

SIKLODEKSTRIN GLIKOSIL TRANSFERASE DAN PEMANFAATANNYA DALAM INDUSTRI

[Cyclodextrin Glycosyl Transferase and its application in industries]

Budiasih Wahyuntari

Bidang Teknologi Biokatalis, Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung BPPT II/15, tel. 021-756-0536/316-9509, fax. 021-756-0536/316-9510, Jl. M. H. Thamrin 8, Jakarta 10340, e-mail: budiasih@webmail.bppt.go.id; budiasih_solichin@yahoo.com

Diterima 10 Desember 2005 / Disetujui 6 Maret 2006

ABSTRACT

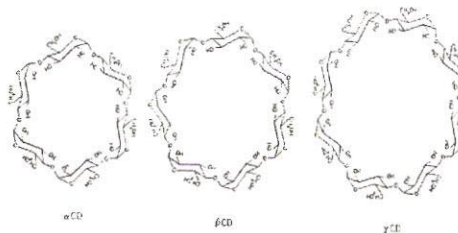
Cyclodextrin glycosyl transferase (CGT-ase) is mainly produced by Bacilli. Systematical name of the enzyme is E.C. 2.4.1.19 α -1,4 glucan-4-glycosyl transferase. The enzyme catalyzes hydrolysis of starch intramolecular, and intermolecular transglycosylation of α -1,4 glucan chains. Cyclodextrins are α -1,4-linked cyclic oligosaccharides resulting from enzymatic degradation of starch by cyclodextrin glycosyl transferase through intramolecular transglycosylation. The major cyclodextrins are made up of 6, 7 and 8 glucopyranose units which are known as α -, β -, and γ -cyclodextrin. All CGT-ase catalyze three kinds of cyclodextrins, the proportion of the cyclodextrins depends on the enzyme source and reaction conditions. The intermolecular transglycosylation ability of the enzyme has been applied in transferring glycosyl residues into suitable acceptor. Transglycosylation by the enzymes have been tested to improve solubility of some flavonoids and to favor precipitation of some glycosides

Keywords: cyclodextrin, cyclodextrin glycosyltransferase

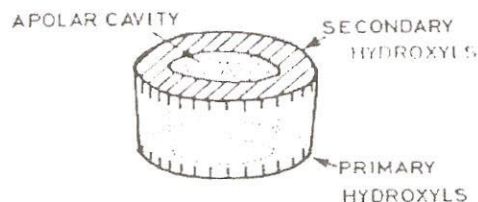
PENDAHULUAN

Siklodekstrin (cyclodextrin) adalah oligosakarida siklis hasil degradasi pati oleh enzim cyclodextrin glycosyl transferase (CGT-ase) yang tersusun atas molekul D-glukosa dengan ikatan α -1,4 glukosida. Dikenal ada tiga macam siklodekstrin yaitu α - β - dan γ -siklodekstrin yang masing-masing tersusun atas 6, 7 dan 8 molekul glukosa. Siklodekstrin merupakan kristal homogen, non-higroskopis dan berstruktur seperti cincin. Struktur kimia ketiga siklodekstrin tersebut terlihat pada Gambar 1. Konformasi C1 dari unit glukopiranosida dan semua grup hidroksil sekunder terletak pada salah satu dari dua ujung cincin dan pada ujung yang lain terdapat semua grup hidroksil primer, dengan demikian kedua ujung rongga siklodekstrin masing-masing dibatasi oleh atom hidrogen dan ikatan glukosida (Szetjli, 1986). Gambar 2 menunjukkan skema struktur fungsional siklodekstrin. Siklodekstrin mempunyai kemampuan berinteraksi dengan bermacam-macam senyawa ionik dan molekular membentuk suatu senyawa kompleks inklusi siklodekstrin. Oleh karena kemampuan yang dimilikinya siklodekstrin dapat dimanfaatkan sebagai bahan peng-inklusi berbagai macam ingredien sehingga siklodekstrin dapat dimanfaatkan dalam berbagai jenis industri seperti industri pangan, farmasi, pertanian, kimia analisa dan lain-lain. Fungsi siklodekstrin dalam kompleks inklusi antara lain untuk mengontrol pelepasan flavor, menutupi bau dan rasa yang tidak disukai, penstabil emulsi,

meningkatkan kemampuan membentuk busa, mengontrol dan menutupi warna serta melindungi ingredien dari kerusakan karena oksidasi, rekasi yang diinduksi oleh cahaya dan dekomposisi oleh panas dan evaporasi (Pszezola, 1988)



