

Isolasi dan Karakterisasi Mikrob Pendegradasi Senyawa Nitril

Ahmad Thontowi dan Bambang Sunarko

Pusat Penelitian Bioteknologi- Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

Diterima Juli 2004 disetujui untuk diterbitkan Januari 2005

Abstract

Biotransformation of nitrile compound using microbe represents the best way in eliminating toxicity. Besides, microbes and enzymes of nitriles degradation can be used in synthesis of various chemical compounds with a high economic value. The purpose of this research is to obtain microbial potential for nitriles degradation, to obtain information of physiological of chosen microbe and the characteristic of its enzyme. We have conducted are isolation and selection of microbial nitriles degradation, perception of growth pattern, determination of influence various and concentration of nitriles on microbial growth, determination of enzymes specificity and inductivity, and determination of optimum pH and temperature. The result of microbial isolation from various sources of waste obtained by 12 isolates at acetonitrile, 18 isolates at benzonitrile, 8 isolates at adiponitrile, 1 isolate at lactonitrile, and 1 isolate at β -aminopropionitrile. GLB5 isolate was selected from 46 isolates, because this isolate can grow at some tested nitriles. The best growth of GLB5 isolate in acetonitrile 360 mM, benzonitrile 30 mM, 3-sianopiridin 15 mM, and β -aminopropionitrile 140 mM. The growth of GLB5 isolate in acetonitrile 360 mM were experienced a lag phase during 8 hours, and an exponential phase during 40 hours. Time of cell doubling during 7 hours and 42 minutes, and specific growth rate (μ) equal to $0,09\ h^{-1}$. The character of nitriles degradation enzymes from GLB5 whole cell was inductive, with optimum activity at pH and temperature equal to 7.2 and $40^{\circ}C$.

Key Words: *biotransformation, nitrile compound, microbe*

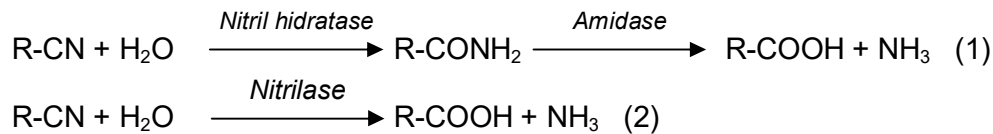
Pendahuluan

Nitril merupakan senyawa organik yang luas penggunaannya dalam industri kimia; sebagai contoh asetonitril digunakan sebagai pelarut, adiponitril untuk prekursor nilon-6,6, dan akrilonitril sebagai prekursor serat akrilonitril dan plastik (Kobayashi & Shimizu, 2000). Akan tetapi, nitril bersifat toksik, mutagenik, dan karsiogenik karena gugus sianonya (-CN), sehingga pelepasannya ke sistem biologis dapat menyebabkan berbagai gangguan kesehatan (Linardi *et al.*, 1996), dan mencemari lingkungan (Nagasawa *et al.*, 1993).

Saat ini, perhatian pada mikrob dan/atau enzim pendegradasi nitril terus meningkat, karena berpotensi untuk dimanfaatkan dalam penanggulangan limbah nitril (Chapatwala *et al.*, 1995), maupun dalam sintesis berbagai senyawa organik bernilai ekonomi tinggi (Langdahl *et al.*, 1996). *Brevibacterium* R312 misalnya, telah digunakan untuk memproduksi asam susu dari laktonitril (Jallageas *et al.*, 1980), dan L-alanin dari β -aminopropionitril (Macadam & Knowles, 1985). Asam nikotinat, senyawa pemula vitamin B3, juga dapat dihasilkan dari hidrolisis 3-sianopiridin dengan memanfaatkan *Nocardia rhochrous* LL100-21 (Vaughn *et al.*, 1988). Produksi akrilamida dan atau asam akrilonitril oleh *Pseudomonas chlororaphis* (Watanabe *et al.*, 1987). Bahkan akhir-akhir ini, upaya riset mulai diarahkan kepada hidrolisis nitril secara regio-selektif untuk memproduksi senyawa-senyawa farmaka yang secara optis aktif (Yamamoto *et al.*, 1992; Bhalla *et al.*, 1999).

Metabolisme senyawa nitril secara mikrobiologis diketahui melalui dua alur reaksi. Alur pertama melibatkan enzim nitril hidratase yang menghidrolisis nitril menjadi amida, dan selanjutnya enzim amidase menghidrolisis amida menjadi asam karboksilat dan

amonium (1). Alur kedua melibatkan enzim nitrilase yang menghidrolisis nitril menjadi asam karboksilat dan amonium (2).



