

Penentuan Aktivitas Siklisasi- β Siklodekstrin Glukosiltransferase *Wild Type*, H43K, P84Y, Y93F, Y188L, dan S468F dari *Bacillus* sp. A2-5a terhadap Pati Terlarut

Tina Rostinawati^{*1}, Yeyet Cahyati Sumirtapura², Elfahmi², Debbie Sofie Retnoningrum²

¹Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21 Jatinangor 45363

²Sekolah Farmasi Institut teknologi Bandung, Jl. Ganesha No. 10 Bandung 40132

Abstrak

Siklodekstrin (CD) merupakan oligosakarida yang terdiri atas enam sampai delapan glukosa yang dihubungkan dengan ikatan 1,4 glikosida (CD- α , - β dan - γ). Molekul ini memiliki kemampuan membentuk kompleks inklusi dengan suatu molekul "tamuk" (*guest*) yang bersifat hidrofobik. CD membentuk cincin yang rongganya bersifat hidrofob namun permukaan luarnya bersifat hidrofil sehingga memungkinkan molekul tamu yang tidak larut air untuk berkompleks di dalam rongganya. Senyawa ini diaplikasikan secara luas pada berbagai industri farmasi, bioteknologi, makanan, kimia, tekstil, pertanian dan juga untuk perlindungan lingkungan. CD dihasilkan melalui reaksi enzimatis siklodekstrin glikosiltransferase (CGTase) terhadap pati sebagai substrat. CGTase yang berasal dari *Bacillus* sp. A2-5a (BA2-5a) merupakan CGTase- β yang menghasilkan CD- β sebagai produk utamanya dengan sebagian kecil CD- α dan selebihnya CD- γ . Pada penelitian sebelumnya telah dihasilkan CGTase BA2-5a mutan melalui substitusi asam amino pada posisi 43, 84, 93, 188 dan 468 yang menghasilkan CGTase BA2-5a H43K, P84Y, Y93F, Y188L dan S468F. Pada penelitian ini ditentukan aktivitas siklisasi- β CGTase BA2-5a wild type dan CGTase mutan H43K, P84Y, Y93F, Y188L dan S468F. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas siklisasi- β CGTase wild type dan pengaruh substitusi asam amino pada posisi 43, 84, 93, 188 dan 468 terhadap aktivitas tersebut. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas siklisasi- β CGTase wild type, CGTase H43K, CGTase P84Y, CGTase Y93F, CGTase Y188L dan CGTase S468F adalah 5,01; 2,14; 2,78; 1,77; 0,62; dan 3,37 unit/ml. Pada penelitian ini juga ditentukan aktivitas spesifik CGTase wild type, CGTase H43K, CGTase P84Y, CGTase Y93F, CGTase Y188L dan CGTase S468F sebagai berikut : 65,6; 41,2; 53,8 29,1; 11,0; dan 57,6 (unit/mg). Substitusi asam amino pada CGTase BA2-5a menunjukkan penurunan aktivitas siklisasi- β .

Kata kunci: BA2-5a, CGTase *wild type*, substitusi, CGTase mutan, aktivitas siklisasi- β

1. Pendahuluan

Siklodekstrin (CD) merupakan suatu molekul siklik yang dihasilkan dari pati yang dimodifikasi secara enzimatis yang diaplikasikan secara luas dalam industri makanan, farmasi, kimia dan pertanian. Molekul ini memiliki kemampuan membentuk kompleks inklusi dengan suatu molekul "tamuk" (*guest*) yang bersifat hidrofobik. CD membentuk cincin yang rongganya bersifat hidrofob namun permukaan luarnya bersifat hidrofil, sehingga memungkinkan molekul tamu yang tidak larut air untuk berkompleks di dalam rongganya. Dalam bidang farmasi, CD mempunyai peranan yang luas diantaranya untuk memperbaiki kelarutan obat dalam air sehingga meningkatkan bioavailabilitas senyawa obat, meningkatkan stabilitas senyawa obat (pengaruh

kimia fisika: pemanasan, proses beku kering, penyimpanan atau keberadaan senyawa pengoksidasi) dan agregasi [1].