Gambar 1. Struktur kimia siklodekstrin (Szetjli, 1988)



Gambar 2. Skema struktur fungsional siklodekstrin(Szetjli, 1988)

Kristal siklodekstrin pertama kali diisolasi dari kultur *Bacillus amylobacter* atau nama yang diberikan sekarang adalah *Clostridium butyricum* oleh Villier pada tahun 1891 (Szetjli, 1988) yang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung pati. Schardinger pada tahun 1903 melaporkan struktur kristal yang serupa dan pada 1904 kristal lain yang diproduksi oleh CGT-ase dari *Bacillus macerans* kemudian masing-masing disebut α - dan β -siklodekstrin atau cyclohexaose dan cycloheptaose. Sedangkan γ -siklodekstrin baru ditemukan kemudian oleh Freudenberg pada tahun 1948 (French et al., 1957). Cyclodextrin sejak akhir 1980-an telah diproduksi secara komersial di Jepang and Amerika Serikat dan saat ini dimanfaatkan sebagai bahan utama penginkapsulasi flavor (Anonim, 2000)

Sejak ditemukan, eksplorasi mikroba yang memproduksi enzim ini serta penelitian karakterisasi enzimnya masih berlanjut hingga kini (Gawande & Patkar, 2001; Martins & Hatti-Kaul, 2002; Cao et al., 2005). Selain itu banyak dilakukan penelitian tentang mekanisme kerja (Uitdehaag et al., 1999; van der Veen et al., 2000; Terada et al., 2001) dan stabilitas enzim dengan cara mengamati struktur kristal enzim (Uitdehaag et al., 2002; Martins & Hatti-Kaul, 2003) dan percobaan mutasi enzim (van der Veen et al., 2000; Leemhuis et al., 2002; Roujeinikova et al., 2002; Alcalde et al., 2003).

SUMBER DAN KLASIFIKASI ENZIM

Hingga saat ini baru bakteri saja yang diketahui menghasilkan enzim siklodekstrin glikosil transferase (*Cyclodextrin glycosyl transferase*, CGT-ase). Belum ada penemuan yang menyatakan bahwa kapang, khamir, tumbuhan maupun hewan tingkat tinggi juga menghasilkan enzim ini. Selain *B. macerans*, telah diketahui bahwa ada beberapa galur *Bacilli* bisa menghasilkan enzim tersebut. Galur *Bacilli* yang telah dipublikasikan sebagai penghasil CGT-ase yaitu *B. megatorium*; *B. circulans*; *Bacillus sp* (alkalofilik); *B. stearothermophilus*; *pneumonia*; *B. ohbensis*; *B. subtilis* no.313 dan *Bacillus sp* AL6 (Kitahata, 1988). Genera lain yang dilaporkan juga memproduksi siklodekstrin antara lain *Thermoanaerobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella* dan *Micrococcus* (Dijkhuizen et al., 1995). Telah dilaporkan pula bahwa archaea juga memproduksi enzim ini (Bertoldo & Antranikian, 2002; Rashid et al., 2002).

Diantara semua enzim penghasil siklodekstrin tidak satupun yang memproduksi hanya satu jenis siklodekstrin saja. Semuanya menghasilkan tiga macam siklodekstrin walaupun dengan perbandingan yang berbeda-beda. Siklodekstrin glikosil transferase diklasifikasi berdasarkan jenis siklodekstrin yang paling banyak dihasilkan oleh enzim yang bersangkutan (Kitahata, 1988). Adapun klasifikasi tersebut adalah sebagai berikut: Enzim tipe *B. macerans* adalah enzim yang terutama memproduksi α -siklodekstrin; enzim tipe

B. megatorium adalah enzim penghasil β -siklodekstrin dan enzim tipe *Bacillus sp* AL6 adalah enzim penghasil γ -siklodekstrin.

