PRODUKSI SIKLODEKSTRIN DARI PATI DENGAN CGT ASE *PAENIBACILLUS MACERANS* IMOBIL

Djumali Mangunwidjaja [1], Andi Sugiri [2], Masitowati Gatot [3] dan Amran [4]

[1] Center for Development of Safe Agroindustrial Processes, IPB, Kampus Darmaga PO Box 220, Bogor 16610

[2] Divisi Riset dan Pengembangan, PT INAGRO, Parung, Bogor,

[3] Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Nusa Bangsa, Jl Raya Baru, Bogor 16310,

[4] Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hassanudin, Kampus Tamalanrea, Makassar 90254

Abstrak

Siklodekstrin pada umumnya diproduksi dari pati menggunakan enzim siklodekstrin glikosil transferase (CGTase) yang diekresikan oleh bakteri genus bacillus. Pada teknik itu, terlebih dahulu pati harus terlebih dahulu dilakukan likuifaksi dengan atau tanpa enzim penghidrolisis disertai pemanasan. Selanjutnya ditambahkan enzim CGT ase kedalam pati terlikuifaksi untuk sintesis siklodekstrin. Pada penelitian ini, aktivitas CGT ase dalam sel utuh *Paenibacillus macerans* (dahulu *Bacillus macerans*) dikaji dan digunakan untuk untuk konversi pati menjadi siklodekstrin. Pada bagian pertama, dilakukan pengujian aktivitas CGT ase intraselular *P. macerans* yang dibiakan pada media yang mengandung pati terlarut 1 %, pada suhu berturut-turut 30, 37 dan 45°C. Pada uji tersebut menujukkan bahwa suhu 45 °C merupakan suhu optimal untuk sintesis enzim, dengan nilai CGT ase intraselular tak larut sebesar 52,0 unit/g. Sel utuh bakteri yang dipanen dari biakan tersebut, selanjutnya diuji aktivitas enzimatiknya dan digunakan untuk konversi pati menjadi siklodekstrin. Sel utuh bakteri digunakan secara bebas untuk konversi pati dalam bioreaktor berpengaduk 2 L pada ragam konsentrasi substrat pati 25-200 g/L, pH 6,0 dan suhu 45 °C selama 60 menit. Pada proses ini perolehan (*yield*) siklodekstrin adalah sebesar 42,6 g/L. Pada bagian kedua, sel utuh *P. macerans* yang mempunyai aktivitas CGT ase tersebut diimobilisasi dalam manik gel kalsium alginat, dan digunakan untuk produksi sikiodekstrin secara sinambung dalam bioreaktor unggun diam (*packed bed bioreactor*) 1,0 L pada suhu 45 °C dan pH 6,0. Substrat (suspensi pati) dengan konsentrasi 100 g/L diumpankan pada ragam laju dilusi 0,08-0,24 per jam. Nilai konversi pati-siklodekstrin tertinggi (43,2 %) diperoleh pada proses dengan laju dilusi sebesar 0,16 per jam. Untuk menguji kemantapan biokatalis, proses sinambung ini dioperasikan selama 30 hari, dan ditujukkan bahwa kestabilan proses dapat terjaga secara baik sampai 20 hari. Perbaikan biokatalis dan kinerja bioreaktor saat ini masih dilakukan penelitian lanjutan.

Katakunci: siklodekstrin, CGT ase intraselular tak larut, *Paenibacillus macerans*, proses sinambung, bioreaktur unggun diam

PENDAHULUAN

Siklodektrin adalah merupakan oligosakarida yang tersusun atas 6, 7 atau 8 unit glukosa anhidrat melalui ikatan (1-4) dengan membentuk struktur melingkar seperti kue donat. Berdasarkan jumlah unit glukosa penyusun, siklodekstrin dipilah menjadi tiga, yaitu alfa (6 unit), beta (7 unit) dan gamma (8 unit) Cincin luar struktur siklodekstrin bersifat tidak polar (hudrofobik), sedangkan bagian dalam rongga bersifat lebih polar (hidrofilik0 (Szetjli, 1982) Produk siklik dapat terbentuk secara kompleks inklusi dengan senyawaan anorganik maupun organik. Sifat ini menyebabkan siklodekstrin banyak digunakan dalam berbagai industri seperti pangan, kosmetika, farmasi, agrokimia, serta untuk penanganan polusi (Bender, 1986: Kaneto dan Fumitashi, 1996; Szetjli, 1982)