CGTase dari *Bacillus* sp. galur A2-5a (nomer akses BAA31539) terutama menghasilkan CD- β (CGTase- β) dengan aktivitas siklisasi jauh lebih tinggi dari aktivitas hidrolisis (rasio 313, tertinggi dari CGTase yang dilaporkan [2]). CGTase ini menghasilkan CD- α , - β , - γ dengan rasio 5:77:18, mempunyai aktivitas hidrolisis paling rendah diantara CGTase- β yang dilaporkan [2]). Telah dilaporkan pula CGTase BA2-5a memproduksi sikloamilosa dengan derajat polimerisasi besar (9 gugus glikosil atau lebih besar) pada tahap awal yang selanjutnya, dengan merubah sikloamilosa besar

* Departemen Biologi Farmasi
Email: tinarostinawati@gmail.com

menjadi lebih kecil dan akhirnya menjadi CD tujuh gugus glikosil atau CD- β dibandingkan CGTase yang berasal dari *Bacillus macerans* dan *Bacillus stearothermophilus* yang memproduksi sikloamilase spesifik untuk CD- α [3].

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan mutagenesis terarah dan mutasi secara acak pada gen sintetik pengkode CGTase BA2-5a. Mutagenesis pada kodon 93 yang mengubah tirosin menjadi fenilalanin telah dilakukan pada gen *cgtase* sintetik [4,5]. Pemilihan residu-residu asam amino yang disubstitusi berdasarkan pada analisa urutan asam amino dan penelitian yang sudah ada sebelumnya karena tidak adanya ketersediaan data struktur CGTase BA2-5a. Untuk substitusi dipilih residu pada posisi 47, 89, 100 dan 195 (43, 84, 93 dan 188 pada CGTase BA2-5a). Substitusi Y93F CGTase terhadap spesifisitas produk telah dilaporkan [4]. CGTase *Bacillus* sp. A2-5a ini memiliki beberapa kelebihan dibandingkan CGTase dari bakteri lain. Telah dilaporkan studi komparasi tiga CGTase dari bakteri penghasil CGTase yaitu dari *Bacillus* sp. A2-5a (CGTase A2-5a), *Bacillus macerans* (CGTase Bmac) dan *Bacillus stearothermophilus* (CGTase Bste). Hasilnya menunjukkan bahwa CGTase A2-5a memproduksi sikloamilosa dengan derajat polimerisasi besar (9 gugus glikosil atau lebih besar) pada tahap awal pertumbuhan bakteri. Spesifikasi produksi sikloamilosa terjadi pada tahap selanjutnya, dengan merubah sikloamilosa besar menjadi lebih kecil dan akhirnya menjadi CD tujuh gugus glikosil atau CD- β . CGTase Bmac dan CGTase Bste memproduksi sikloamilase spesifik untuk CD- α .

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh substitusi asam amino CGTase BA2-5a pada posisi 43(H $\rightarrow$ K), 84(P $\rightarrow$ Y), 93(Y $\rightarrow$ F) dan 188(S $\rightarrow$ F) terhadap aktivitas siklisasi- β dan aktivitas spesifiknya sehingga dapat mengetahui peranan dari residu-residu asam amino tersebut pada CGTase BA2-5a.

2. Metode

2.1 Overproduksi dan Pemurnian CGTase Rekombinan

Koloni tunggal yang berasal dari *E. coli* BL21(DE3) diambil dengan bantuan kawat ose dan dikultivasi dalam medium LB cair 10 mL yang mengandung antibiotik kanamisin pada suhu 37 °C dan 150 rpm selama 18 jam. Sebanyak 2% kultur ditambahkan ke dalam labu yang berisi medium LB 500 mL untuk overproduksi skala besar. Kultur diinkubasi lagi selama 3 jam pada suhu 37 °C dan 200 rpm untuk mencapai OD (Optical density=0,6). Konsentrasi optimum IPTG yang digunakan untuk produksi rCGTase pada *E. coli* BL21(DE3) adalah 0,1 mM [5]. Selanjutnya kultur diinkubasikan lagi selama 6 jam pada kondisi suhu

25 °C dan 200 rpm [6]. CGTase rekombinan yang mengandung pJexpress401_cgtase_optEc diturunkan suhu pasca induksi menjadi 25 °C menunjukkan hasil pembentukan Badan Inklusi (BI) yang terbentuk 18% dan protein terlarut sebesar 82% dari total CGTase [6]. Sel dipanen dengan sentrifugasi dingin pada 3400 x g selama 20 menit dan ditambah dapar lisis pH 8,0 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl) yang mengandung 1 mM fenilmetil sulfonil fluoride. Sel dipecah dalam es selama 2 menit dengan selang waktu 5 detik menggunakan sonikator dengan amplitude 25%.