Siklodekstrin glikosil transferase selain mengkatalisa terbentuknya siklodekstrin dari pati juga mengkatalisa proses kopling atau disproporsionasi dan hidrolisa pati (Kitahata, 1988). Proses siklisasi merupakan reaksi transglikosilasi intramolekuler, sedangkan proses kopling merupakan reaksi transglikosilasi intermolekuler. Ketiga macam reaksi tersebut bisa digambarkan sebagai berikut:

1. Reaksi transglikosilasi intramolekuler:
Pati \rightarrow α -, β - dan γ -siklodekstrin
2. Reaksi transglikosilasi intermolekuler:
Pati + sakarida (sebagai penerima) \rightarrow maltooligosilsakarida
1. Hidrolisis:
Pati (atau siklodekstrin) \rightarrow maltooligosilsakarida

Transglikosilasi intramolekuler

CGT-ase memproduksi siklodekstrin melalui proses transglikosilasi intramolekuler dengan cara menyerang dari luar suatu ikatan α -1,4 glikosida pada sisi non reduksi suatu α -1,4 glukana yang mempunyai panjang rantai lebih besar dari 7 (tujuh) molekul glukosa (Kobayashi, 1978) Apabila digunakan maltosa dan maltotriosa sebagai substrat, CGT-ase dari *B. megatorium*, *B. ohbensis* dan *Bacillus sp* alkalofilik. CGT-ase pertama-tama mengkatalisa proses transglikosilasi intermolekuler terhadap maltosa dan maltotriosa menghasilkan maltooligosakarida dengan panjang rantai lebih besar daripada 7 (tujuh) unit glukosa baru kemudian menghasilkan siklodekstrin dari maltooligosakarida tersebut (Kitahata, 1988). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa siklodekstrin yang dihasilkan dari maltosa dan maltotriosa berkurang seiring dengan lamanya waktu inkubasi. Ini menunjukkan terjadi dekomposisi siklodekstrin karena proses transglikosilasi intermolekuler pada maltosa dan maltotriosa. Maltooligosakarida terpendek yang bisa diperpanjang dan disiklisasi menjadi siklodekstrin oleh CGT-ase dari *K. pneumoniae* adalah maltopentaosa, sedangkan maltooligomer yang lebih pendek akan menghambat siklisasi. Apabila pati digunakan sebagai substrat, pada awal inkubasi CGT-ase hanya mengkatalisa reaksi transglikosilasi intramolekuler yang ditandai dengan meningkatnya konsentrasi siklodekstrin yang diproduksi dengan meningkatnya waktu inkubasi.

Nisbah α ; β - & γ - siklodekstrin yang dihasilkan dari pati terlarut berbeda-beda tergantung pada sumber CGT-ase yang digunakan. CGT-ase dari *B. macerans*, *B. stearothermophilus* dan *K. pneumoniae* menghasilkan siklodekstrin dengan proporsi terbanyak α -siklodekstrin. Sedangkan proporsi β -siklodekstrin terbanyak dihasilkan dari CGT-ase dari *B. megatorium*, *B. circulans* dan *B. ohbensis* sedangkan *Bacillus sp* alkalofilik memproduksi

γ -siklodekstrin dengan perbandingan terbanyak (Kitahata, 1988)

Jenis siklodekstrin yang dihasilkan, selain tergantung pada sumber CGT-ase juga dipengaruhi oleh adanya surfaktan. Surfaktan menyebabkan konformasi heliks substrat berubah. Sodium lauril sulfat menstimulasi pembentukan α -siklodekstrin sedangkan triton sangat efektif untuk mempengaruhi pembentukan β -siklodekstrin. Pembentukan γ -siklodekstrin oleh CGT-ase dari *K. pneumoniae* meningkat dengan adanya sodium acetat dan penambahan bromobenzen setelah inkubasi berjalan 7 (tujuh) jam (Bender, 1983).