Siklodekstrin pada umunya diproduksi dari pati menggunakan enzim siklodekstrin glikosil transferase(cyclodextrin glycosyltransferase, CGT ase) (Lee, et al,1992). Pada proses konvensional ini, terlebih dahulu pati sebagai substrat dilakukan likuifaksi dengan atau tanpa enzim penghidrolisis dengan pemanasan, selanjutnya ditambahkan CGT ase untuk sintesis pati terlikuifaksi menjadi siklodekstrin. (Lee dan Kim, 1992) Dengan proses seperti itu, biaya produksi sangat tinggi dan penerapannya sangat terbatas Berbagi usaha dilakukan para peneliti untuk memperbaiki proses, terutama ditujukan pada penyisihan. (*screening*) mikroba, pengembangan proses tanpa melalui likuifaksi pati, penggunaan CGT ase imobil, serta perancangan bioreaktor khusus (Lee dan Kim, 1991).

CGT ase merupakan enzim multifungsional yang mengkatalisis pembentukan siklodekstrin dari pati . Beberapa spesies bakteri terutama *Paenibacillus macerans* (dahulu *Bacillus macerans)* (Kitahata dan Tsuyama. 1974*), Bacillus circulans* (Pongsawadi dan Yagiswa, 1987*) and Bacillus megaterium* (Kitahata, dan Okada 1976), *Klebsiella sp* (Bender, 1977, Lee et al, 1992) serta spesies *Bacillus* alkalofilik (Nakamura, dan Herikoshi, 1976) diketahui sebagai penghasil enzim CGT ase yang potensial

Oleh karena pada umumnya CGT ase adalah enzim ekstraselular *inducible*, pendayagunaan sel utuh bakteri harus difokuskan pada aktivitas CGT ase intraselular. Galur galur *P. macerans* telah banyak diteliti dan terbukti menghasilkan CGT ase pada fasa pertumbuhan stasioner. Meskipun demikian, aktivitas enzimatik intraselular juga telah dibuktikan dan teramati pada pertumbuhan bakteri tersebut pada fasa eksponensial. (Nagrady, et al 1995).

Pada penelitian ini, aktivitas CGT ase intraselular tak larut diteliti pada pertumbuhan bakteri *P. macerans* dan selanjutnya digayagunakan sebagai biokatalis untuk produksi siklodekstrin dari pati ubikayu. Proses konversi pati menjadi siklodekstrin dikaji pada biokatalis imobil dalam bioreaktor unggun diam (*packed bed reactor*.)

BAHAN DAN METODE

Mikroba dan kondisi pertumbuhan

Paenibacillus macerans (dahulu Bacillus macerans (DSM 2892) diperoleh dari Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zell Kulturen Gmbh, Braunsweigh, Jerman Media untuk pembiakan bakteri tersusun atas komposisi berikut (g/L): pati terlarut 10; casition 5.0; ekstrak khamir 5.0; KH_2SO_4 1.0; $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.2. pH media diatur pada 7,0 sebelum sterilisasi. Inokulum disiapkan dari biakan miring dengan cara menginokulasikan 100 ml media dalam labu Erenmeyer 500 mL, dan digoyang pada putaran 300 rp, pada suhu 30oC selama 15 jam. Pembiakan (kultivasi) dilakukan pada bioreaktor 2,0 L (Biostat M, Braun, Germany) dengan volume kerja 1,5 L. Suhu 30 oC dijaga dengan thermostat, sedangkan aerasi dan agitasi diatur pada 1.0 vvm dan 300 rpm. Pertumbuhan sel dipantau dengan pengukuran bobot kering biomassa. Pengujian aktivitas enzim dan penetapan kadar gula sisa dilakukan setiap selang 4 jam dengan pengambilan contoh cairan biakan 3 kali 5 mL. Sel dipanen pada fasa pertumbuha eksponensial (24 jam) dan digunakan untuk penyiapan biokatalis bebas dan imobil.

Pengujian aktivitas CGT ase

Pengujian aktivitas CGT ase ekstraselular dan intraselular dilakukan pada contoh cairan biakan mengikuti tatacara (8) Sebanyak 0,5 mL contoh dipusing (sentrifugasi) pada 10,000 g, suhu 4°C selama 5 menit, beningan yang diperoleh diperlakukan sebagai contoh ekstraselular. Padatan sisa pemusingan dicuci duakali, kemudian disuspensikan kedalam 0.5 ml larutan 0.9% NaCL, dan suspensi ini diperlakukan sebagai contoh intraselular.