Upaya awal untuk studi nitril adalah dengan mengisolasi mikroba dari berbagai limbah yang diduga mengandung nitril. Upaya ini bertujuan untuk memperoleh mikroba unggul yang layak digunakan dalam biotransformasi dan bioremediasi nitril. Selanjutnya, untuk mendapatkan mikroba dengan enzim nitrilase, nitril-hidratase dan atau amidase dengan aktivitas yang tinggi diperlukan informasi yang rinci mengenai sifat fisiologis isolat terpilih, serta sifat enzim pendegradasinya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam pengembangan biotransformasi senyawa-senyawa nitril untuk memproduksi senyawa-senyawa lain yang mempunyai nilai ekonomi tinggi.

Materi dan Metode

Mikroba diisolasi dari pengolahan limbah industri PT. Krakatau Steel Cilegon, batik Cirebon, dan PT. Pertamina Cilacap. Media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba pendegradasi nitril adalah media mineral (Meyer & Schlegel, 1983) dan ditambahkan 1 ml mikroelemen (Pfennig, 1974). Sampel limbah sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 ml tertutup yang berisi 50 ml media mineral steril yang mengandung asetonitril 30 mM. Selanjutnya kultur digojok selama 7 hari pada suhu 28°C. Kultur yang berhasil tumbuh selanjutnya dipindahkan ke media *Nutrient Broth* (NB) padat untuk dilihat keragaman koloninya. Koloni yang berbeda dibiakkan secara terpisah pada media NB padat. Tiap-tiap koloni dimurnikan sehingga diperoleh koloni tunggal. Selanjutnya koloni tunggal yang diperoleh diuji pertumbuhannya selama 7 hari pada suhu 28°C dalam berbagai senyawa nitril. Senyawa nitril yang digunakan ialah asetonitril (Merck), benzonitril (Junsei Chemical), adiponitril (Aldrich), laktonitril (Aldrich), serta β-amino propionitril (Sigma), masing-masing pada konsentrasi 30 mM. Penentuan mikroba terpilih berdasarkan intensitas warna kuning yang terbentuk setelah kultur diuji dengan menggunakan pereaksi Nessler. Semakin pekat intensitasnya menandakan tingginya konsentrasi amonium sebagai hasil degradasi. Sebagai pembandingan digunakan *Corynebacterium* sp. D5 (Sunarko, 1998) yang telah diketahui mampu tumbuh di beberapa senyawa nitril tersebut.

Mikroba yang akan diuji adalah isolat yang positif mampu mendegradasi nitril. Mikroba diinokulasikan dalam media mineral yang mengandung senyawa nitril yang berbeda (asetonitril, benzonitril, adiponitril, laktonitril, serta β-amino propionitril), masing-masing pada konsentrasi 30 mM. Pengamatan pertumbuhan mikroba (berat sel kering) dan penentuan konsentrasi amonium dengan menggunakan pereaksi Nessler dilakukan setelah kultur digojok selama 7 hari pada suhu 28°C.

Kondisi optimum pertumbuhan mikroba (berat sel kering) diketahui melalui uji pengaruh konsentrasi substrat. Mikroba terpilih ditumbuhkan dalam media mineral yang mengandung berbagai konsentrasi asetonitril (120, 240, 360, 480, 600, dan 720 mM), benzonitril (10, 20, 30, 40 dan 50 mM), 3-sianopiridin (0, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 mM), serta β-aminopropionitril (40, 60, 80, 100, 120, dan 140 mM). Pengamatan pertumbuhan mikroba (berat sel kering) dan penentuan konsentrasi amonium dengan menggunakan pereaksi Nessler dilakukan setelah kultur digojok selama 7 hari pada suhu 28°C.

Sebanyak 5 ml kultur hasil fermentasi pada OD₄₃₆ = 0,1-1,0 diambil sebagai contoh untuk penentuan berat sel kering. Setelah disaring dengan menggunakan filter millipore (Ø=0,45 μm), biomassa yang diperoleh dikeringkan dalam inkubator pada suhu 60°C (Precisa 310 M) hingga beratnya stabil. Berat sel kering ditentukan dengan membuat kurva kalibrasi, hingga diketahui 0,4 mg berat sel kering/ml ekuivalen dengan OD₄₃₆ = 1,0.

Produksi sel mikroba terpilih dilakukan dalam fermentor yang berisi 1 l media pertumbuhan steril (media mineral + asetonitril 360 mM) pada suhu 28°C. Sel diperoleh dengan sentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Sel yang diperoleh dicuci dua kali dengan bufer fosfat 0,1M pH 7,2.

