

PENGURANGAN KONSENTRASI HIDROLISAT KASEIN PADA MEDIA  
KOMPLEKS UNTUK MENURUNKAN AKTIVITAS PROTEASE *Bacillus megaterium*  
B131 SEBAGAI UPAYA MENINGKATKAN PRODUKSI PENISILIN G ASILASE

MUHARNI

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRACT

*The activity of Bacillus megaterium protease could hydrolize penicillin G acylase and caused penicillin G acylase activity not stable. The aim of the research was increased penicillin G acylase activity by reduction of casein hydrolisate concentration in complex media. The reduction of casein hydrolisate can decrease protease activity. The result of the research showed that reduction casein hydrolisate concentration in complex media could decrease B. megaterium growth and protease activity. The activity of penicillin G acylase could be increased at 2,9 g/L casein hydrolysate concentration.*

*Key words : Casein hydrolisate, Penicillin G Acylase, Protease*

ABSTRAK

*Aktivitas protease di dalam kultur Bacillus megaterium dapat menghidrolisis penisilin G asilase yang dihasilkan, sehingga menyebabkan aktivitas penisilin G asilase sering tidak stabil. Berdasarkan hal tersebut pada penelitian ini dilakukan pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks, untuk meningkatkan kestabilan aktivitas penisilin G asilase. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks dapat menurunkan pertumbuhan sel dan aktivitas protease. Konsentrasi hidrolisat kasein 2,9 g/L dapat meningkatkan kestabilan aktivitas penisilin G asilase.*

*Kata kunci : Hidrolisat kasein, Penisilin G asilase, Protease*

PENDAHULUAN

Dewasa ini kebutuhan akan antibiotik semakin meningkat seiring dengan berkembangnya berbagai jenis penyakit akibat infeksi mikroba. Penggunaan antibiotik yang tidak rasional telah

menimbulkan dampak yang serius yaitu adanya gejala resistensi dari beberapa mikroorganisme tertentu terhadap antibiotik. Untuk mengatasi masalah resistensi ini, telah dilakukan usaha mencari pengganti penisilin alami yaitu dengan membuat antibiotik semisintetik turunan penisilin. Penisilin

semisintetik ini tidak hanya memberikan sifat yang lebih baik dari penisilin alami tetapi juga dapat mengatasi masalah resistensi mikroba terhadap antibiotik. Disamping itu antibiotik semisintetik umumnya lebih stabil, lebih mudah diabsorpsi dan lebih sedikit efek sampingnya dibandingkan dengan antibiotik alami (Valle et al., 1991).

Penisilin G asilase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolitik benzilpenisilin dengan menghasilkan produk berupa asam 6-amino penisilinat (6-APA) dan asam fenilasetat (Verhaert *et al.*, 1997). Enzim ini menjadi sangat penting karena 6-APA yang dihasilkan dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan antibiotik semisintetik.

Penisilin G asilase umumnya dihasilkan oleh mikroorganisme dari golongan bakteri, antara lain *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* dan *Alcaligenes* sp. Produk enzim yang dihasilkan dapat bersifat intraseluler atau ekstraseluler, tergantung pada bakteri yang menghasilkannya. Pada *E. coli* penisilin G asilase diketahui bersifat intraseluler sedangkan pada *Bacillus megaterium* enzim ini bersifat ekstraseluler (Vandamme, 1988). Dengan demikian memproduksi Penisilin G asilase dari genus

*Bacillus* akan lebih menguntungkan karena enzimnya langsung dikeluarkan ke media kultur, akan tetapi enzim penisilin G asilase ekstraseluler ini mempunyai kestabilan yang rendah bila dibandingkan dengan penisilin G asilase intraseluler. Enzim ekstraseluler begitu dibebaskan dari dalam sel tidak dikendalikan lagi oleh sel dan langsung dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu, pH dan enzim ekstrasel lainnya seperti enzim protease.

Enzim protease disekresikan keluar oleh sel bakteri untuk menghidrolisis nutrisi yang terdapat pada medium untuk pertumbuhannya (Priest, 1985). Aktivitas enzim protease ekstraseluler di dalam medium akan menyebabkan terjadinya penguraian enzim ekstraseluler lainnya seperti enzim penisilin G asilase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Untuk itu pada beberapa kasus enzim protease diinaktivasi untuk mengisolasi protein ekstraseluler lain yang dihasilkan oleh bakteri yang sama (Doi dan McGloughlin, 1992).

Mengingat pentingnya peranan penisilin G asilase dalam pembuatan penisilin semisintetik, maka berbagai usaha akan dilakukan untuk meningkatkan produktivitas dan aktivitas penisilin G asilase, diantaranya

adalah menurunkan aktivitas protease diharapkan dapat meningkatkan aktivitas penisilin G asilase. Metode yang bisa digunakan untuk mengurangi atau menghilangkan aktivitas protease diantaranya mengatur media pertumbuhan dan faktor lingkungan yang menghambat produksi dan aktivitas protease, menggunakan zat kimia yang menghambat aktivitas protease seperti EDTA (*etylen diamine tetraacetic acid*), PMSF (*phenylmethylsulfonyl flouride*), CaCl<sub>2</sub> (kalsium klorida) dan proses mutasi yang langsung merusak gen penghasil protease sehingga menjadi tidak aktif (Doi dan McGloughlin, 1992). Dari beberapa metode tersebut pengaturan medium pertumbuhan merupakan metode yang relatif banyak digunakan untuk menginaktivasi enzim protease. Penambahan zat kimia lain ke dalam medium seperti penambahan EDTA, disamping mengganggu pertumbuhan sel juga menghambat aktivitas enzim penisilin G asilase yang dihasilkan (Muharni, 2001).