Aktivitas CGT ase diuji menggunakan pati terlarut sebagai substrat dengan cara menguikur produksi siklodekstrin dengan HPLC. Sebanyak 0,5 mL campuran pereaksi yang mengandung contoh enzim,, 0.5% pati terlarut, 10 mm $CaCl_2$, di dalam 0.5 m L larutan 0,1 M buffer fosfat (pH 6.0) diinkubasikan pada suhu 45°C selama 60 menit

Campuran perekasi tersebut dicelupkan pada penangas air mendidih (boiling water bath) selama 5 menit untuk menghentikan reaksi. Selanjutnya ditambahkan Glucoamylase (200 mg) untuk memisahkan sisa maltooligosakarida. Setelah penghancuran dengan glucoamylase (60 menit, 30 °C) kadar siklodekstrin diukur dengan HPLC. Satu unit aktivitas enzimatik setara dengan 1.0 mmol siklodekstrin yang dihasilkan oleh 1.0 g/menit pada kondisi pengujian.

Penyiapan biokatalis CGT ase

Sel *P. macerans* dipanen pada umur 24-jam dengan pemusngan pada 4000 rpm (4°C) selama 30 menit. Setelah pemusingan beningan (supernatam) dibuang dan pasta sel disuspensikan kedalam 50 mL larutan 0.1 M bufer fosfat (pH 6.0).• Biokatalis diperoleh dengan melakukan lyofilisasi. Kandungan bomassa kering sel terliofilisasikan diperkirakan 30% (b/b) . Aktivitas CGT-ase biokatalis beragam pada kisaran 45-150 units/mg (berdasarkan bobot kering massa)

Penyiapan imobilisasi sel

Teknik imobilisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah penjerapan(entrapment.) Padatan (pellet) sel yang diperoleh disuspensikan kedalam 0.I M larutan bufer fosfat (pH 6.0) Suspensi sel (dikritshui bobot selnya) dan larutan natrium alginat (4 %) disiapkan dengan larutan bufer yang sama, selanjutnya dicampurkan masing-masing dengan jumlah yang sama.. Manik gel terbentuk dengan menambahkan secara perlahan-lahan larutan kalsium klorida (1.0 %). Berbagai nisbah sel-manik dibuat (0,05 - 0,20)dengan mengatur ragam konsentrasi sel (Akimaru, et al. 1991). Selanjutnya manik yang terbentuk direndam dalam larutan kalsium klorida selama 30 menit, setelah itu dikeringanginkan diatas kertas saring selama 2 jam. Manik alginat ini disimpan pada suhu 4°C.

Kinetika konversi pati

Kinetika konversi pati menjadi siklodekstrin ditentukan dengan pengukuran laju raksi awal pada beragam konsentrasi substrat dalam bioreaktor berpengaduk Laju agitasi sebesar 500 rpm digunakan pada percobaan ini untuk meniadakan pengaruh perpindahan massa eksternal pada laju reaksi.

Konversi pati pada proses curah (batch)

Untuk mengetahui kinerja biokatalis, dilakukan pengujian proses secara curah pada bioreaktor berpengaduk 2,0 (dengan volume kerja 1,5 L). Pada proses ini, 1,2 L suspensi pati (100 g/L) digunakan sebagai substrat dan ditambahkan 5 % biokatalis (b/v). Nilai pH dan suhu diatur masing-masing pada 6.0 dengan penambahan H_2SO_4 dan 45°C. Reaksi dilakukan selama 1 jam, dan nilai pH diatur pada 5.8 - 6.0 dengan penambahan larutan 1 N - NaOH.

Proses sinambung dengan sel imobil dalam bioreaktor unggun diam

Proses sinambng dengan biokatalis

imobil untuk produksi siklodekstrin dari pati ubi kayu dilakukan pada bioreaktor unggun diam swarancang 1,0 L. Bioreaktor ini merupakan kolom gelas (garis tengah 5,5 cm dan panjang 42,0 cm) dengan double jacket, dengan volume kerja 850 mL diisi sdengan manik gel (nisbah sel- manik = 0,15). Media steril dipasokkan kedalam bioreaktor dengan bantuan pompa peristaltik pada berbagai laju alir. Suhu bioreaktor dipertahankan pada 45 °C dengan bantuan sirkulasi air lewat jaket bagian luar melalui termostat. Keluaran dari bioreaktor pada bagian atas bioreaktor ditampung dilakukan analisis untuk kadar pati dan siklodekstrin