Sel mikroba terpilih sebanyak 25 mg yang telah dipanen dari berbagai media pertumbuhan (media mineral+asetonitril 50 mM; media mineral+benzonitril 50 mM; media mineral+3-sianopiridin 50 mM; media mineral+β-aminopropionitril 50 mM; media mineral+glukosa+NH₄Cl; dan media NB), diuji kemampuan degradasinya terhadap asetonitril 50 mM pada suhu 28°C selama 180 menit. Setiap 30 menit, amonium yang terbentuk sebagai hasil degradasi dianalisis dengan menggunakan pereaksi Nessler.

Pengaruh pH bufer terhadap aktivitas enzim pendegradasi asetonitril ditentukan dengan menambahkan 25 mg sel mikroba terpilih ke dalam bufer dengan kisaran pH 6,4-8,4 yang telah mengandung asetonitril 50 mM. Bufer yang digunakan ialah bufer fosfat 0,1M dengan kisaran pH 6,0-8,0, selain itu digunakan juga bufer Tris-HCl 0,1M untuk kisaran pH 6,8-8,0. Amonium yang terbentuk sebagai hasil degradasi ditentukan dengan menggunakan pereaksi Nessler setelah inkubasi selama 180 menit pada suhu 28°C.

Suhu optimum degradasi asetonitril ditentukan dengan cara menambahkan 25 mg sel mikroba terpilih ke dalam bufer fosfat 0,1M yang mengandung asetonitril 50 mM. Amonium yang terbentuk sebagai hasil degradasi ditentukan dengan menggunakan pereaksi Nessler setelah inkubasi selama 180 menit pada kisaran suhu 10-60°C.

Aktivitas enzim pendegradasi nitril sel mikroba terpilih ditentukan dengan mengukur konsentrasi amonium yang terbentuk sebagai hasil degradasi asetonitril 50 mM. Konsentrasi amonium ditentukan secara kolorimetris dengan menggunakan metode Nessler. Supernatan sampel dengan volume 0,1 ml ditambahkan ke dalam 9,9 ml 0,1 N NaOH. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 0,2 ml pereaksi Nessler, dihomogenkan, dan diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya campuran diukur pada panjang gelombang 400 nm. Konsentrasi amonium dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai satu mikromol amonium yang terbentuk sebagai hasil degradasi satu gram sel setiap menit.

Hasil dan Pembahasan

Upaya memperoleh mikroba pendegradasi nitril diawali dengan mengisolasi mikroba dari limbah industri yang diduga tercemar oleh senyawa nitril. Hasil isolasi terlihat pada Tabel 1. Dari 46 isolat yang diperoleh, 12 isolat mampu memanfaatkan asetonitril, 18 isolat memanfaatkan benzonitril, 8 isolat pada adiponitril, 1 isolat pada laktonitril, dan 1 isolat pada β-aminopropionitril. Kemampuan isolat-isolat tersebut dalam mendegradasi senyawa nitril diketahui melalui terbentuknya amonium sebagai hasil degradasi. Hasil reaksi amonium dengan pereaksi Nessler menghasilkan senyawa kompleks (Hg₂NH₂) berwarna kuning. Intensitas warna yang semakin tajam mengindikasikan semakin banyak pula amonium yang terbentuk. Untuk tahap selanjutnya dipilih isolat GLB5, karena mampu tumbuh pada beberapa senyawa nitril yang diujikan.

Isolat GLB5 mampu tumbuh baik dalam substrat nitril alifatik jenuh yang berbobot molekul rendah seperti asetonitril, dan juga dalam nitril aromatik yang berbobot molekul tinggi seperti benzonitril, kecuali dalam 3-sianopiridin (gambar 2). Vaughn *et al.* (1998) dalam penelitiannya juga melaporkan bahwa 3-sianopiridin bersifat bakteriostatik terhadap *Nocardia rhodochrous* LL100-21, sehingga pertumbuhannya tidak terlalu tinggi bila dibandingkan dalam asetonitril. Sedangkan pada senyawa dinitril seperti adiponitril dan laktonitril, bakteri ini tidak mampu tumbuh.