Transglukosilasi intermolekuler

Dalam proses ini terjadi pemindahan molekul glukosa dari oligosakarida yang satu ke oligosakarida yang lain. Spesifitas senyawa penerima dari CGT-ase *B. megatorium* dan *B. macerans* serupa tetapi berbeda kekuatan aktifitas transglukosilasinya, CGT-ase *B. megatorium* lebih kuat daripada CGTase dari *B. macerans* (Kitahata, 1988). Monosakarida dan turunannya yang digunakan dalam penelitian digolongkan menjadi 3 (tiga) grup berdasarkan efisiensinya sebagai penerima molekul glukosa dalam reaksi transglukosilasi. Grup A adalah golongan yang paling efisien sebagai penerima, yaitu L-sorbose, D-glukosa, D-xilosa, 6-deoksi-D-glukosa, metil- α dan β -D-glukosida. Grup B adalah golongan yang kurang efektif daripada grup A, terdiri atas 2-deoksi-D-glukosa dan 3-O-metil-D-glukosa. Sedangkan grup C adalah golongan yang tidak efektif sebagai penerima yaitu D-manosa, D-ribosa, D-galaktosa dan gula alkohol. Melihat penggolongan tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa senyawa yang efektif sebagai penerima molekul glukosa dalam reaksi transglukosilasi adalah senyawa yang mempunyai struktur tipe piranosil yang mempunyai konfigurasi sama dengan glukopiranosil dengan gugus hidroksil bebas pada C2, C3 dan C4. Kedua CGT-ase yang digunakan dalam pengamatan tersebut diatas hanya mentransfer residu glikosil kepada grup hidroksil pada posisi C4 dari D-glukosa, D-xilosa, 6-deoksi-D-glukosa, 2-deoksi-D-glukosa dan 3-O-metil-D-glukosa dengan perkecualian pada C3 grup hidroksil dari L-sorbose.

Jenis produk siklodekstrin yang dihasilkan oleh kedua enzim tersebut juga berbeda. Pada awal konversi dengan menggunakan substrat pati terlarut, CGT-ase *B. macerans* mengkatalisa transglukosilasi intramolekuler dengan transfer unit utama adalah residu rantai glukosa yang terdiri dari 6 molekul sedangkan pada CGT-ase dari *B. megatorium* residu rantai glukosa yang dipindahkan tersusun atas 7 unit glukosa. Oleh karena itu produk utama masing-masing enzim tersebut adalah α - dan β -siklodekstrin. Pada percobaan menggunakan α -siklodekstrin sebagai donor dan glukosa radioaktif sebagai penerima, perbedaan jenis produk kedua enzim tersebut pada awal transglukosilasi intermolekuler lebih

disebabkan oleh aksi serangan berganda. Aksi serangan berganda lebih banyak pada CGTase *B. megatorium* daripada CGT-ase *B. macerans*.

Reaksi hidrolisis

CGT-ase juga mengkatalisa hidrolisis pati terlarut dan siklodekstrin menghasilkan bermacam oligosakarida. Nisbah aksi hidrolisis terhadap aksi katalitik total (jumlah transglukosilasi inter-molekuler dan hidrolisis) untuk CGT-ase dari *B. megatorium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* dan *B. macerans* masing-masing adalah 1,9; 2,0, 8,3 dan 2,0% dan nisbah tersebut tidak dipengaruhi oleh kondisi reaksi seperti pH dan suhu (Kitahata & Okada, 1982).

PRODUKSI CGT-ASE

CGT-ase telah diproduksi secara komersial walaupun hanya di beberapa negara saja yaitu antara lain Jepang, Hongaria (Setzjli, 1988) dan Amerika Serikat (Psezola, 1988). Produksi CGT-ase dilakukan dengan cara membiakkan bakteri penghasil CGTase dalam kultur terendam. Pati adalah sumber carbon terbaik bagi bakteri penghasil CGT-ase dan pati yang telah biasa digunakan adalah pati kentang terlarut. Untuk mempertahankan pH medium secara efektif digunakan Kalsium dan Natrium karbonat. Secara umum, cairan kultur bakteri penghasil CGT-ase tidak mengandung enzim pemecah pati yang lain selain CGT-ase (Kitahata, 1988). Hal ini terjadi karena siklodekstrin yang dihasilkan bersifat menghambat terhadap enzim penghidrolisa pati lainnya. Siklodekstrin menghambat adsorpsi α -amilase biji-bijian pada granula pati sehingga menghambat degradasi amilolitiknya (Setzjli, 1988). Beberapa hasil penelitian yang dipublikasikan menyatakan bahwa β -amilase ubijalar juga dihambat oleh siklodekstrin. Enzim pullulanase dari *K. pneumoniae* juga dihambat oleh siklodekstrin sedangkan amilase dari *B. polymyxa*, pankreas babi (Thoma et al, 1960) dan *Aspergillus oryzae* (Ohnishi, 1971) hanya bisa menghidrolisa siklodekstrin dengan laju reaksi yang sangat kecil. Oleh karena itu larutan enzim kasar bisa dihasilkan hanya dengan memisahkan larutan kultur dari biomasanya.