Metode analisis

Penetapan biomassa dilakukan berdasarkan teknik bobot kering. Sisa gula dianalisis dengan HPLC Waters Model 440. Siklodekstrin total ditetapkan dengan uji glukoamilase menurut metode Akimaru, et al (1991). Konsentrasi pati diukur dengan metode Gilbert dan Spragg (1964).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas CGT ase intraselular Paenibacillus macerans

Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa selama 40 jam pertumbuhan *P. macerans* pada media pati terlarut 1%, aktivitas CGT ase ekstraselular dapat dideteksi pada fasa stasioner, dan terjadi peningkatan seiring dengan habisnya pati dalam media. (Mangunwidjaja, et al, 1998). Meskipun demikian pada pengujian lebih lanjut, aktivitas CGT ase intraselular tak larut juga dapat dideteksi pada awal fasa stasioner sebelum enzim diekresikan ke media dan terjadi peningkatan selama fasa stasioner dan kemudian menurun Pengaruh suhu terhadap aktivitas CGTase juga diuji pada 30 °C, 37 °C dan 45 °C), dan hasilnya menunjukkan bahwa pada suhu 45 °C sintesis dan aktivitas enzim adalah terbaik, Pada pertumbuhan 16 - 60 jam, sel yang sel yang diinkubasikan pada suhu 45 °C mempunyai aktivitas sebesar 52 unit/g pada jam ke 24, serta 125 unit/g pada jam ke 36 . (Gambar 1).

Pengaruh konsentrasi sel pada aktivitas CGT ase dalam manik gel

Untuk mengetahui aktivitas optimal CGT ase pada sel utuh *P. macerans* yang diimobilisasi dalam gel kalsium alginat, penyiapan manik gel pada taraf nisbah sel-manik 0,05 - 0,20 diamati, dengan meragamkan konsentarsi sel (Mangunwidjaja, 1988). Pada Tabel 1 disajikan profil aktivitas GCT ase pada manik gel dengan perbedaan konsentrasi sel. Dari hasil tersebut terlihat bahwa aktivitas enzim meningkat pada manik gel yang kandungan konsentrasi selnya lebih tinggi.

Dengan pembandingan pengikatan sel tertinggi terhadap konsentrasi sel terendah, menujukkan bahwa terjadi empat kali peningktan. Oleh sebab aktivitas CGTase tidaklah berhubungan secara linear dengan daya pengikatan sel oleh gel, konsentrasi sel tertinggi sel tidak diterapkan dalam penelitian ini. Berdasarkan hasil tersebut, pada proses konversi pati menjadi siklodekstrin, selanjutnya digunakan biokatalis dengan konsentrasi sel 6,0 g/L atau mempunyai nisbah sel-manik sebesar 0,15.

Aktivitas CGT ase biokatalis

Pada penelitian terdahulu, telah dikaji pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas biokatalis (Mangunwidjaja, et al, 1998). Penonaktifan termal biokatalis diamati pada kisaran 30-75°C dengan melakukan pengukuran penurunan atau kehilangan aktivitas enzim . Aktivitas optimum biokatalis teramati pada kisaran suhu 40 - 50°C Selain itu pH 6,0 merupakan nilai optimum baik untuk biokatalis bebas atau imobil.

Kinetika konversi pati

Kinetika konversi pati menjadi

siklodekstrin ditetapkan dengan pengukuran laju reaksi awal baik untuk biokatalis bebas mapun imobil. Laju reaksi awal (v) diukur berdasarkan jumlah siklodekstrin yang dihasilkan oleh 5 % biokatalis dalam 100 mL larutan pati terlikuifaksi pada kisaran 25- 200 g/L untuk waktu reaksi 1 jam pada bioreaktor berpengaduk.Data laju reaksi awal terhadap konsentrasi substrat disajikan pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa terjadi penghambatan konversi pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi dari 100 - 125 g/L.

