

KARAKTERISASI ENZIM PENDEGRADASI SENYAWA ASETONITRIL DALAM SEL *Fusarium solani* AIII2

YB Subowo

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI, Bogor

ABSTRACT

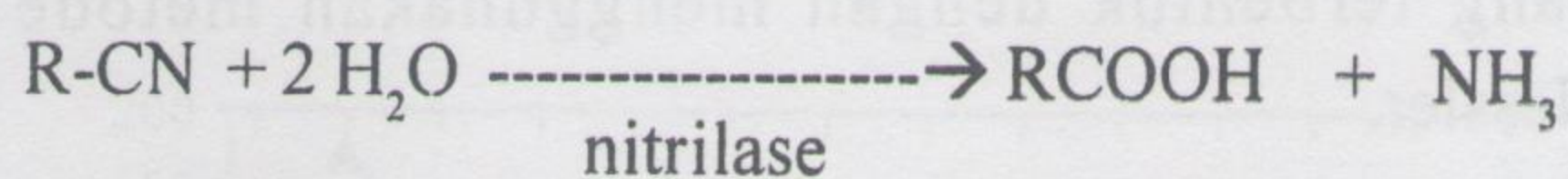
An acetonitrile degrading-enzyme of *Fusarium solani* AIII2 from whole cells were studied. Decrease of acetonitrile concentration and formation of its degraded products were determined by gas chromatography. Ammonia analysis was done by Nessler's method. *Fusarium solani* AIII2 degraded 1% (v/v) acetonitrile and produced acetic acid and ammonia. Acetonitrile was degraded by nitrilase, with a rate of $0.903 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ dry weight cells. Maximum nitrilase activity of *Fusarium solani* AIII2 was observed at pH 7 and 40°C with K_m value 48.07 mM .

Key words: Characterization, nitrilase, *Fusarium*.

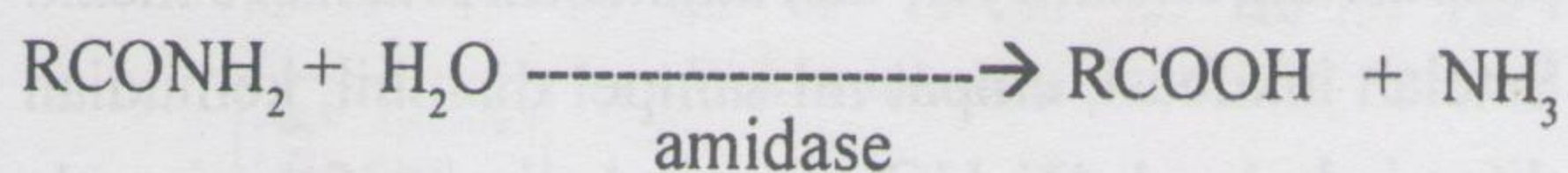
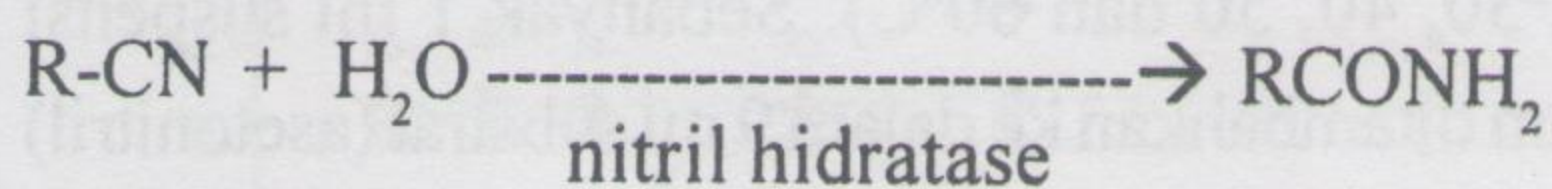
PENDAHULUAN

Asetonitril (CH_3CN) dapat didegradasi secara enzimatis oleh mikroba menjadi senyawa yang lebih sederhana. *Nocardia rhodochrous* LL100-21 dapat tumbuh pada media mengandung asetonitril 1% dan 2%, dan memanfaatkan asetonitril sebagai sumber C dan N (DiGeronimo & Antoine, 1976). *Corynebacterium* D5 mampu mendegradasi asetonitril 5% (v/v) dengan laju degradasi sebesar $0,906 \mu\text{mol menit}^{-1} \text{mg}^{-1}$ sel bobot kering dengan produk degradasi berupa asetamida, asam asetat, dan amonium (Sunarko *et al.*, 1999).

Senyawa nitril didegradasi secara enzimatis oleh 2 macam enzim, yaitu nitrilase dan nitril hidratase. Nitrilase (EC.3.5.5.1) mengubah secara langsung senyawa nitril menjadi asam karboksilat sebagai turunannya dan amonia.



Nitril hidratase (EC.4.2.1.84) mengubah nitril menjadi amida. Selanjutnya amida diurai menjadi asam karboksilat sebagai turunannya dan amonia oleh amidase (EC.3.5.1.4) (Kobayashi & Shimizu, 2000).