Isolat GLB5 mampu tumbuh pada asetonitril hingga konsentrasi 720 mM, dengan pertumbuhan terbaiknya pada asetonitril 360 mM (gambar 3A). *Pseudomonas marginalis* dilaporkan mampu tumbuh pada asetonitril hingga konsentrasi 244 mM (Babu *et al.*, 1995), *Rhodococcus erythropolis* A10 mampu tumbuh hingga konsentrasi 366 mM (Acharya & Desai, 1997), *Candida famata* (Linardi *et al.*, 1996) dan *R. erythropolis* BL1

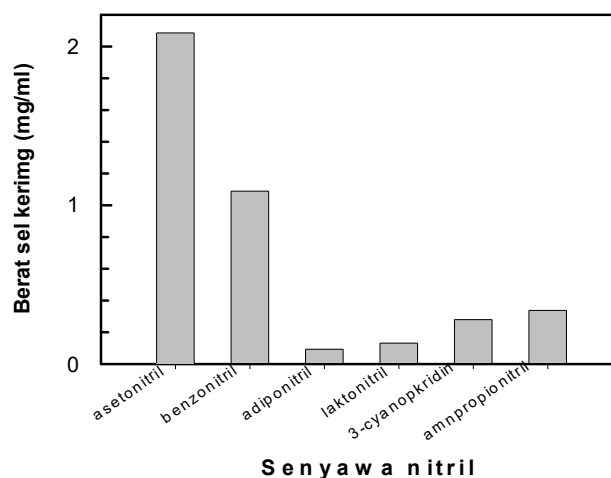
(Langdahl *et al.*, 1996) mampu tumbuh hingga 710 mM. Hal ini menunjukkan bahwa isolat GLB5 lebih toleran dalam asetonitril dibandingkan keempat isolat tersebut.

Pertumbuhan isolat GLB5 dalam berbagai konsentrasi benzonitril menunjukkan bahwa bakteri ini mampu tumbuh hingga konsentrasi 50 mM, dengan pertumbuhan terbaiknya pada konsentrasi 30 mM (gambar 3B). Hasil ini lebih baik dibandingkan laporan Sulistinah *et al.* (2002), yang menyatakan bahwa *Flavobacterium* sp. NUB1 mampu tumbuh hingga konsentrasi benzonitril 30 mM dengan pertumbuhan terbaiknya pada 15 mM. Selain itu, isolat GLB5 mampu tumbuh pada 3-sianopiridin hingga konsentrasi 15 mM, dengan pertumbuhan terbaiknya pada konsentrasi 10 mM (gambar 3C). Hal ini menunjukkan bahwa isolat ini toleransinya rendah terhadap 3-sianopiridin. Hal ini mengingatkannya bahwa senyawa tersebut bersifat bakteriostatik (Vaughn *et al.*, 1998). Pada senyawa β -aminopropionitril, isolat GLB5 mampu tumbuh hingga konsentrasi 140 mM, dengan pertumbuhan terbaiknya pada 100 mM (gambar 3D).

Isolat GLB5 mampu tumbuh dalam asetonitril 360 mM dengan melalui fase lag selama 8 jam, dan fase eksponensial selama 40 jam (gambar 4). Berdasarkan pertumbuhan tersebut, dapat ditentukan waktu penggandaan bakteri ini selama 7 jam 42 menit dan laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar $0,09 \text{ h}^{-1}$. Setelah 48 jam, pertumbuhan mencapai maksimal dan kemudian memasuki fase stasioner. Selama pertumbuhan, terlihat juga adanya penambahan konsentrasi amonium. Hal ini menandakan terjadinya degradasi asetonitril oleh isolat GLB5.

Aktivitas enzim pendegradasi nitril sel isolat GLB5 yang ditumbuhkan dalam lima media pertumbuhan dapat dilihat pada gambar 5. Aktivitas enzim pendegradasi nitril hanya ditunjukkan oleh sel isolat GLB5 yang ditumbuhkan dalam media mineral yang mengandung senyawa-senyawa nitril yang diujikan (asetonitril, benzonitril, 3-sianopiridin, dan β -aminopropionitril). Hal ini menunjukkan bahwa enzim pendegradasi nitril dari sel isolat GLB5 bersifat induktif. Beberapa enzim pendegradasi nitril dari *Brevibacterium* R312 (Moreau *et al.*, 1993) dan *R. rhodochrous* N.C.I.B 11216 (Bengis-Garber & Gutman, 1989) juga bersifat induktif.

