α -: β -: γ -ЦД, %)	Концентрация изопропанола, % об.	Общий выход ЦД, % масс.	Выход ЦД (α -: β -: γ -) по отношению к АСВ субстрату, % масс.
<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739 (32,7: 50,3: 17,0)	5%	77	22,8 : 42,4 : 11,7
	контроль	45	14,7 : 22,6 : 7,65
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> IB-1087 (17,8: 70,1: 12,1)	5	72	11,0 : 52,7 : 8,2
	контроль	48	8,7 : 33,6 : 5,2
<i>Paenibacillus macerans</i> IB-I4 (37,6: 52,4: 10,0)	5	68	21,1 : 39,4 : 7,5
	контроль	46	17,2 : 24,1 : 4,6

Для снятия ингибирующего действия ЦД на ЦГТазу в процессе ферментативной конверсии в реакционную смесь дополнительно вносят комплексообразователь, взаимодействующий с циклическими олигосахаридами [11, 21]. Циклические продукты, накапливающиеся в процессе ферментативной реакции, реагируют с введенным комплексообразователем. При этом концентрация ЦД в реакционной смеси на протяжении всей реакции остается низкой, а степень трансформации крахмала в циклические продукты существенно возрастает.

Определяющим фактором при выборе комплексообразователя являлось отсутствие специфичности по отношению к гомологам ЦД, что выразилось в возрастании выходов всех циклических форм. В то же время, учитывались такие характеристики сольвента, как токсичность, во избежание дальнейшей сложности глубокой очистки ЦД от следовых количеств растворителей, доступность и его невысокая стоимость.

В качестве альтернативы подходу, основанному на использовании токсичных и высококипящих комплексообразователей, предложены орга-

нические соединения, относящиеся к группе химических ингредиентов, официально разрешенных к применению в пищевой промышленности. В частности, для увеличения выхода ЦД предложено использовать этиловый, изопропиловый и другие спирты. Отличительной особенностью низших алифатических спиртов является то, что они в неограниченных пропорциях растворимы в воде и не образуют нерастворимых кристаллических комплексов с ЦД. Молекулы спиртов лишь динамически взаимодействуют с гидрофобными участками поверхности молекул ЦД. После введения в реакционную смесь этанола или изопропанола между поверхностью молекул ЦД и спиртов формируются нестойкие сольватные агрегаты, которые без особых проблем разрушаются при нагревании. Формирование надмолекулярных сольватных комплексов до некоторой степени затрудняет повторное связывание циклических олигосахаридов с активным центром ЦГТазы, ингибирует реакцию раскрытия кольца или их трансформации в другие гомологи, в результате чего выход суммы ЦД возрастает [22].

В качестве комплексообразователя был использован изопропиловый спирт. В таблице приведены данные по конверсии 10%-ного картофельного крахмала α -специфичной *P. macerans* IB-14, β -специфичной *P. illinoisensis* IB-1087 и ЦГТазой широкой специфичности *P. ehimensis* IB-739 в присутствии изопропанола (5% об.). Показано, что использование изопропилового спирта приводит к увеличению общего выхода ЦД, при этом сольвент способствуют образованию одновременно трех гомологов ЦД, практически не сдвигая равновесного соотношения, заложенного на генетически-видовом уровне.

По данным других исследователей, присутствие 20% изопропанола при конверсии 2%-ного растворимого крахмала β -специфичной ЦГТазой *Paenibacillus* sp. A11 и α -специфичной *P. macerans* ЦГТазой также приводило к увеличению выхода всех трех гомологов ЦД, не вызывая смещения равновесия между ЦД [23].

Для увеличения выхода ЦД была проведена ферментативная конверсия 10%-ного картофельного крахмала ЦГТазой *P. ehimensis* IB-739 в присутствии изопропилового спирта различной концентрации (от 5 до 10% об.) (рисунок).

Добавление изопропилового спирта в количестве 5% об. от объема реакционной смеси обеспечивало выход ЦД до 77%, тогда как безсольвентная конверсия крахмала не превышала 45%. Дальнейшее увеличение концентрации изопропанола,

приводило к плавному (постепенному) снижению общего выхода ЦД, но даже присутствие 10% об. сольвента способствовало росту общего выхода циклических продуктов на 24%.