Pemurnian CGTase dari protein-protein lain dilakukan menggunakan resin Ni-NTA Agarose (Qiagen®). CGTase *Bacillus* sp. A2-5a mutan dan wild type dioptimasi pemurniannya pada tahap elusi dengan menggunakan konsentrasi imidazol bertingkat yaitu 15, 50, 100, 200 dan 250 mM. Selanjutnya CGTase murni ditentukan bobot molekulnya menggunakan SDS-PAGE 10% (b/v). Konsentrasi CGTase ditentukan dengan cara membandingkan dengan konsentrasi protein BSA dengan metode Bradford menggunakan pereaksi Bradford (Bio-Rad®). Kurva standar dibuat menggunakan protein BSA murni dengan berbagai konsentrasi yang direaksikan dengan pereaksi Bradford dan diukur absorbannya pada λ 595 nm. CGTase hasil pemurnian direaksikan dengan pereaksi Bradford, diukur absorbannya dan ditentukan konsentrasinya berdasarkan kurva standar (Bio-Rad protocol).

2.2 Uji aktivitas CGTase Mutan dan wild type dengan metode Zymografi

Uji aktivitas CGTase BA2-5a mutan dan wild type dilakukan pada PAGE-natif yang diwarnai dengan indikator fenolftalein. CGTase dielektroforesis dalam bentuk natifnya menggunakan PAGE-natif. CGTase dielektroforesis pada satu gel dan kemudian gel tersebut dipotong sama bagian. Hasil elektroforesis pertama diwarnai dengan coomassie blue sedangkan yang kedua dengan gel indikator fenolftalein. Pada metode ini dibuat gel indikator segar dengan mencampurkan pati terlarut 0,24 g dan agarosa 0,14 g dalam dapar fosfat 16 mL (pH 8, 0,2 M) lalu dipanaskan hingga pati terlarut. Setelah larutan terbentuk ditambahkan larutan fenolftalein 0,4% (b/v) sebanyak 0,5 mL dan didinginkan sampai suhu 50 °C. Gel indikator dituang secara merata di atas PAGE-natif dan dibiarkan memadat, kemudian diinkubasi selama lima menit pada suhu 37 °C. Setelah itu, gel dituang dengan Na₂CO₃ 10%, daerah bening yang muncul menunjukkan aktivitas pembentukan CD- β [7].

2.3 Aktivitas Siklisasi- β CGTase wild type dan mutan (Penentuan aktivitas dan aktivitas spesifik)

Aktivitas siklasi CGTase ditentukan seperti yang dinyatakan di dalam Moriwaki dkk. (2009) dengan sedikit modifikasi [8]. Reaksi terdiri dari 0,9 ml pati terlarut yang terpegelatinasi (10 %) di dalam 50 mM dapar Tris-HCl (pH 7) dan ditambahkan 0,1 ml larutan enzim. Reaksi berjalan pada kondisi suhu inkubasi 60 °C (suhu optimum) selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pemanasan dalam air yang mendidih selama 5 menit. CD- β yang terbentuk diukur dengan metode kolorimetri berdasarkan mekanisme pembentukan kompleks inklusi fenofalein di dalam CD- β [9]. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai sejumlah enzim menghasilkan 1 μ mol CD- β per menit.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Overproduksi dan pemurnian CGTase

E. coli transforman yang telah membawa plasmid pJx_cgtase_optEc kemudian digunakan untuk mengoverekspresikan protein CGTase. Pada proses overproduksi protein CGTase dilakukan penambahan 10 mM CaCl_2 yang bertujuan untuk meningkatkan aktivitas CGTase. Penambahan 10 mM CaCl_2 mampu meningkatkan aktivitas enzim CGTase sebesar 40% dibandingkan tanpa penambahan CaCl_2 [10].