Aktivitas maksimal enzim pendegradasi nitril dari sel isolat GLB5 ditunjukkan pada pH 7,2, baik dengan menggunakan bufer fosfat 0,1 M maupun bufer Tris-HCl 0,1 M (gambar 6A). Walaupun demikian, pada kisaran pH 6,4 hingga 8,4 aktivitasnya masih di atas 85% dari aktivitas maksimalnya. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Kobayashi *et al.* (1996). Laporan lain memaparkan bahwa enzim nitril hidratase dan amidase dari sel *P. marginalis* dan *R. erythropolis* A10 menunjukkan aktivitas maksimalnya pada pH netral (Babu *et al.*, 1995; Acharya & Desai, 1997). Dari hasil ini diketahui bahwa enzim pendegradasi nitril bekerja secara optimum pada pH 7,2.

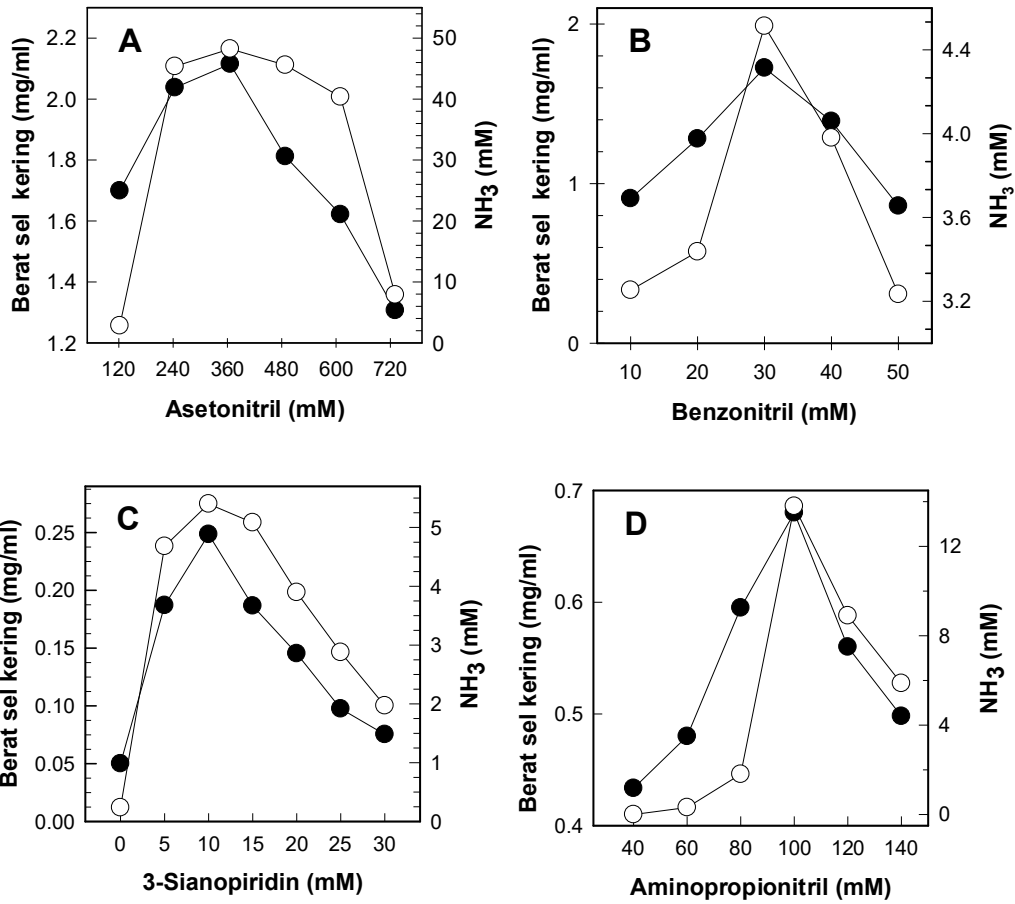


Gambar 2. Pertumbuhan isolat GLB5 pada berbagai senyawa nitril
Figure 2. The growth of GLB5 isolate at various nitriles compound

Tabel 1. Hasil uji Nessler pada isolat mikrob dalam beberapa senyawa nitril
 Table 1. Result of Nessler test on microbes in a few nitriles compound