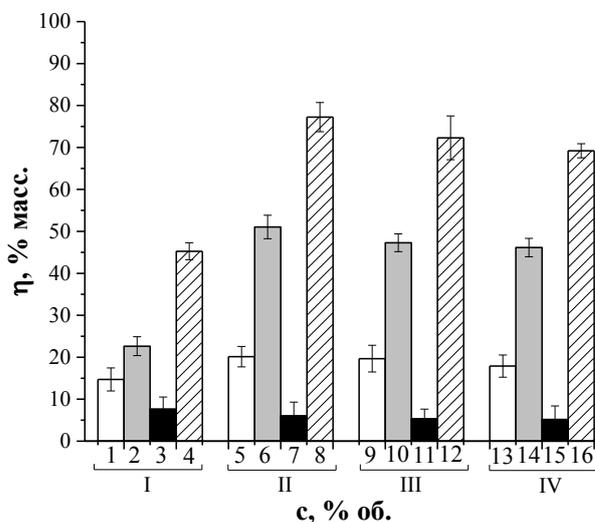


Рис. Образование ЦД из 10%-ного картофельного крахмала ЦГТазой *P. ehimensis* IB-739 в присутствии различных концентраций изопропанола: I – контрольный образец без добавления сольвента; II – 5% об.; III – 7,5% об.; IV – 10% об. Выход α -ЦД (1,5,9,13) обозначены белым цветом, β -ЦД (2,6,10,14) – светло-серым, γ -ЦД (3,7,11,15) – черным, суммарный выход ЦД (4,8,12,16) – белым с рисунком

Fig. Formation of CD from 10% potato starch by CGTase *P. ehimensis* IB-739 in the presence of various concentrations of isopropanol: I – control sample without addition of solvent; II – 5% vol.; III – 7.5% vol.; IV – 10% vol. Yields of α -CD (1,5,9,13) are designated in white, β -CD (2,6,10,14) – light gray, γ -CD (3,7,11,15) – black, total CD yield (4,8,12,16) – white with pattern

Универсальность изопропанола в качестве сольвента проявляется не только в отношении различной специфичности циклизующих ферментов, но и в отношении концентрации и типа субстрата. Так, группой исследователей Lisco и др. проведена конверсия 15%-ного мальтодекстрина с α -специфичной ЦГТазой *P. macerans* с участием изопропанола (0,5-3% об.) [24]. Присутствие изопропанола увеличивало общий выход ЦД в 2 раза, при этом соотношение α -, β -, γ -ЦД не изменялось и количество всех ЦД увеличивалось в 1,5-2,5 раза в зависимости от концентрации сольвента. В нашем случае, добавление 5% об. изопропанола вызвало конгруэнтное повышение выходов индивидуальных гомологов ЦД без смещения соотношения α : β : γ , и увеличения общего выхода в 1,7 раза. Таким образом, показано, что изопропанол не проявлял специфичность к какому-либо гомологу ЦД и его действие не зависит от типа используемого субстрата.

ВЫВОДЫ

Таким образом, предложенный органический комплексообразователь, обеспечивающий высокий выход всех гомологов ЦД в присутствии достаточно высоких концентраций субстрата (крахмала), обладает низкой токсичностью и высокой химической стабильностью. Изопропанол эффективен в сочетании с ЦГТазами, продуцируемыми культурами бактерий *Paenibacillus* вне зависимости от их природной специфичности, как с α -, так и β -ЦГТазами бактерий *P. macerans* и *P. illinoisensis*.

В этом плане, применение изопропанола в технологии ЦД, с учетом комплекса его положительных свойств: эффективности, низкой токсичности, легкости регенерации и удаления из получаемой продукции, доступности и невысокой цены, является востребованным и перспективным.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП "Агидель" УФИЦ РАН. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 «Экологические и генетико-физиологические особенности взаимодействия видов в природных и искусственных сообществах микроорганизмов».

The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.