Berdasarkan hasil tersebut, sebuah model kinetika sederhana diusulkan untuk penghambatan oleh substrat, pada biokatalis CGT ase ini. Model serupa dikembangkan untuk konversi fruktosa dari inulin Dahlia menggunakan bioktalis sel utuh khamir (Mangunwidjaja, 1998)

$$V = \frac{k_1 . W . S}{1 + k_2.S + k_3 S^2}$$

Nilai parameter k_1 secara proporsional bergayut pada aktivitas CGTase katalis dan menurun dengan imobilisasi. Penurunan nilai k_1 oleh imobilisasi dapat dijelaskan adanya hambatan internal difusi antarpartikel yang semakin meningkat.Nilai tetapan Michaelis nyata ., $K_m = 1/k_2$ juga akan mengalami penurunan pada biokatalis imobil. Terjadinya pengaruh penghambatan oleh substrat dinyatakan oleh tetapan $k_3 = 1/K_m.K_i$ yang meningkat pada biokatalis imobil (Tabel 2)

Proses curah konversion konversi pati menjadi siklodekstrin

Berdasarkan pada hasil pendahuluan uji kinerja biokatalis, proses curah (batch) untuk produksi siklodekstrin dari pati ubikayu diterapkan pada bioreaktor berpengaduk 2.0 L (volume kerja 1,5 L) Gambar 3 menyajikan kurva pepmebntukan siklodekstrin pada pH 6,0 dan suhu 45 °C menggunakan 1,2 L larutan pati terlikuifaksi (100 g/L) sebagai substrat dan 5 % biokatalis imobil (b/v). Analisis menggunakan HPLC terhadap produk menujukkan bahwa sebagaian besar komposisinya adalah a-siklodekstrin (Gatot, 1996). Jumlah a-siklodekstrin sangat dominan pada awal reaksi dan mencapai maksimun pada jam ke 10. Pada proses curah ini dihasilkan nilai perolehan (*yield*) sebesar 34- 37 g/L siklodekstrin. Dalam sebuah kajian lain, diketahui bahwa kinerja proses dan bioreaktor curah ini dapat ditingkatkan dengan penambahan isopropanol (10%) (Amran, 1995, Gatot, 1996)

Produksi siklodekstrin secara sinambung pada bioreaktor unggun diam

Untuk menguji kinerja biokatalis dalam mengkoversi pati menjadi siklodekstrin, dilakukan proses sinambung menggunakan substrat ubikayu dengan biokatali *P. macerans* cells imobil dalam bioreaktor unggun diam pada suhu 45 °C dan pH 6.0. Laju alir substrat berupa suspensi pati (100 g/L) diteliti pada ragam 68 - 204 mL/jam atau laju dilusi sebesar 0.08 to 0.24 per jam. Keadaan tunak *(steady sate)* dicapai setelah proses dioperasikan selama 48 jam, selanjutnya perolehan siklodekstrin pada keluaran ditentukan. Hasil selengkapnya berupa konversi pati dan produktivitas bioreaktor sebagai fungsi dari laju dilusi disajikan pada Tabel 3

Berdasarkan hasil tersebut dapat diamati beberapa hal sebagai berikut. Pada peningkatan laju dilusi juga diiringi dengan peningkatan konversi pati, yang dicapai nilai maksimunya (43,2%) pada laju dilusi 0,16 per jam. Meskipun demikian, kinerja ini menurun secara drastis pada saat proses diterapkan pada laju dilusi 0,20 per jam atau lebih. Dari pengamatan tersebut, selanjutnya proses sinambung dioperasikan selama 30 hari pada laju dilusi substrat 0,16 per jam atau laju alir 136 mL/jam. Pada kondisi operasi itu terlihat bahwa kemantapan kinerja proses dapat dicapai sampai dengan 20 hari. Pada proses yang dioperasikan lebih lama, terjadi penurunan derajat konversi dari 43,2 % menjadi 31,0 % pada hari ke 30 atau penurunan sebesar 28 %. (Gambar 4) Produktivitas bioreaktor juga menurun dari 6,91 menjadi 4,96

Perbaikan proses sinambung ini dapat dilakukan dengan cara melakukan pengaktifan kembali biokatalis, memodifikasi proses dengan cara bertahap, atau menggunakan bioreaktor lain seperti kolom gelembung dan unggun fluidisasi- yang saat ini sedang dalam pelaksanaan penelitian. (Mangunwidjaja,2000). .

KESIMPULAN

Biokatalis yang dipreparasi dari sel utuh *Paenibacillus macerans* yang mempunyai aktivitas CGT ase intraselular dapat didayagunakan untuk konversi pati ubikayu menjadi siklodekstrin dalam suatu bioreaktor unggun diam.