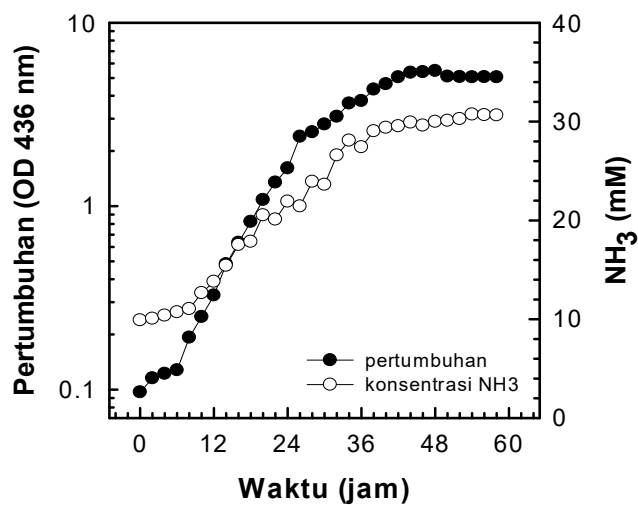
No	Isolat	Uji Nessler					
		asetonitril	benzonitril	adiponit ril	laktonitril	β -amino propionitril	3-sianopiridin
Limbah PT. Krakatau Steell-Cilegon							
1.	KSLA1	++	++	-	-	-	-
2.	KSLA2	++	+	-	-	-	-
3.	KSLA3	+++	-	++	-	-	-
4.	KSLA4	-	+	-	-	-	-
5.	KSLA5	+	+	-	-	-	-
6.	KSLB1	+++	+	++	-	-	-
7.	KSLB2	-	+	-	-	-	-
8.	KSLB3	++	++	-	-	-	-
9.	KSLB4	-	++	-	-	-	-
10.	KSKA1	-	++	-	-	-	-
11.	KSKA2	-	++	-	-	-	-
12.	KSJA1	-	++	-	-	-	-
13.	KSJA2	-	++	-	-	-	-
14.	KSJA3	+	-	++	-	-	-
15.	KSKB1	-	+++	-	-	-	-
16.	KSJB1	-	++++	++	-	-	-
17.	KSJB2	-	++++	++	-	-	-
18.	KSAB1	-	++++	+	-	-	-
19.	KSAB2	+++	++++	++	-	-	-
Limbah Batik-Cirebon							
20.	PLB1	-	-	-	-	-	-
21.	PLB2	-	-	-	-	-	-
22.	PLB3	+	-	-	-	-	-
23.	PLB4	-	-	-	-	-	-
24.	PLB5	-	-	-	-	-	-
25.	PLB6	-	-	-	-	-	-
26.	PLB7	-	-	-	-	-	-
27.	GLB1	-	-	-	-	-	-
28.	GLB2	+	-	-	-	-	-
29.	GLB3	-	-	-	-	-	-
30.	GLB4	-	-	-	-	-	-
31.	GLB5	+++++	+++	+	+	+++	+
32.	PPB	-	-	-	-	-	-
33.	GPB	+	-	-	-	-	-
Limbah PT. Pertamina-Cilacap							
34.	C1AD2	-	-	-	-	-	-
35.	C1B3	-	-	-	-	-	-
36.	C1AD1	-	-	-	-	-	-
37.	C1B1	-	-	-	-	-	-
38.	C1B22	-	-	-	-	-	-
39.	T1B2	-	-	-	-	-	-
40.	C2B2	-	-	-	-	-	-
41.	T1AD2	-	-	-	-	-	-
42.	C2AD1	-	-	-	-	-	-
43.	T2B2	-	-	-	-	-	-
44.	C2AD3	-	-	-	-	-	-
45.	T2AD1	-	-	-	-	-	-
46.	C1B21	-	-	-	-	-	-
47.	<i>Corynebacterium</i> D5	+++	-	-	+	+	+

(+) = mampu mendegradi nitril, bertambahnya + menunjukkan intensitas warna kuning semakin pekat, (-) = tidak mampu mendegradi nitril