Aktivitas nitrilase dan nitril hidratase dipengaruhi oleh pH media, temperatur, ion logam

dan lain-lain. Pada umumnya aktivitas enzim tertinggi terjadi pada pH netral. *Fusarium merismoides* TG-1 dapat tumbuh pada media mengandung TAN 0,1%; pertumbuhan maksimal dicapai antara pH 6,5 – 7,5 (Asano *et al.*, 1981). Molekul enzim disusun oleh protein, dan pada suhu tinggi akan mengalami denaturasi, sehingga aktivitasnya berkurang. DiGeronimo & Antoine (1976) melaporkan bahwa *Nocardia rhodochrous* LL100-21 dapat tumbuh pada asetonitril 2%; pertumbuhan optimum dicapai pada suhu 45°C . Beberapa ion logam menghambat aktivitas enzim; Ion Hg^{2+} dan Ag^{2+} menghambat benzonitrilase A sebesar 92-100% (Bandyopadhyay *et al.*, 1986).

Kapang *Fusarium solani* AIII2 terbukti dapat mendegradasi asetonitril pada penelitian terdahulu. Karakter enzim pendegradasi asetonitril belum diketahui, oleh karena itu dilakukan penelitian ini.

Tujuan penelitian

Melakukan karakterisasi enzim pendegradasi asetonitril dalam sel *Fusarium solani* AIII2 serta membandingkan pola reaksi degradasinya dengan pola reaksi yang sudah diketahui.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Isolat kapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Fusarium solani* AIII2, hasil isolasi dari limbah industri peleburan baja. Isolat ini terbukti dapat mendegradasi asetonitril.

Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk dari Sigma dan Merck, meliputi: asetonitril, asetamida, sodium asetat, KH_2PO_4 , NaOH, HCl, ZnCl_2 , NiCl_2 , CoCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, reagen Nessler.

Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, media Taoge Ekstrak Agar (TEA) (Jutono *et al.*, 1980), media mineral (Meyer & Schlegel, 1983), dan bufer posfat.

Metode

Produksi biomassa *Fusarium solani* AIII2

Biomassa diproduksi dengan cara menumbuhkan isolat pada media mineral mengandung asetonitril 1% (v/v) dengan volume 2 L dalam fermentor berkapasitas 3L, dilakukan pengadukan pada kecepatan 100 rpm dan diberi aerasi. Setelah 4 hari miselium dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, selama 30 menit. Sebelum digunakan untuk analisis, suspensi miselium disimpan pada suhu -8°C .

Pertumbuhan *F. solani* AIII2 pada asetonitril dan senyawa produk degradasinya

Fusarium solani AIII2 ditumbuhkan pada asetonitril 1%, asetamida 1%, asam asetat 1%, kemudian diinkubasi pada suhu kamar (28°C). Biomassa dipanen pada hari ke 4 dengan cara penyaringan, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 3 hari, dan ditentukan bobot keringnya (Mougin *et al.*, 1994).

Penentuan pola degradasi asetonitril oleh *F. solani* AIII2

Pola degradasi senyawa nitril ditentukan dengan cara menambahkan 1 ml suspensi miselium ke dalam 9 ml bufer 50 mM KH_2PO_4 -NaOH, pH 7,2; yang mengandung asetonitril 1% (v/v). Erlenmeyer diinkubasi di atas *shaker* dengan kecepatan 115 rpm pada suhu ruang selama 180 menit. Dalam selang waktu 0, 15, 30, 60, 90, 150 dan 180 menit, 4 ml sampel diambil dan aktivitas enzim dihentikan dengan menambahkan 1 ml 4N HCl. Sampel kemudian disentrifus pada

kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan diambil untuk penentuan konsentrasi asetonitril, asetamida, asam asetat dengan menggunakan GC (Shimadzu, Model), sedangkan konsentrasi amonium ditentukan dengan menggunakan metode Nessler.

Penentuan nilai K_m dan V_{maks} enzim pendegradasi asetonitril dalam sel *F. solani* AIII2

K_m dan V_{maks} enzim pendegradasi asetonitril dalam sel *F. solani* AIII2 ditentukan dengan cara menambahkan suspensi miselium ke dalam bufer fosfat mengandung asetonitril pada konsentrasi 0; 47,5; 95; 142,5; 190, 237,5; 285 dan 332,5 mM. Amonium yang terbentuk dalam reaksi ditentukan dengan metode Nessler. K_m dan V_{maks} kemudian dihitung berdasarkan persamaan Michaelis-Menten.

Penentuan pengaruh pH terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril dalam sel *F. solani* AIII2

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril ditentukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada kisaran pH 3 - 11 (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). pH substrat diatur dengan menambahkan 4N NaOH atau 4N HCl ke dalam bufer posfat. Sebanyak 1 ml suspensi miselium ditambahkan ke dalam 9 ml substrat (asetonitril) pada tabung erlenmeyer dan diinkubasi di atas *shaker* pada suhu ruang, selama 90 menit. Setelah masa inkubasi, empat ml sampel diambil dan ditambahkan pada 1 ml 4N HCl, kemudian disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk penentuan konsentrasi amonium yang terbentuk dengan menggunakan metode Nessler.

Penentuan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril dalam sel *F. solani* AIII2

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril ditentukan dengan cara mengukur aktivitas enzim pada kisaran suhu $6 - 60^\circ\text{C}$ (6, 10, 20, 30, 40, 50 dan 60°C). Sebanyak 1 ml suspensi miselium ditambahkan ke dalam 9 ml substrat (asetonitril) pada tabung erlenmeyer, dan diinkubasi selama 90 menit. Setelah inkubasi, empat ml sampel diambil, kemudian ditambah 1 ml 4N HCl. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang didapat kemudian digunakan untuk penentuan konsentrasi amonium menggunakan metode Nessler.