During the research, we used the equipment of the Agidel Center for Collective Use of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia No. 075-00326-19-00 on the topic No. АААА-А18-118022190098-9 "Ecological and genetic-physiological features of the interaction of species in natural and artificial communities of microorganisms."

ЛИТЕРАТУРА

1. **Szejtli J.** Past, present, and future of cyclodextrin research. *ChemInform*. 2004. V. 36. N 17. P. 1825-1845. DOI: 10.1002/chin.200517261.
2. **Zhang J.Q., Jiang K.M., An K., Ren S.H., Xie X.G., Jin Y.** Novel water-soluble fisetin/cyclodextrins inclusion complexes: Preparation, characterization, molecular docking and bioavailability. *Carboh. Res.* 2015. V. 418. P. 20-28. DOI: 10.1016/j.carres.2015.09.013.
3. **Jansook P., Ogawa N., Loftsson T.** Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 2018. V. 535. P. 272-284. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.018.
4. **Martin Del Valle E.** Cyclodextrins and their uses: a review. *Process. Biochem.* 2009. V. 39. P. 1033-1046. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9.
5. **Tahir M.N., Lee Y.** Immobilisation of beta-cyclodextrin on glass: characterisation and application for cholesterol reduction from milk. *Food Chem.* 2013. V. 139. P. 475-481. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.01.080.
6. **Li Q., Pu H.Y., Tang P.X., Tang B., Sun Q.M., Li H.** Propyl gallate/cyclodextrinsupramolecular complexes with enhanced solubility and radical scavenging capacity. *Food Chem.* 2018. V. 245. P. 1062-1069. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.065.
7. **Yoshikiyo K., Yoshioka Y., Narumiya Y., Oe S., Kawahara H., Kurata K.** Thermal stability and bioavailability of inclusion complexes of perilla oil with γ -cyclodextrin. *Food Chem.* 2019. V. 294. P. 56-59. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.04.093.
8. **Erdős M., Hartkamp R., Vlugt T.J.H., Moulto O.A.** Inclusion complexation of organic micropollutants with β -cyclodextrin. *J. Phys. Chem. B.* 2020. V. 124. P. 1218-1228. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b10122.
9. **Gaston J.A.R., Szerman N., Costa H., Krymkiewicz N., Ferrarotti S.** Cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: activity and kinetic studies. *Enzyme Microb. Technol.* 2009. V. 45. P. 36-41. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.04.002.

REFERENCES

1. **Szejtli J.** Past, present, and future of cyclodextrin research. *ChemInform*. 2004. V. 36. N 17. P. 1825-1845. DOI: 10.1002/chin.200517261.
2. **Zhang J.Q., Jiang K.M., An K., Ren S.H., Xie X.G., Jin Y.** Novel water-soluble fisetin/cyclodextrins inclusion complexes: Preparation, characterization, molecular docking and bioavailability. *Carboh. Res.* 2015. V. 418. P. 20-28. DOI: 10.1016/j.carres.2015.09.013.
3. **Jansook P., Ogawa N., Loftsson T.** Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 2018. V. 535. P. 272-284. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.018.
4. **Martin Del Valle E.** Cyclodextrins and their uses: a review. *Process. Biochem.* 2009. V. 39. P. 1033-1046. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9.
5. **Tahir M.N., Lee Y.** Immobilisation of beta-cyclodextrin on glass: characterisation and application for cholesterol reduction from milk. *Food Chem.* 2013. V. 139. P. 475-481. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.01.080.
6. **Li Q., Pu H.Y., Tang P.X., Tang B., Sun Q.M., Li H.** Propyl gallate/cyclodextrinsupramolecular complexes with enhanced solubility and radical scavenging capacity. *Food Chem.* 2018. V. 245. P. 1062-1069. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.065.
7. **Yoshikiyo K., Yoshioka Y., Narumiya Y., Oe S., Kawahara H., Kurata K.** Thermal stability and bioavailability of inclusion complexes of perilla oil with γ -cyclodextrin. *Food Chem.* 2019. V. 294. P. 56-59. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.04.093.
8. **Erdős M., Hartkamp R., Vlugt T.J.H., Moulto O.A.** Inclusion complexation of organic micropollutants with β -cyclodextrin. *J. Phys. Chem. B.* 2020. V. 124. P. 1218-1228. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b10122.
9. **Gaston J.A.R., Szerman N., Costa H., Krymkiewicz N., Ferrarotti S.** Cyclodextringlycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R: activity and kinetic studies. *Enzyme Microb. Technol.* 2009. V. 45. P. 36-41. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.04.002.