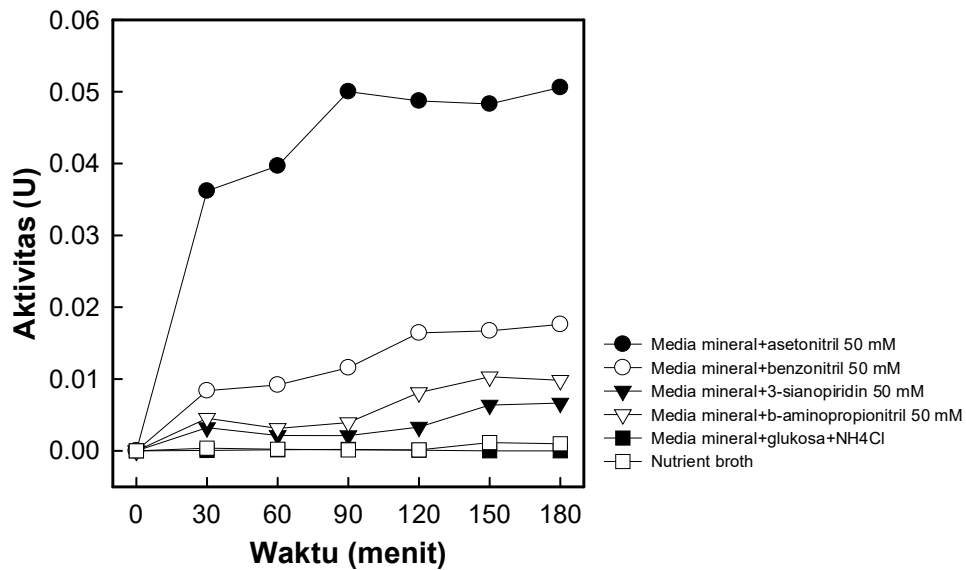


Gambar 3. Pertumbuhan isolat GLB5 pada berbagai konsentrasi (A) asetonitril, (B) benzonitril, (C) 3-sianopiridin, dan (D) aminopropionitril setelah 7 hari inkubasi pada suhu 28°C. (●) berat sel kering, (○) konsentrasi NH₃

Figure 3. The growth of GLB5 isolate at various concentration (A) acetonitrile, (B) benzonitrile, (C) 3-sianopiridin, and (D) aminopropionitril, after 7 days incubation at temperature 28°C. (●) dry cell weight, (○) NH₃ concentration

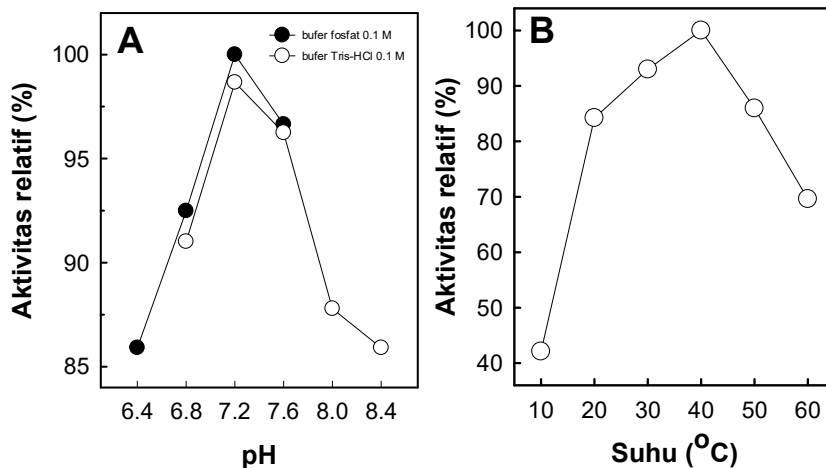


Gambar 4. Pertumbuhan isolat GLB5 dalam asetonitril 360 mM
Figure 4. The growth of GLB5 isolate at acetonitrile 360 mM



Gambar 5. Aktivitas enzim pendegradasi asetonitril 50 mM oleh sel isolat GLB5 yang ditumbuhkan pada beberapa media
 Figure 5. The activity of acetonitrile 50 mM degradation enzymes by GLB5 whole cells on some growth medium

Gambar 6B menunjukkan bahwa aktivitas enzim pendegradasi nitril dapat diamati pada kisaran suhu 10-60°C, dengan aktivitas maksimal pada suhu 40°C. Pada suhu 20 dan 50°C aktivitasnya masih cukup tinggi sekitar 84,2 dan 85% dari aktivitas maksimalnya, sedangkan pada suhu dibawah 20°C dan di atas 50°C aktivitasnya menurun drastis. Dengan demikian suhu tampaknya berpengaruh terhadap aktivitas enzim pendegradasi nitril dari sel isolat GLB5. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa aktivitas maksimal aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase dari sel *Rhodococcus erythropolis* A10 dan *Pseudomonas marginalis* masing-masing pada 30 dan 37°C (Acharya and Desai, 1997; Babu *et al.* 1995).



Gambar 6. Pengaruh (A) pH, dan (B) suhu terhadap aktivitas enzim pendegradasi nitril dari sel isolat GLB5
 Figure 6. Influence of (A) pH, and (B) temperatures on the activity of acetonitrile degradation enzymes from GLB5 whole cells