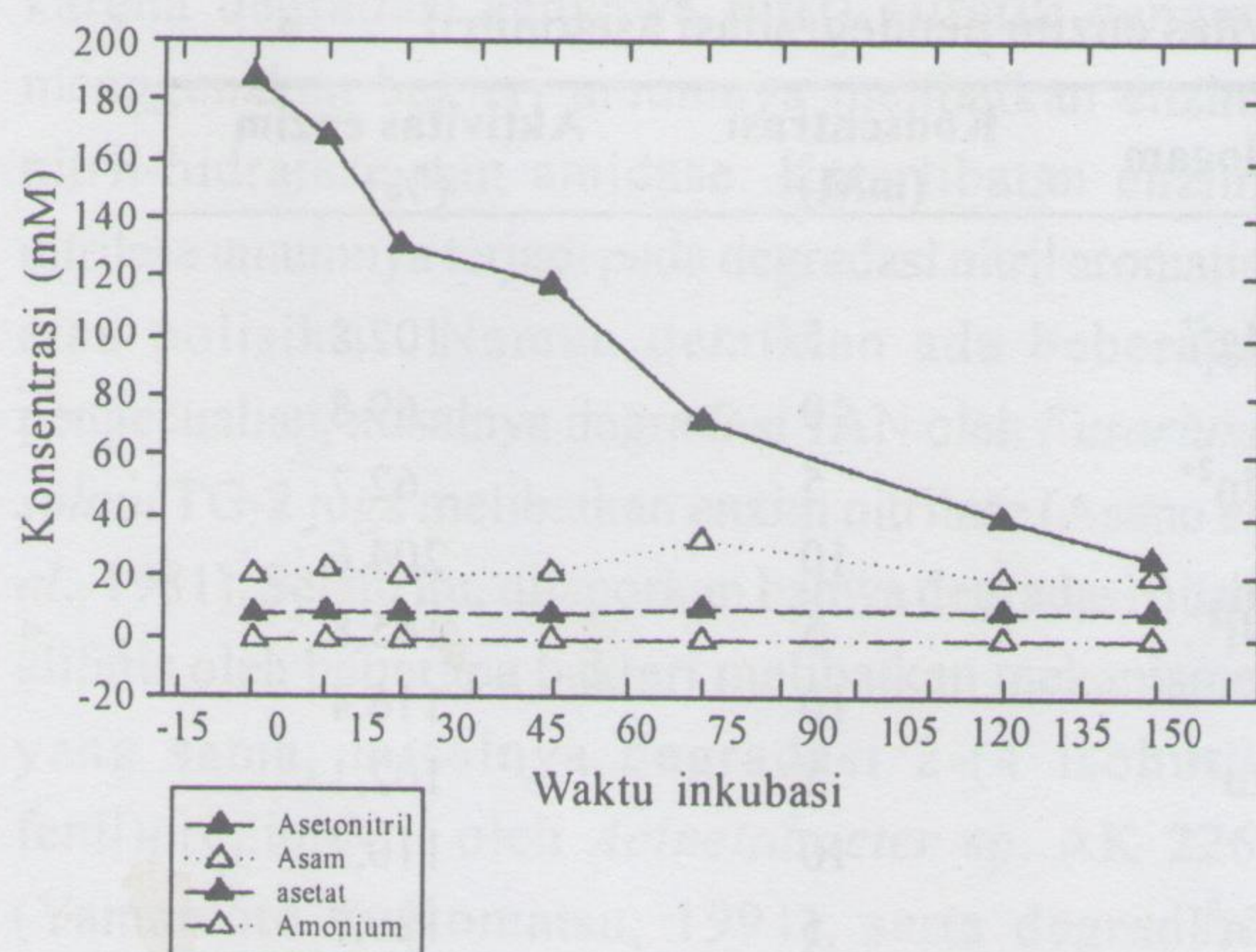
Penentuan pengaruh berbagai ion logam terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetnitril dalam sel *F. solani* AIII2

Pengaruh berbagai ion logam (Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetnitril ditentukan dengan cara menambahkan 5 mM dan 10 mM ion logam ke dalam 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$, pH 7,2). Satu ml suspensi miselium ditambahkan ke dalam 9 ml substrat (asetnitril) dalam tabung erlenmeyer, diinkubasi di atas shaker pada suhu ruang (28°C) selama 90 menit. Empat ml sampel diambil, kemudian ditambah 1 ml 4N HCl. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan digunakan untuk penentuan konsentrasi amonium menggunakan metode Nessler.