10. Wang L., Wu D., Chen J., Wu J. Enhanced production of γ -cyclodextrin by optimization of reaction of γ -cyclodextringlycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. *Food Chem.* 2013. V. 141. N 3. P. 3072-3076. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.149.
11. Blackwood A.D., Bucke C. Addition of polar organic solvents canim prove the product selectivity of cyclodextringlycosyltransferase. Solvent effects on CGTase. *Enzyme Microb. Technol.* 2000. V. 27. P. 704-708. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00270-2.
12. Biwer A., Antranikian G., Heinzle E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. P. 609-617. DOI: 10.1007/s00253-002-1057-x.
13. Zhekova B., Dobrev G., Stanchev V., Pishtiyski I. Approaches for yield increase of β -cyclodextrin formed by cyclodextringlucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 25. P. 1043-1049. DOI: 10.1007/s11274-009-9985-6.
14. Shewale B.D., Sapkal N.P., Raut N.A., Gaikwad N.J., Fursule R.A. Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on solubility of Carvedilol. *Indian J. Pharm. Sci.* 2008. V. 70. P. 255-257. DOI: 10.4103/0250-474X.41470.
15. Ольхович М.В., Шарапова А.В., Блохина С.В., Тростин А.Н. Исследование комплексов включения 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина с биологически активными салинизидом и ванилин изониазидом. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2017. Т. 60. Вып. 4. С. 68-74. DOI: 10.6060/tcct.2017604.5570.
16. Усанов Н.Г., Гильванова Е.А., Елизарьев П.А., Пруцакова Е.А., Мелентьев А.И. Усовершенствованный метод фотометрического определения активности циклодекстрин-глюканотрансферазы. *Приклад. биохим. микробиол.* 2007. Т. 43. № 1. С. 118-124. DOI: 10.1134/S000368380701019X.
17. Li Z., Wang M., Wang F., Gu Z., Du G., Wu J. Gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2007. V. 77. P. 245-255. DOI: 10.1007/s00253-007-1166-7.
18. Kamaruddin K., Ilias R.M., Aziz S.A., Said M., Hassan O. Effects of buffer properties on cyclodextringlucanotransferase reactions and cyclodextrin production from raw sago (*Cycasrevoluta*) starch. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2005. V. 41. P. 117-125. DOI: 10.1042/BA20040040.
19. Alves-Prado H.F., Carneiro A.A., Pavezzi F.C., Gomes E., Boscolo M., Franco C.M., da Silva R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008. V. 146. P. 3-13. DOI: 10.1007/s12010-007-8093-z.
20. Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г. Сравнение кинетических свойств различных циклодекстрин-глюканотрансфераз. *Изв. Самар. Науч. Центра РАН.* 2011. Т. 13. № 5. С. 203-206.
21. Meng X.F., Gangoiti J., Kok N., Leeuwen S.S., Pijning T., Dijkhuizen L. Biochemical characterization of two GH70 family 4,6- α -glucanotransferases with distinct product specificity from *Lactobacillus aviaries* subsp. *aviaries* DSM 20655. *Food Chem.* 2018. V. 253. P. 236-246. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.01.154.
22. Грачева И.М., Иванова Л.А. Биотехнология биологически активных веществ. М.: Элевар. 2006. 453 с.
23. Kaulpiboon J., Hansakul P. Comparative studies on the synthesis of cyclodextrin from two bacterial CGTases in the presence of organic solvents. *Thammasat Int. J. Sc. Tech.* 2007. V. 12. N 2. P. 10-17.
24. Li C., You Y., Lu Z., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Ban X., Li Z. Alcohol complexing agents influence bacterial α -cyclodextrin production. *Food Sci. Technol.* 2021. V. 135. P. 2-9. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110031.