Produksi CGT-ase dengan menggunakan bakteri yang telah direkombinasi telah pula dilakukan. Penelitian kloning gen CGT-ase serta overekspresi gen yang telah dikloning tersebut kedalam bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* untuk meningkatkan produksi CGT-ase secara drastis telah pula dilakukan oleh beberapa peneliti (Schmidt, 1989; Wouters et al, 2003).

PEMANFAATAN CGT-ASE

Pemanfaatan utama enzim CGT-ase adalah untuk memproduksi siklodekstrin dari bahan baku pati. Kemampuan CGT-ase untuk mengkatalisa reaksi selain

siklisasi tetapi juga proses kopling atau penguraian siklodekstrin yang telah terbentuk merupakan suatu kendala untuk proses produksi siklodekstrin karena akan menurunkan yield siklodekstrin. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk memanfaatkan kemampuan katalisis CGT-ase tersebut terutama proses transglukosilasi intermolekuler. Reaksi glikosilasi intermolekuler CGT-ase dicoba untuk dimanfaatkan dalam pengendapan berbagai macam glikosida yaitu salisin, rubusoside, steviosida, dan geniposida (Kometani, 1993). Glukosida yang digunakannya merupakan glukosida yang tidak larut dalam air. Hasil percobaan tersebut menunjukkan bahwa semua glukosida yang digunakan merupakan penerima transglukosilasi yang efektif dengan efektifitas yang bervariasi (32,7%-51,8%). Pemanfaatan fenomena ini ditujukan untuk pemurnian glukosida yang antara lain merupakan substansi aktif obat-obatan Cina yang dalam proses konvensional sangat sukar dipresipitasi.

Reaksi transglukosilasi CGT-ase juga dicoba untuk mentransfer senyawa sakarida ke senyawa penerima flavonoid (Kometani, 1994). Flavonoid pada umumnya terdapat pada permukaan atau sel epidermis daun yang berwarna hijau yang diduga mempunyai kemampuan proteksi terhadap radiasi sinar ultra violet dan menekan fotoperoksidasi dalam kloropias. Flavonoid hesperidin diketahui sebagai vitamin P yang mempunyai efek hipotensif kuat. Karena flavonoid yang digunakan pada umumnya larut pada suasana alkali maka mereka menggunakan CGT-ase dari *Bacillus sp* alkalofilik. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa suasana netral dan basa tidak memberikan perbedaan transglukosilasi terhadap sakarida yang digunakan (D-glukosa, maltosa, maltotriosa, D-xylosa, L-sorbosa dan L-rhamnosa), tetapi terdapat perbedaan besar pada transglukosilasi pada flavonoid yang digunakan, dan transglukosilasi jauh lebih efektif dilakukan pada suasana alkalis (pH 10) daripada pH 5. Flavonoid yang mengandung rutinosa (deosmin dan hesperidin) lebih efektif ditransglukosilasi daripada flavonoid yang mengandung neohesperidin (naringin dan neohesperidin). Setelah ditransglukosilasi, flavonoid yang semula tidak larut dalam air akan menjadi larut dalam air, sehingga flavonoid tersebut memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai bahan fungsional fisiologis untuk pangan dan obat-obatan. Flavonoid yang mempunyai aktivitas hipotensif menjadi mungkin untuk dikembangkan sebagai bahan pelindung terhadap radiasi sinar ultraviolet.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcalde, M. Plou, F.J. Perez-Boada, M. Garcia-Arellano, H. Valdez, I. Mendez, E. Ballesteros, A. 2003. Chemical modification of carboxylic residues in a cyclodextrin glucanotransferase and its implication in the hydrolysis/transglycosylation of the α -amylase family. 26:57-67
- Anonim. 2000. Corn Annual 2000: History of corn refining in the US. <http://www.corn.org/web/cachpt2-2.htm>
- Bender, H. 1983. Cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1 and *Bacillus macerans*: Quantitative analysis by high performance liquid chromatography of the (1-4) α -D-glucopyranosyl transfer products from some linear and cyclic substrates. Carbohydr Res 117: 1-11.
- Bertoldo, C and Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology. 6:151-160.
- Cao X, Z Jin, Wang X, F Chen. 2005. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus* species: purification and characterization. Food Res Int. 38:309-314
- Dijkhuizen, L., D. Peninga, H. J. Rozeboom, B. Strokopytov and B. W. Dijkstra. 1995. Protein Engineering of cyclodextrin glycosyl transferase from *Bacillus circulans* strain 251. In: S. B. Petersen, B. Svensson and S. Pedersen (eds) Carbohydrate Bioengineering, Elsevier Science B.V.: 165-174
- French, D., In: M. L. Wolfrom & R. S. Tipson (eds). 1957. Advances in carbohydrate chemistry, Academic Press, Inc, Publishers, New York,
- Gawande, B.N And Patkar, A.Y. 2001. Purifikasi and properties of a novel raw strach degrading-cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. Enz Microbiol Technol. 28: 735-743
- Kitahata, S. & Okada, S. 1982. Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* and *B. macerans*. J. Jpn. Soc. Starch. Sci. 29: 7-12.
- Kitahata, S. 1988. Cyclomaltodextrin glucanotransferase, In: T. Yamamoto, S. Kitahata, K. Hiromi, M. Ohnishi, N. Miura, R. Shinke and S. Okada (eds), Handbook of amylases and related enzymes, Pergamon Press, Oxford G.B.: 154-164.
- Kobayashi, S. 1978. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase, Carbohydrate res, 61:
- Kometani, T. 1993. A new method for precipitation of various glucosides with cyclodextrin glucanotransferase, Biosci. Biotech. Biochem. 56: 1185-1187