HASIL

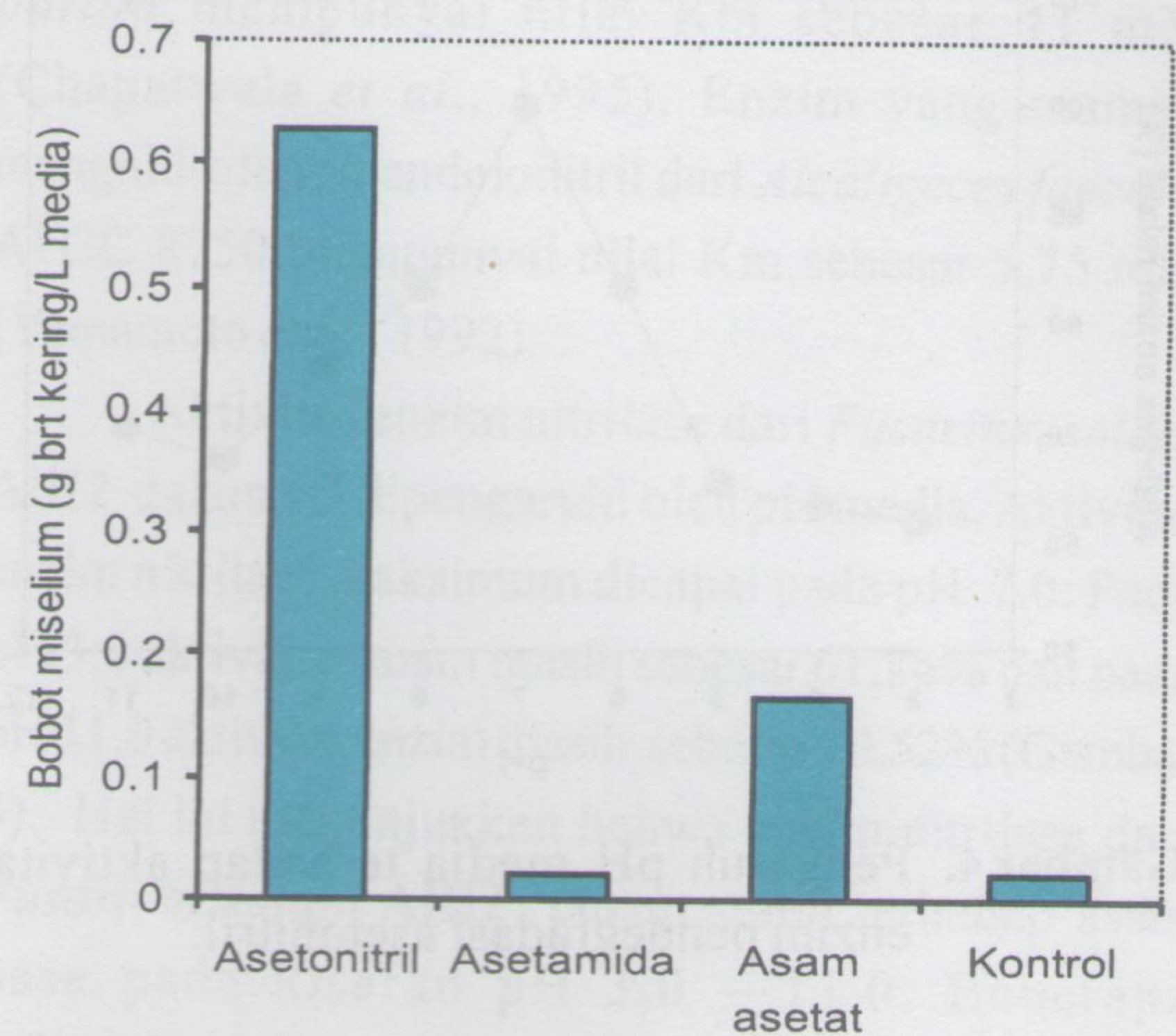
Degradasi asetnitril

Dalam proses degradasi asetnitril 1 % v/v oleh *F. solani* AIII2 dapat dideteksi pembentukan asam asetat dan amonium, namun tidak ditemukan adanya asetamida dalam media reaksi. Laju rata-rata degradasi asetnitril oleh *F. solani* AIII2 sebesar $0,903 \mu\text{mol menit}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bobot kering sel, sedangkan laju rata-rata pembentukan asam asetat hanya sebesar $0,371 \mu\text{mol menit}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bobot kering sel. Setelah inkubasi selama 180 menit, dari 190 mM asetnitril yang diberikan masih tersisa 27,21 mM, sedangkan asam asetat yang terbentuk sebesar 21,24 mM dan amonium yang terbentuk sebesar 9,31 mM (Gambar 1).



Gambar 1. Pola degradasi asetnitril 1% (v/v) oleh *F. solani* AIII2.