Gambar 1. Hasil Purifikasi dengan resin Ni-NTA menggunakan konsentrasi imidazole bertingkat : Lajur 1) protein *crude*, lajur 2) *Flow Through*, lajur 3-4) *Washing* 1-2 (tanpa imidazol), lajur 5-6) Elusi (imidazol 50 mM), lajur 7-8) Elusi (imidazol 100 mM), lajur 9-10) Elusi (imidazol 150 mM), lajur 11-12) Elusi (imidazol 200 mM), lajur 13-14) Elusi (imidazol (250 mM) dan lajur 15) BSA

Keberadaan ion Ca^{2+} membantu pelipatan enzim CGTase menjadi bentuk aktif. Berdasarkan data blast dari NCBI, urutan asam amino CGTase BA2-5a 99% homolog dengan urutan asam amino CGTase yang berasal dari *Bacillus ohbensis* (Bacoh). Berdasarkan data uniprot www.uniprot.org, Bacoh membutuhkan dua ion Ca^{2+} untuk membantu folding proteinnya dan berdasarkan hasil data *alignment*, kedua CGTase ini memiliki jenis residu asam amino yang sama yang berperan dalam pengikatan dengan ion kalsium.

Pemurnian protein CGTase dilakukan dengan menggunakan resin Ni-NTA menggunakan pereaksi dan prosedur yang berasal dari kit Protino® Ni-TED dengan

optimasi pada tahap elusi dengan menggunakan konsentrasi imidazol bertingkat yaitu 15, 50, 100, 200 dan 250 mM. Dengan cara elusi bertahap, didapatkan protein CGTase yang bebas dari protein lain yang tidak diinginkan. Salah satu protein pengotor ini adalah monomer protein Lac repressor yang berukuran sekitar 45 kDa. Protein ini memiliki histidin pada posisi ke 163, 173, and 202 di tiap monomernya sehingga mampu berikatan pada kolom nikel [11]. Protein pengotor dapat terpisah dengan protein target berdasarkan perbedaan afinitasnya dengan Nikel dan pengotor terlihat terelusi secara bertahap pada larutan elusi dengan konsentrasi imidazol yang lebih rendah. Pada elusi dengan imidazol 100, 200 mM terlihat pita tunggal dengan ukuran teoritis 76,39 kDa yang pada elektroforegram terletak di atas protein BSA yang berukuran 65 kDa, sedangkan pada elusi 250 mM sudah tidak ada lagi protein yang terelusi (Gambar 1). Hasil elusi dengan imidazol 100 dan 200 mM dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan nanoshep 10K. Hasil pemekatan dapat dilihat pada (Gambar 2).



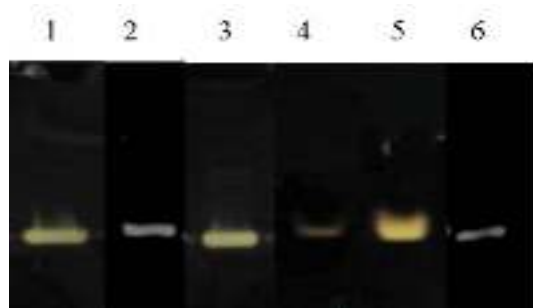
Gambar 2. Hasil Pemekatan Protein CGTase wild type dan mutan menggunakan Nanoshep 10K. M = marka protein, lajur 1: CGTase wild type, lajur 2: CGTase H43K, lajur 3: CGTase P84Y, lajur 4: CGTase Y93F, lajur 5: CGTase Y188L dan lajur 6: CGTase S468F

3.2 Uji aktivitas CGTase wild type dan mutan dengan metode Zymografi

Penelitian ini menggunakan PAGE-natif yang bertujuan protein yang bermigrasi dalam akrilamid merupakan protein dalam bentuk natif sehingga mampu melakukan aktivitas enzimatik dalam gel. Metode Zymografi digunakan untuk mendeteksi aktivitas CGTase untuk menghidrolisis pati dan aktivitas siklasi- β [7].

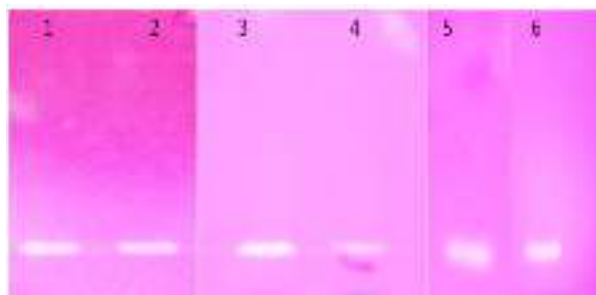
Pengujian hidrolisis pati menggunakan pewarna iodin (KI/I_2) yang memberi warna hitam kebiruan ketika I_3^- membentuk kompleks dengan struktur kumparan pati [12]. Pada pati yang terhidrolisis, struktur kumparan terputus menjadi gula dengan rantai yang lebih pendek sehingga I_3^- tidak dapat membentuk kompleks dengan pati yang telah terurai sehingga warna hitam tidak