- Kometani, T. 1994. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* sp and transglycosylation at alkaline pH, *Biosci. Biochem*, 58:
- Leemhuis, H. Dijkstra B.W. Dijkhuizen, L. 2002. Mutations converting cyclodextrin glycosyltransferase from transglycosylase into a starch hydrolase. *FEBS letters*. 514:189-192
- Martins, R.F. and Hatti-Kaul, R. 2002. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkalophilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enz Microbiol Technol*, 30: 116-124
- Martins.R.F and Hatti-Kaul, R. 2003. *Bacillus agaradhaerens* LS-3C cyclodextrin glycosyltransferase: activity and stability. *Enz Microbiol Technol*. 33: 819-827
- Ohnisi, M. 1971. Studies of the interaction of substrate analogues with bacterial liquefying α amylase by means of spectrophotometry and steady state kinetics. *J. Biochem*, 69: 181-189.
- Pszczola, D. E. 1988. Production and potential food applications of cyclodextrins, *J. Food. Tech.*
- Rashid, N. Cornista, J. Ezaki, S. Fukui, T. Atomi, H. Imanaka, T. 2002. Characterization of an archaeal cyclodextrin glucosyltransferase with a novel C-terminal domain. *J. Bacteriol*. 184: 777-784
- Roujeinikova, A. Raasch, C. Sedelnikova S. Liebl, W. Rice, D.W. 2002. Crystal structure of *Thermotoga maritima* 4- α -glucanotransferase and its acarbose complex: implication for substrate specificity and catalysis. 321:149-162
- Schmidt, G. 1989. Cyclodextrin glycosyl transferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Tibtech*. 7: 244-248.
- Szejtli J. 1988. "Cyclodextrin technology", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Terada, Y. Sanbe, H. Takaha, T. Kitahata, S. Koizumi, K. Okada, S. 2001. Comparative study of cyclization reactions of three bacterial cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Appl. Environ. Microbiol*. 67:1453-1460.
- Thoma, J. A. Koshland, D. E. 1960. Competitive inhibition by substrate during enzyme action. Evidence of induced-fit theory. *J. American Chem Society*, 82: 3329-3333.
- Uitdehaag, J.C.M. Kalk, K.H. van der Veen, B.A. Dijkhuizen, L. 1999. The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. *J. Biol. Chem*. 274:34868-34876
- Uitdehaag, J.C.M. van der Veen, B.A. Dijkhuizen. Dijkstra, B.W. 2002. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α -amylase family. *Enz Microbiol Technol*. 30:295-304
- Van der Veen, B.A. van Alaebeek, G-J. W.M. Uitdehaag, J.C. Dijkstra, B.W. Dijkhuizen, L. 2000. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *FEBS*. 67:658-665.
- Van der Veen, B.A. Uitdehaag, J.C. Dijkstra, B.W. Dijkhuizen, L. 2000. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. 1543:336-360.
- Wouters, J. Bergman, B. Janson, S. 2003. cloning and expression of a putative cyclodextrin glycosyltransferase from the symbiotically competent cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 9229. *FEMS Microbiol lett*. 219:181-185.