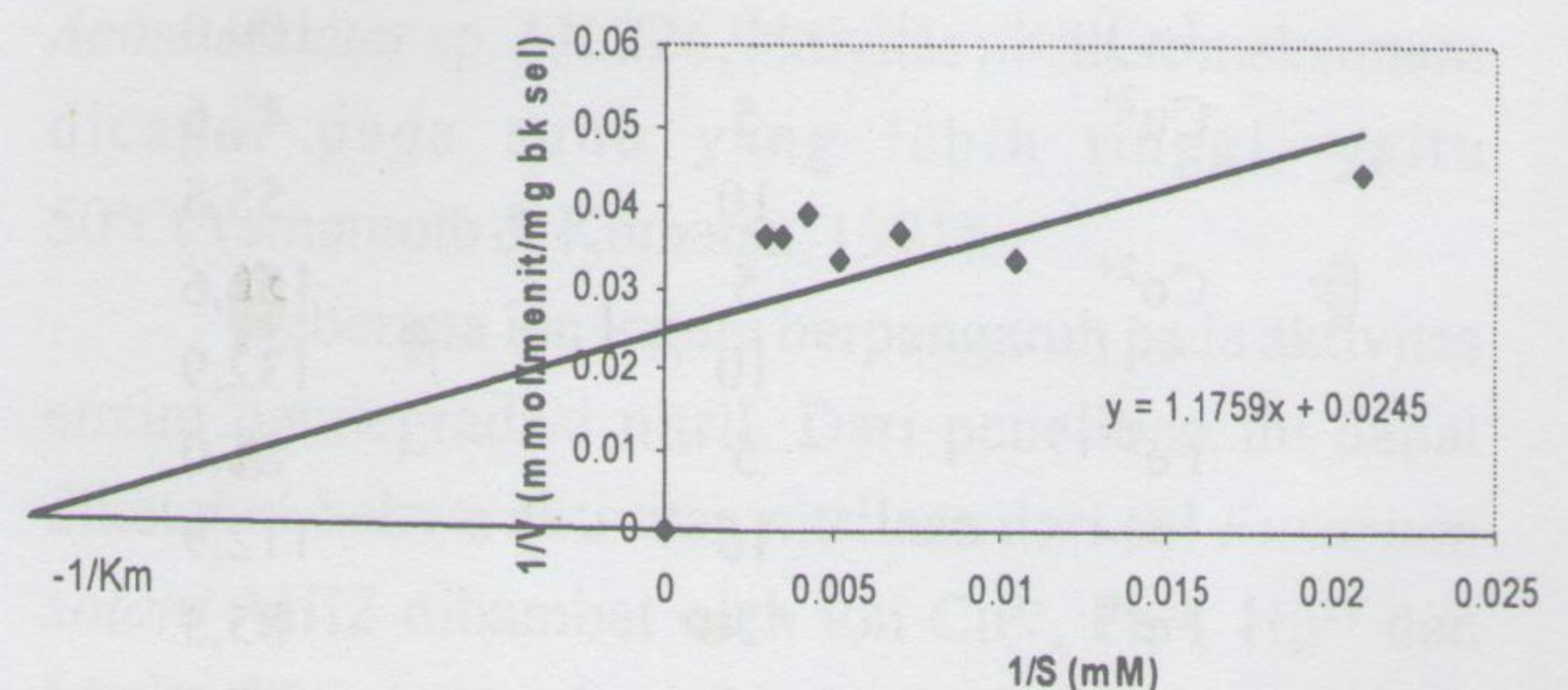
Selain itu, untuk menentukan enzim yang terlibat dalam proses degradasi asetnitril tersebut, *Fusarium solani* AIII2 ditumbuhkan pada asetnitril, asetamida, dan asam asetat. Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa ternyata isolat tersebut hanya mampu tumbuh pada asetnitril dan asam asetat, namun tidak pada asetamida (Gambar 2).



Gambar 2. Pertumbuhan *F. solani* AIII2 pada asetnitril dan produk degradasinya.

Nilai K_m dan V_{maks} enzim pendegradasi asetnitril dari *F. solani* AIII2

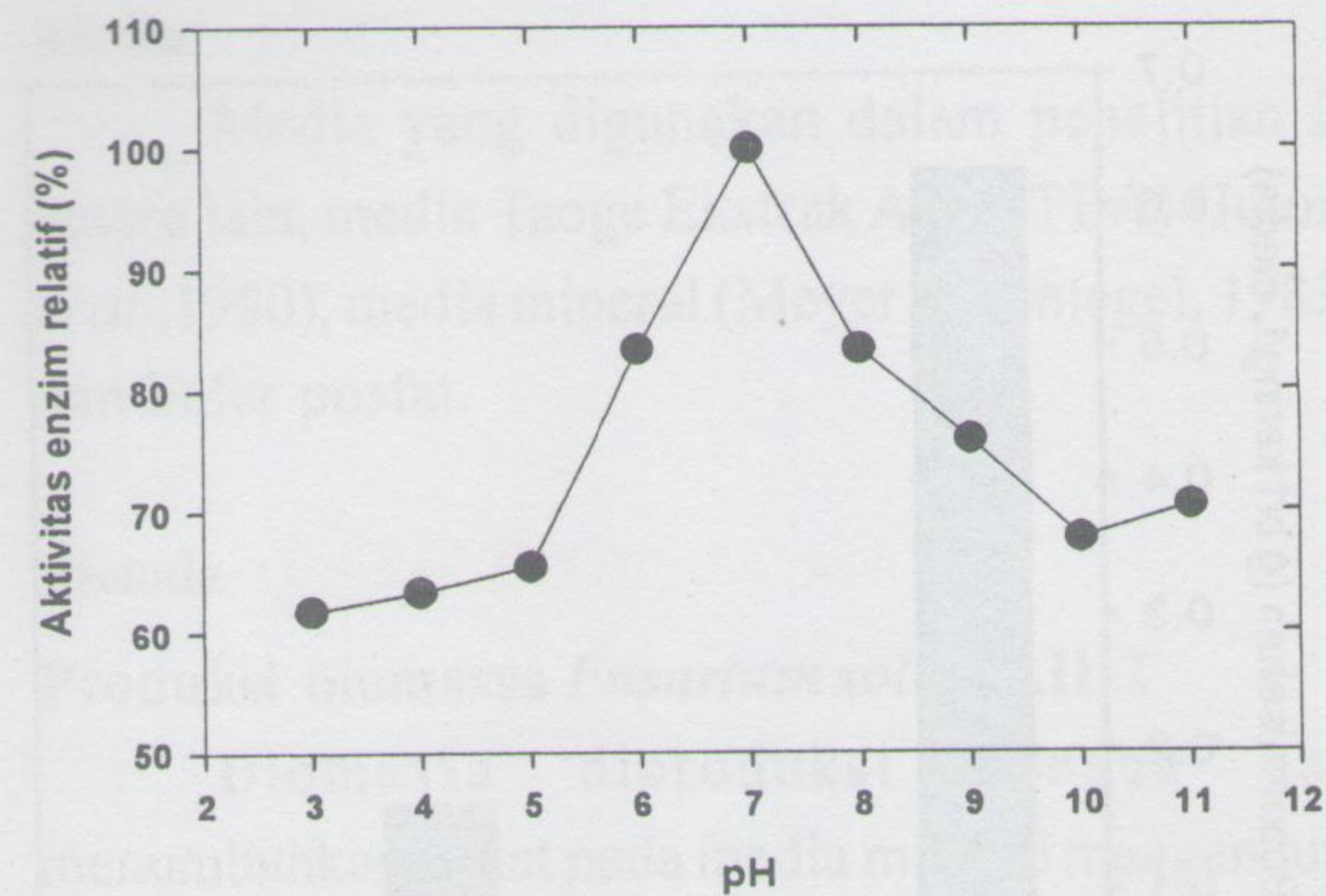
Dari pengujian pengaruh konsentrasi asetnitril terhadap aktivitas enzim yang terlibat dalam degradasi senyawa tersebut, dapat ditentukan berdasarkan Michaelis-Menten bahwa nilai K_m dan V_{maks} enzim pendegradasi asetnitril dalam sel *F. solani* AIII2 adalah masing-masing sebesar 48,07 mM dan $40,81 \text{ mmol menit}^{-1} \text{mg}^{-1}$ berat kering sel (Gambar 3).