terbentuk. Hasil uji hidrolisis pati pada PAGE natif yang telah ditambahkan peraksi iodine terbentuk zona bening di pita protein CGTase yang menunjukkan protein CGTase memiliki aktivitas hidrolisis terhadap pati (Gambar 3). CGTase merupakan enzim yang termasuk keluarga glikosil hydrolase 13 yang mempunyai aktivitas umum dalam menghidrolisis pati. CGTase dapat memutus ikatan α -(1,4) antar unit gula dari pati juga mentransfer oligosakarida yang terikat kovalen kepada molekul air (reaksi hidrolisis) melalui pembentukan ikatan hidrogen. Dengan adanya aktivitas hidrolisis, memberikan kemudahan dalam ketersediaan substrat dengan rantai gula yang lebih pendek untuk inisiasi reaksi siklisasi pada pembentukan CD [13].



Gambar 3. Hasil uji hidrolisis CGTase wild type dan mutan dengan metode Zimografi. Lajur 1) CGTase wild type, lajur 2) CGTase H43K, lajur 3) CGTase P84Y, lajur 4) CGTase Y93F, lajur 5) CGTase Y188L dan lajur 6) CGTase S468F

Pengujian aktivitas siklisasi- β dilakukan menggunakan indikator fenolftalein untuk mengetahui adanya pembentukan CD- β oleh CGTase yang dipisahkan pada PAGE-natif. Pengujian ini memberikan hasil positif dengan terjadinya perubahan warna dari merah muda menjadi tidak berwarna pada reaksi siklisasi- β yang diamati. Pada metode zymografi ini, gel yang telah diselubungi larutan pati yang mengandung agar dan fenolftalein dalam kondisi basa berwarna merah muda dan setelah tahap inkubasi terlihat zona putih di sekitar protein CGTase. Proses ini menunjukkan telah terbentuknya CD- β dan kompleks inklusi dengan masuknya fenolftalein ke dalam rongga CD- β [7]. Hasil reaksi siklisasi- β dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil uji siklisasi- β CGTase wild type dan mutan dengan metode Zimografi. Lajur 1) CGTase wild type, lajur 2) CGTase H43K, lajur 3) CGTase P84Y, lajur 4) CGTase Y93F (Rostinawati, 2015), lajur 5) CGTase Y188L dan lajur 6) CGTase S468F

3.3 Aktivitas siklisasi- β CGTase wild type dan mutan

Reaksi siklisasi CGTase diawali dengan perlakuan pati terlebih dahulu dengan proses gelatinasi. Gelatinasi pati merupakan suatu proses pemutusan ikatan intermolekul suatu molekul pati dengan adanya air dan panas sehingga menyipkansitus pengikatan hidrogen dengan keberadaan air. Dengan pati yang sudah digelatinasi, maka proses siklisasi dapat berlangsung lebih cepat karena proses ini akan menyiapkan molekul gula rantai pendek. Pada penelitian ini uji aktivitas β -siklisasi dilakukan dengan memberikan perlakuan awal terhadap substrat yaitu dengan gelatinasi. Gelatinasi merupakan perlakuan awal untuk mendapatkan molekul gula rantai pendek. Proses ini sama dengan proses *jet-cooked starch* yang umum digunakan dalam industri [14]. Berdasarkan aktivitas siklisasi- β pada suhu dan pH optimum selama 30 menit didapatkan data unit aktivitas CGTase wild type dan mutan (Tabel 1). Pati yang tergelatinasi membentuk gula-gula rantai pendek yang memudahkan proses siklisasi.