10. Wang L., Wu D., Chen J., Wu J. Enhanced production of γ -cyclodextrin by optimization of reaction of γ -cyclodextringlycosyltransferase as well as synchronous use of isoamylase. *Food Chem.* 2013. V. 141. N 3. P. 3072-3076. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.149.
11. Blackwood A.D., Bucke C. Addition of polar organic solvents canim prove the product selectivity of cyclodextringlycosyltransferase. Solvent effects on CGTase. *Enzyme Microb. Technol.* 2000. V. 27. P. 704-708. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00270-2.
12. Biwer A., Antranikian G., Heinzle E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. P. 609-617. DOI: 10.1007/s00253-002-1057-x.
13. Zhekova B., Dobrev G., Stanchev V., Pishtiyski I. Approaches for yield increase of β -cyclodextrin formed by cyclodextringlucanotransferase from *Bacillus megaterium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 25. P. 1043-1049. DOI: 10.1007/s11274-009-9985-6.
14. Shewale B.D., Sapkal N.P., Raut N.A., Gaikwad N.J., Fursule R.A. Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on solubility of Carvedilol. *Indian J. Pharm. Sci.* 2008. V. 70. P. 255-257. DOI: 10.4103/0250-474X.41470.
15. Ol'khovich M.V., Sharapova A.V., Blokhina S.V., Trostin A.N. Study of inclusion complexes of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with biologically active salinazide and vanillin isoniazide. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]* 2017. V. 60. N 4. P. 68-74 (in Russian). DOI: 10.6060/tcct.2017604.5570.
16. Usanov N.G., Gilvanova E.A., Elizariyev P.A., Prutsakova E.A., Melentyev A.I. Improved method of photometric determination of cyclodextringlucanotransferase activity. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2007. V. 43. N 1. P. 118-124 (in Russian). DOI: 10.1134/S000368380701019X.
17. Li Z., Wang M., Wang F., Gu Z., Du G., Wu J. Gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2007. V. 77. P. 245-255. DOI: 10.1007/s00253-007-1166-7.
18. Kamaruddin K., Ilias R.M., Aziz S.A., Said M., Hassan O. Effects of buffer properties on cyclodextringlucanotransferase reactions and cyclodextrin production from raw sago (*Cycasrevoluta*) starch. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2005. V. 41. P. 117-125. DOI: 10.1042/BA20040040.
19. Alves-Prado H.F., Carneiro A.A., Pavezzi F.C., Gomes E., Boscolo M., Franco C.M., da Silva R. Production of cyclodextrins by CGTase from *Bacillus clausii* using different starches as substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008. V. 146. P. 3-13. DOI: 10.1007/s12010-007-8093-z.
20. Fedorova P.Yu., Gilvanova E.A., Usanov N.G. Comparison of the kinetic properties of various cyclodextringlucanotransferases. *Izvestia Samar.Nauch. Tsentra.* 2011. V. 13. N 5. P. 203-206 (in Russian).
21. Meng X.F., Gangoiti J., Kok N., Leeuwen S.S., Pijning T., Dijkhuizen L. Biochemical characterization of two GH70 family 4,6- α -glucanotransferases with distinct product specificity from *Lactobacillus aviaries* subsp. *aviaries* DSM 20655. *Food Chem.* 2018. V. 253. P. 236-246. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.01.154.
22. Gracheva I.M., Ivanova L.A. Biotechnology of biologically active substances. М.: Elevar. 2006. 453 p. (in Russian)
23. Kaulpiboon J., Hansakul P. Comparative studies on the synthesis of cyclodextrin from two bacterial CGTases in the presence of organic solvents. *Thammasat Int. J. Sc. Tech.* 2007. V. 12. N 2. P. 10-17.
24. Li C., You Y., Lu Z., Gu Z., Hong Y., Cheng L., Ban X., Li Z. Alcohol complexing agents influence bacterial α -cyclodextrin production. *Food Sci. Technol.* 2021. V. 135. P. 2-9. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110031.

Поступила в редакцию (Received) 16.04.2021

Принята к опубликованию (Accepted) 21.10.2021