Gambar 3. Penentuan nilai K_m dan V_{maks} dari enzim pendegradasi asetnitril dalam sel *F. solani* AIII2 berdasarkan Michaelis-Menten

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril dari sel *F. solani* AIII2

Seperti terlihat pada Gambar 4, aktivitas tertinggi enzim pendegradasi asetonitril dari sel *F. solani* AIII2 pada pH 7,0. Namun demikian, pada pH 3,0 aktivitas enzim masih sekitar 61,84 % dan pada pH 11,0 masih sekitar 70,52% dari aktivitas maksimalnya..

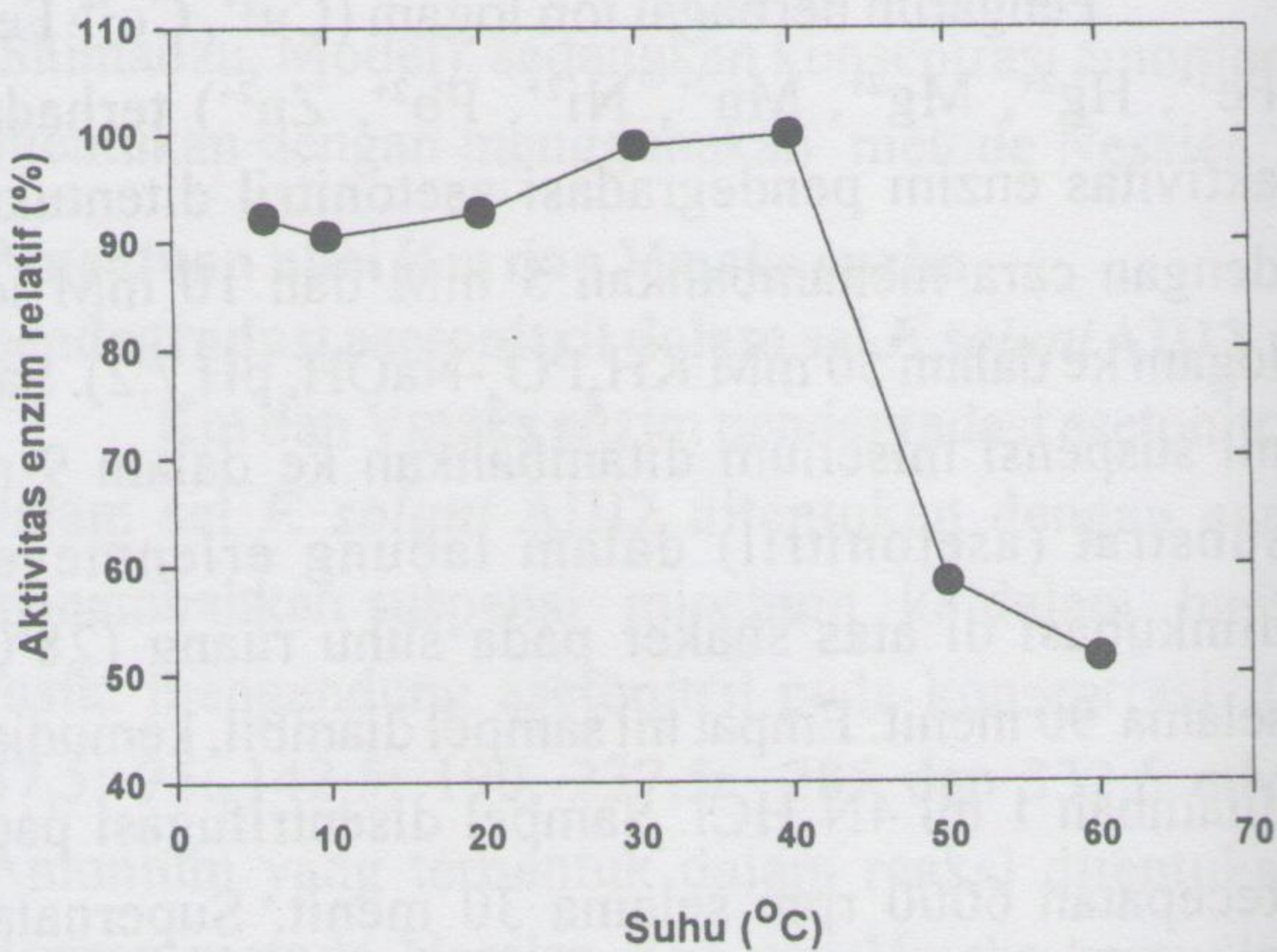


Gambar 4. Pengaruh pH media terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril.