Kesimpulan

Hasil isolasi mikrob dari berbagai sumber limbah diperoleh 46 isolat, 12 isolat mampu memanfaatkan asetonitril, 18 isolat memanfaatkan benzonitril, 8 isolat pada adiponitril, 1 isolat pada laktonitril, dan 1 isolat pada β -aminopropionitril. Dari 46 isolat tersebut dipilih isolat GLB5, karena mampu tumbuh pada beberapa senyawa nitril yang diujikan. Pertumbuhan optimum isolat GLB5 pada beberapa senyawa nitril ialah asetonitril 360 mM, benzonitril 30 mM, 3-sianopiridin 15 mM, dan β -aminopropionitril 140 mM. Dalam pertumbuhannya, isolat ini mengalami fase lag selama 8 jam, fase eksponensial selama 40 jam, dengan waktu penggandaan sel selama 7 jam 42 menit serta laju pertumbuhan spesifik (μ) sebesar $0,09 \text{ h}^{-1}$. Enzim pendegradasi nitril dari sel isolat GLB5 merupakan enzim induktif, dengan pH serta suhu optimum sebesar 7,2 dan 40°C .

Daftar Pustaka

- Acharya, A. and Desai, A.J. 1997. Studies on utilization of acetonitrile by *Rhodococcus erythropolis* A10. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13:175-178.
- Babu, G.R.V., Wolfram, J.H., Marian, J.M. and Chapatwala, K.D. 1995. *Pseudomonas marginalis* its degradative capability on organic nitriles and amides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:739-745.
- Bengis-Garber, C., and Gutman, A.L. 1989. Selective hydrolysis of dinitriles into cyano-carboxylic acids by *Rhodococcus rhodochrous* N.C.I.B. 11216. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:11-16.
- Bhalla, T.C., A. Miura, A. Wakamoto, Y. Ohba, and K. Furahashi. 1999. Asymmetric hydrolysis of α -aminonitriles to optically active amino acids by nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* Pa-34. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:184-190.
- Chapatwala, K.D., Babu, G.R.V., Armstead, E.R., White, E.M. and Wolfram, J.H. 1995. A kinetic study on the bioremediation of sodium cyanide and acetonitril by free and immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 717-726.
- Jallageas, J.C., A. Arnaud, and P. Galzy. 1980. Bioconversions of nitriles and their applications. *Adv. Biochem. Eng.* 14:1-32.
- Kobayashi, H. and S, Shimizu. 2000. Nitrile Hydrolases. *J. Chem Biology.* 4 : 95-102.
- Kobayashi, M. B, Fujita and I, Turner Jr. 1996. Hyperinduction of nitrile hydratase activity indole 3-acetonitrile in *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Microbio. Biotechnol.* 45, 176-181.
- Langdahl, B.R., Bisp, P., and Ingvorsen, K. 1996. Nitrile hydrolysis by *Rhodococcus erythropolis* BL1, an acetonitrile-tolerant strain isolated from a marine sediment. *Microbiology.* 142:145-154.
- Linardi, V.R., Dias, J.C.T. and Rosa, C.A. 1996. Utilization of acetonitrile and other aliphatic nitriles by *Candida famata* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 144:7-71.
- Macadam, A.M., and C.J. Knowles. 1985. The stereospecific bioconversion of α -aminopropionitrile to L-alanine by an immobilized bacterium isolated from soil. *Biotech. Lett.* 7:865-870.

- Meyer, O. and H.G. Schlegel. 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 227-310.
- Moreau, J.L, S. Azza, A. Arnauld, and P. Glazy. 1993. Purification and characterization of an adipamidase from a mutant strain of *Brevibacterium* sp. involved in dinitrile degradation. *Biosci Biotech Biochem* 57:294-296.
- Nagasawa, T., H. Shimizu and H.Yamada. 1993. The superiority of the third generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 : 189-195
- Pfennig N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch Microbiol.* 100 : 197-206.
- Sulistinah, N, B. Sunarko, and A. Thontowi. 2002. Metabolisme benzonitril oleh *Flavobacterium* sp. NUB1. *Jurnal Biologi Indonesia.* 3(3):219-226.
- Sunarko, B. 1998. Degradasi asetonitril dengan sel imobil *Corynebacterium* UBT 9. *J. Biol. Indonesia.* 2:73-82.
- Vaughn, P.A., Cheetham, P.S.J. and Knowles, C.J. 1998. The utilization of pyridine carbonitriles and carboxamides by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *J. Gen. Microbiol.* 134:1099-1107.
- Watanabe, I., Y. Satho, and K. endomoto. 1987. Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity. *Agric. Biol. Chem.* 51:3193-3199.
- Yamamoto, K. Ueno Y. Otsubo K. Yamane H. Komatsu KI. and Tani Y. 1992. Efficient conversion of dinitrile to mononitrile-monocarboxylic acid by *Corynebacterium* sp. C5 cells during tranexamic acid synthesis. *J of Fer and Bioeng.* 73(2):125-129.