Aktivitas CGT ase intraselular tak larut *P. macerans* dihasilkan pada fasa pertumbuhan stasioner pada suhu 45 °C setelah 24 jam. Pada proses sinambung menggunakan sel utuh bakteri imobil diperoleh konversi terbaik sebesar 43,2 % pada konsentrasi substrat pati 100 g/L dan laju dilusi 0,16 per jam. Produktivitas biokatalis sebesar 6,91 g siklodekstrin/L per jam diperoleh pada kestabilan proses yang terjaga secara mantap selama 20 hari

PENGHARGAAN

Sebagian dari penelitian ini dibiayai oleh Dewan Riset Nasional melalui Proyek RUT (Riset Unggulan Terpadu) I. Penulis mengucapkan terimakasih pada Pusat Biakan Jerman (DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell Kulturen, Gmb H), Braunsweigh, Jerman atas bantuan galur mikroba. Demikian juga ucapan terimakasih disampaikan kepada JSPS (the Japan Society for Promoting Sciences), Kyoto Jepang atas kesempatan yang diberikan kepada DM untuk melakukan uji siklodekstrin di Graduate School of Agricultural Sciences, Kyoto University, Jepang.

DAFTAR PUSTAKA

Akimaru, K., Yagi, T., and Yamamoto, S. 1991. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclodextrin glucanotransferase J. Ferment. Bioeng 71:322-328

Amran, 1995. Biokonversi pati batang kelapa sawit menjadi siklodekstrin menggunakan *Bacillus macerans*. Tesis. Program Pascasarjana, IPB Bogor (tidak dipublikasikan).

Bender, H. 1977. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Arch. Microbiol. 3.,272-282

Bender, H. 1986. Production, characterization and application of cyclodextrins. Adv. Biotechnol. Proc. 6, 31-71

Gatot, M. 1996 Biokonversi pati batang kelapa sawit menjadi siklodekstrin secara sinabung dengan menggunakan sel *Bacillus macerans* DSM 2892 imobil. Tesis. Program Pascasarjana IPB, Bogor (tidak dipublikasikan)

Gilbert, G.S, and Spragg, S.P. 1964. Iodimetric determination of amylase. Methods Carbohyd. Chem. 4:168-169.

Kaneto, U and Fumitashi, H. 1996. Improvement of drug properties by cyclodextrins. Pract.Med. Chem. 14. 793-825

Kitahata, S., Okada, S. 1974. Actian of cyclodextrin glycosyl transferase from Bacillus megaterium strain No.5 on strach. Agric. Biol. Chem. 38:2413-2417.

Kitahata, S., Tsuyama, N., Okada, S. 1974. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyl transferase from a strain of Bacillus species. Agric. Biol. Chem., 38:387-393.

Lee. J.H, Choi, K-H, Choi, J-Y, Lee, Y-S, Kwon, I-B, and Yu, J-H. 1992. Enzymatic production of cyclodextrin glucanotransferase of Klebsiella oxytoca 19-1. Enzyme Microb. Technol. 14,1017-1020

Lee, Y.D., and Kim, H.S. 1992. Effect of organic solvents on enzymatic production of cyclodextrins in unliquefied corn starch in an attrition bioreactor .Biotechnol. Bioeng, 30: 977-983.

Lee, Y.D., and Kim, H.S. 1991. Enhancement of enzymatic production of cyclodextrins by organic solvents Enzyme Microbil. Technol. 12:499-503.

Mangunwidjaja,D; Sugiri, A and Amran 1998. Cyclodextrins production from strach by immobilized cells of Bacillus macerans in a packed bed reactor. *Didalam* T.Yoshida, et al (*eds*). Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics. 12, 288-293.

Mangunwidjaja, D,1998. Produksi fruktosa dari inulin Dahlia oleh sel Kluyveromyces marxianus imobil dalam bioreaktor unggun diam. Jurnal Teknologi Industri Pertanian. 8(2) 77-84

Mangunwidjaja,D, 2000. Strategi bioproses untuk pengembangan bioindustri di Indonesia. Makalah disampaikan pada Seminar Nasional Agroindustri I, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 9 September

Nakamura, N., Horikoshi, K. 1976. Characterization and some cultural conditions of cyclodextrin glycocyl transferase-producing alkalophilic Bacillus species Agric.Biol.Chem.. 40:753-757.

Nogrady, N., Pocsi, I., and Szentirmai, A. 1995. Cyclodextrin glycosyl transferase may be the only strach-degrading enzyme in *Bacillus macerans*. Biotechnol. Appl.Biochem. 21:233-234.

Pongsawadi, P., Yagiswa, M. 1987. Screening and identification of cyclodextrin glucanotransferase producing bacteria. J. Ferment. Technol. 65:463-467.

Szejtli, J. 1982. Cyclodextrins in food, cosmetics and toiletries. Starch/Starke 34:379-385.