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril dari sel *F. solani* AIII2

Aktivitas enzim pendegradasi asetonitril dari sel *F. solani* AIII2 dapat diamati pada kisaran suhu antara 6°C sampai dengan 60°C, dengan aktivitas maksimum pada suhu 40°C. Namun demikian pada suhu 6°C aktivitas enzim masih menunjukkan nilai tinggi, yaitu sebesar 92,2%, dan pada suhu 60°C

masih sebesar 51,5% dari aktivitas maksimalnya (Gambar 5).



Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril.

Pengaruh berbagai ion logam terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril 1% dari sel *F. solani* AIII2

Seperti ditunjukkan dalam Tabel 1 pengaruh ion-ion logam terhadap aktivitas enzim pendegradasi nitril dalam sel *F. solani* AIII2 sangat beragam, dapat berperan sebagai inhibitor maupun aktivator. Namun secara umum dapat disimpulkan bahwa ion-ion Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} dan Mg^{2+} mempunyai kecenderungan untuk menghambat aktivitas enzim pendegradasi nitril dari sel *F. solani* AIII2, sedangkan ion-ion Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} dan Pb^{2+} tampaknya justru mampu meningkatkan aktivitas enzim tersebut .

Tabel 1. Pengaruh berbagai ion logam terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril.

Ion logam	Konsentrasi (mM)	Aktivitas enzim (%)	Ion logam	Konsentrasi (mM)	Aktivitas enzim (%)
(-)	0	100,0			
Cu^{2+}	5	42,6	Mg^{2+}	5	107,8
	10	55,5		10	69,8
Co^{2+}	5	151,6	Mn^{2+}	5	62,7
	10	132,9		10	204,6
Fe^{2+}	5	81,0	Ni^{2+}	5	145,8
	10	112,9		10	116,4
Fe^{3+}	5	85,3	Pb^{2+}	5	102,1
	10	87,8		10	110,3
Hg^{2+}	5	75,6	Zn^{2+}	5	129,7
	10	67,7		10	92,6

PEMBAHASAN

Dalam proses degradasi asetonitril menggunakan sel *F. solani* AIII2 dapat dideteksi pembentukan asam asetat dan amonium, namun tidak ditemukan adanya asetamida dalam media reaksi (Gambar 1). Tidak terbentuknya asetamida dalam degradasi asetonitril ini menurut Kobayashi & Shimizu (2000) mengindikasikan bahwa proses degradasi asetonitril tersebut melalui alur degradasi yang melibatkan enzim nitrilase, dan tidak melalui alur degradasi yang melibatkan nitril-hidratase dan amidase. Kesimpulan ini diperkuat dengan hasil pengujian pertumbuhan *F. solani* AIII2 pada asetonitril dan kemungkinan produk-produk degradasinya. Terbukti bahwa ternyata isolat tersebut tidak mampu tumbuh pada asetamida. Ini dapat diinterpretasikan bahwa isolat tersebut memang tidak mampu mensintesis amidase, yaitu enzim yang berperan dalam metabolisme asetamida, sehingga isolat tersebut tidak mampu memanfaatkannya sebagai sumber karbon, energi maupun nitrogen dari asetamida. Pernyataan ini juga didukung oleh Nawaz *et al.* (1982) yang menyatakan bahwa mikroorganisme yang hanya mempunyai enzim nitrilase tidak mampu memanfaatkan amida. Dengan hasil di atas dapat disimpulkan bahwa *Fusarium solani* AIII2 mendegradasi asetonitril secara langsung membentuk asam asetat dan amonia, dengan melibatkan enzim nitrilase. Sampai saat ini jarang ada laporan tentang temuan bahwa degradasi asetonitril oleh mikroorganisme dengan melibatkan enzim nitrilase karena degradasi senyawa nitril alifatik dengan menggunakan bakteri umumnya melibatkan enzim nitril-hidratase dan amidase. Keterlibatan enzim nitrilase umumnya terjadi pada degradasi nitril aromatis atau polisiklis. Namun demikian ada beberapa pengecualian, misalnya degradasi TAN oleh *Fusarium solani* TG-2 juga melibatkan enzim nitrilase (Asano *et al.*, 1981). Selain itu, dilaporkan bahwa degradasi nitril alifatis oleh beberapa bakteri melibatkan mekanisme yang sama, misalnya degradasi 2-(4 isobutil fenil)propionitril oleh *Acinetobacter* sp. AK 226 (Yamamoto & Komatsu, 1991), serta degradasi mandelonitril oleh *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 (Yamamoto *et al.*, 1992).

Menurut Lehninger (1982) setiap enzim memiliki K_m yang khas bagi substrat tertentu. Nilai K_m dan V_{maks} enzim nitrilase dari sel *Fusarium solani* AIII2 dapat ditentukan masing-masing sebesar 48,07 mM dan 40,81 mmol/ menit/ mg sel. Sebagai pembanding, beberapa enzim pendegradasi nitril dari beberapa mikroorganisme mempunyai nilai K_m yang berbeda. Enzim pendegradasi asetonitril dari *Pseudomonas putida* mempunyai nilai K_m sebesar 41 mM (Chapatwala *et al.*, 1995). Enzim yang mampu menghidrolisis mandelonitril dari *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 mempunyai nilai K_m sebesar 5,75 mM (Yamamoto *et al.*, 1992).