Tabel 1. Unit aktivitas, aktivitas spesifik dan persen perolehan kembali CGTase *wild type* dan mutan

Protein	Aktivitas (unit/g)	Aktivitas spesifik (unit/mg)	% PBM
CGTase wild type	5,61	25,6	79,2
CGTase H43K	2,44	41,2	71,94
CGTase P84Y	12,28	19,8	85,94
CGTase Y93F	1,17	29,1	88,2
CGTase Y188L	6,02	15	75,2
CGTase S468F	1,57	35,8	79,1

Parameter aktivitas spesifik suatu enzim mempunyai makna sebagai nilai yang digunakan untuk mengukur kinetik enzim (kecepatan reaksi enzim dengan substrat tertentu). Selain itu aktivitas spesifik enzim juga digunakan untuk mengukur kemurnian suatu enzim. Nilai aktivitas spesifik menjadi lebih besar nilainya untuk enzim yang lebih murni. Pada penelitian ini, aktivitas spesifik enzim berkorelasi dengan kinetika enzim karena enzim CGTase *wild type* dan mutan yang digunakan dimurnikan dengan prosedur dan resin Ni-NTA yang sama. Pada Tabel 1 aktivitas spesifik yang terbesar dimiliki oleh CGTase wild type diikuti oleh CGTase S468F, CGTase P84Y, CGTase H43K, CGTase Y93F dan CGTase Y188L. Untuk nilai (% *yield*) diperoleh berdasarkan aktivitas enzim total per ml setelah dimurnikan dibandingkan dengan aktivitas total per ml *crude* lysat enzim sebelum dimurnikan. Nilai (% *yield*) untuk keenam enzim memiliki rentang nilai 70-80 % *yield* artinya perolehan kembali nilai aktivitas keenam enzim tersebut tidak jauh berbeda satu sama lainnya.

4. Kesimpulan

Residu His43, Pro84, Tyr93, Tyr188 dan Ser468 pada CGTase BA2-5a berperan pada aktivitas siklisasi- β enzim.

Daftar Pustaka

1. Qingsheng Q, dan W. Cyclodextrin Glucanotransferase: from Gene to Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **66**; 475–485.
2. Kelly RM, Dijkhuizen L, dan Leemhuis H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **84(1)**: 119–133.
3. Terada Y, Sanbe H, Takaha T, Kitahata S, Koizumi K, dan Okada S. Comparative study of the cyclization reactions of three bacterial cyclomaltodextrin glucanotransferases. *Appl. Envi. Microbiol.*, 2001, **67**: 1453–1460.
4. Rostinawati T, Riani C, Elfahmi, Sumirtapura YC, dan Retnoningrum DS. Y93F Substitution of Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp. A2-5a and its Enzyme Characterization. *Biotechnology*, **14(4)**: 181-187.
5. Muchlisin A. *Konstruksi Gen cgtase Sintetik dari Bacillus sp. A2-5a untuk Overekspresi di Escherichia coli BL21(DE3) serta uji aktivitas produk gennya*. Skripsi. Sekolah Farmasi ITB: Bandung, 2010.
6. Yustiantara P. Karakterisasi Enzim Cyclodextrin Glucanotransferase Hasil Ekspresi Gen Sintetis cgtase dari *Bacillus* sp. A2-5A pada *Escherichia coli*. Tesis. Sekolah Farmasi ITB: Bandung, 2011.
7. Pakzad, SR, Ajdary S, Moazami N, Haghighi S. A Novel Method to Detect β -Cyclodextrin Glucosyl Transferase (β -CGTase) Activity on Polyacrylamide Gels, 2005, *Iran. Biomed. J.*, **9**; 87-90.
8. Moriwaki C, Ferreira LR, Rodella JRT, Matioli G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus sphaericus* strain 41: Production, characterization and catalytic properties. 2009, *Biochem. Eng. J.*, **48**; 124-131.
9. Goel A, Nene SN. Modifications in the phenolphthalein method for spectrophotometric estimation of beta cyclodextrin. *Starch*, 1995, **47(10)**; 399–400
10. Han NS dan Tao BY. A simple method to express soluble, highly active cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *E. Coli*. 1999, *Biotechnol. Technol.* **13**; 631-635.
11. Owens MJ, Knight DL, Nemeroff CB. Second-Generation SSRIs: Human Monoamine Transporter Binding Profile of Escitalopram and R-Fluoxetine. *Biol. Psychiatry*. 2001, **50**; 345–350.
12. Fuwa H. A New Method for Microdetermination of Amylase Activity by The Use of Amylose as The Substrate. 1954, **41**; 583-603.
13. Pishtiyski I, Zhekova B. Effect of Different Substrates and Their Preliminary Treatment on Cyclodextrin Production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **22**; 109–114.
14. Szejtli J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J. Mater. Chem*, 1997, **7**; 575–587