Aktivitas enzim nitrilase dari *Fusarium solani* AIII2 dalam sel dipengaruhi oleh pH media. Aktivitas enzim nitrilase maksimum dicapai pada pH 7,0. Pada pH 3,0 aktivitas enzim masih sebesar 61,84% dan pada pH 11,0 aktivitas enzim masih sebesar 70,52% (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa enzim nitrilase dari *Fusarium solani* AIII2 cukup stabil terhadap asam basa pada kisaran pH 3,0 – 11,0. Beberapa mikroorganisme dilaporkan mempunyai aktivitas enzim maksimal sekitar pH netral (pH 7,0), *Fusarium solani* yang juga diukur dalam sel utuh, aktivitas tertinggi pada pH 7,0 (Barclay *et al.*, 1998). *Nocardia rhodochrous* LL100-21, tumbuh maksimum pada pH 7 – 8 (DiGeronimo & Antoine, 1976).

Suhu lingkungan berpengaruh pada aktivitas nitrilase dari *Fusarium solani* AIII2. Suhu optimum aktivitas nitrilase diketahui pada suhu 40°C, suhu ini masih lebih rendah dibandingkan pada mikroorganisme berikut. Pada *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, aktivitas nitrilase maksimum pada suhu 40-45°C (Yamamoto *et al.*, 1992) sedangkan pada *Acinetobacter* sp. AK 226, aktivitas nitrilase maksimum dicapai pada suhu yang lebih tinggi, yaitu 50°C (Yamamoto & Komatsu, 1991).

Beberapa ion logam berpengaruh pada aktivitas enzim pendegradasi nitril. Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa aktivitas nitrilase dari sel *Fusarium solani* AIII2 dihambat oleh ion Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} dan Mg^{2+} . Menurut Asano *et al.* (1981) ion Hg^{2+} merupakan salah satu pereaksi sulfhidril. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa enzim pendegradasi mempunyai gugus sulfhidril pada sisi aktifnya. Pada

saat gugus sulfhidril bereaksi dengan ion Hg^{2+} aktivitas enzim menjadi terhambat. CuSO_4 dan ZnCl_2 termasuk reagen tiol. Reagen ini menghambat aktivitas enzim nitrilase (Yamamoto *et al.*, 1992). Ion Fe^{3+} dan Mg^{2+} juga menghambat nitrilase, kemungkinan karena terjadi reaksi kompleks dengan kelompok tiol.

KESIMPULAN

Degradasi asetonitril oleh sel *Fusarium solani* AIII2 terbukti berlangsung melalui satu tahap reaksi dengan melibatkan enzim nitrilase, dengan laju degradasi sebesar $0,903 \text{ mmol menit}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ sel}$. Enzim nitrilase dari sel *F. solani* AIII2 mempunyai nilai K_m sebesar $48,07 \text{ mM}$ dan V_{maks} sebesar $40,81 \text{ mmol menit}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ berat kering sel}$. Enzim nitrilase dari sel *F. solani* AIII2 menunjukkan aktivitas maksimumnya pada pH 7 dan suhu 40°C , dan dihambat oleh keberadaan ion-ion Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} dan Mg^{2+} .

DAFTAR PUSTAKA

- Asano Y, S Ando, Y Tani, H Yamada and T Ueno. 1981. Fungal degradation of Triacrylonitrile. Agric. Biol. Chem. **45** (1): 57-62.
- Bandyopadhyay AK, T Nagasawa, Y Asano, K Fujishiro, Y Tani and H Yamada. 1986. Purification and characterization of Benzonitrilases from *Arthrobacter* sp Strain J-1. Appl. Environ. Microbiol **51** (2): 302-306.
- Barclay M, VA Tett and CJ Knowles. 1998. Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. Enzyme and Microbial Technology **23**: 321-330.
- Chapatwala KD, GRV Babu, ER Armstead, EM White and JH Wolfram. 1995. A kinetic study on the bioremediation of sodium cyanide and acetonitrile by free and immobilized cells of *Pseudomonas putida*. Applied Biochemistry and Biotechnology **51** (52): 717-726.
- DiGeronimo MJ and AD Antoine. 1976. Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. Appl. Environ. Microbiol. **31** (6): 900-906.
- Jutono, J Soedarsono, S Hartadi, SS Kabirun, D Suhadi, Soesanto. 1980. Pedoman praktikum Mikrobiologi Umum. Dep. Mikrobiologi, Fak. Pertanian UGM, Yogyakarta, 181 hal.
- Kobayashi M and S Shimizu. 2000. Nitrile hydrolases. Current Opinion in Chemical Biology **4**:95-102.
- Lehninger AL. 1982. Dasar-dasar Biokimia Jilid 1. Penerbit Erlangga, 242. Meyer O. and H.G. Schlegel. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. Ann. Rev. Microbiol, **37**: 277-310.
- Mougin C, C Laugero, M Asther, J Dubroca, P Frasse and M Asther. 1994. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, **60** (2): 705-708.
- Nawaz MS, TM Heinze and CE Cerniglia. 1992. Metabolism of Benzonitrile and Butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. Applied and Environmental Microbiology, **58** (1): 27-31.
- Sunarko B, Adityarini, USF Tambunan dan N Sulistinah. 1999. Karakterisasi enzim pendegradasi asetonitril dari *Corynebacterium* D5. Jurnal Biologi Indonesia **II** (5): 214-226.
- Yamamoto K and K Komatsu. 1991. Purification and characterization of nitrilase responsible for the enantioselective hydrolysis from *Acinetobacter* sp. AK 226. Agric. Biol. Chem., **55** (6): 1459-1466.
- Yamamoto K, I Fujimatsu and K Komatsu. 1992. Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. Journal of Fermentation and Bioengineering. **73** (6): 425.