Media kompleks merupakan media yang sering digunakan untuk memproduksi enzim penisilin G asilase, media kompleks menggunakan 3,4 g/L kasein hidrolisat sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhan mikroba. Kasein hidrolisat disamping sebagai sumber

nitrogen juga sebagai substrat untuk aktivitas enzim protease. Untuk itu pada penelitian ini dilakukan pengurangan konsentrasi kasein hidrolisat pada media kompleks sehingga diharapkan aktivitas enzim protease dapat menurun. Dengan menggunakan beberapa konsentrasi kasein hidrolisat pada media kompleks dapat diketahui konsentrasi kasein hidrolisat yang dapat menurunkan aktivitas enzim protease dan meningkatkan kestabilan aktivitas penisilin G asilase dari *Bacillus megaterium*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi hidrolisat kasein dalam menurunkan aktivitas enzim protease dan meningkatkan aktivitas serta kestabilan enzim penisilin G asilase.

## METODE PENELITIAN

### 1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan dari bulan Juni – Oktober 2004 di laboratorium Genetika dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIFA Universitas Sriwijaya.

### 2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah biakan *Bacillus megaterium* B131 yang diperoleh dari laboratorium Teknik Lingkungan ITB, medium nutrisi agar (NA), medium

kompleks {Hidrolisat kasein 3,4 g, Natrium sulfat anhidrat 0,0145 g, Kalium dihidrogen fosfat 12,75 g, Dinatrium hydrogen fosfat 2,4 g, Glukosa 0,7 g, Mineral bebas sulfur 10 ml ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  376,5 mg,  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  275,5 mg,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  72,5 mg,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  8,5 mg,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  6 mg,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  4 mg,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  3 mg, dan  $ZnCl_2$  )}, asam fenil asetat, penisilin G asilase, kasein, asam trikloro asetat (TCA), tirosin, bufer fosfat, pentanadion, etanol 95%, EDTA, akuades dan reagen Ehrlich.

Alat-alat yang dipakai adalah spektrofotometer, pH meter, inkubator, shaker, autoklaf, vortek, jarum ose, mikropipet, cawan petri, erlemeyer, sentrifugasi dan tabung reaksi.

### 3 Cara Kerja

#### 3.1 Perbanyak kultur bakteri

Perbanyak biakan bakteri dilakukan pada medium nutrisi agar (NA) dengan menggunakan jarum ose. Biakan disimpan didalam inkubator pada suhu  $30^{\circ}C$  selama 24 jam.

#### 3.2 Tahap Aktivasi

Dimasukkan satu koloni tunggal biakan *B. megaterium* B131 kedalam erlemeyer yang mengandung 50 ml media

kompleks. Diaktivasi selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}C$  dengan kecepatan 150 rpm. Pada hari kedua diambil 10 ml inokulum yang telah diaktivasi dimasukkan kedalam erlemeyer yang mengandung 40 ml media kompleks, diaktivasi lagi selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}C$  dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya pada hari ketiga, semua inokulum yang telah diaktivasi pada hari kedua dimasukkan kedalam erlemeyer yang mengandung 250 ml media kompleks, diaktivasi selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}C$  dengan kecepatan 150 rpm.

#### 3.3.3 Produksi Enzim

Disediakan 5 buah erlemeyer yang masing-masing mengandung 450 ml media kompleks dengan konsentrasi kasein hidrolisat sesuai dengan perlakuan yaitu : 3,4 g/L (kontrol), 2,9 g/L, 2,4 g/L, 1,9 g/L dan 1,4 g/L. Setiap tabung dimasukkan 50 ml inokulum yang telah diaktivasi. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $30^{\circ}C$  dengan kecepatan 150 rpm. Pengambilan sampel dimulai pada jam ke 2, setiap 2 jam sampai jam ke 24.

#### 3.4 Isolasi ekstrak kasar enzim protease dan enzim penisilin G asilase

Isolasi enzim dilakukan dengan mengambil 1 ml kultur cair setiap 2 jam

sekali sampai jam ke 24. Supernatan dipisahkan dari endapan melalui sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan adalah merupakan ekstrak kasar enzim protease dan enzim penisilin G asilase.

### 3.5 Uji Aktivitas Enzim Protease

Pengujian aktivitas enzim protease dilakukan dengan metode Kunitz, 1971 dalam Creighton, 1990. Sebanyak 1,5 ml substrat kasein 1 % dan 0,3 ml bufer Tris HCl 0,005 M pH dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup. Campuran diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 5 menit di dalam penangas air, kemudian ditambahkan 0,2 ml larutan ekstrak kasar enzim protease dan inkubasi dilanjutkan selama 15 menit. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan asam trikloro asetat (TCA) 10 % sebanyak 3 ml. Campuran dikocok dengan menggunakan vortex dan disimpan dalam es selama 30 menit. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan dipisahkan dari endapan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm menggunakan spektrofotometer UV. Pengujian kontrol dilakukan seperti prosedur diatas, kecuali TCA ditambahkan lebih dahulu setelah

ekstrak kasar protease dan bufer direaksikan, terakhir ditambahkan substrat.

Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan material yang larut dalam campuran TCA, yang ekuivalen dengan 1 µmol tirosin dari larutan 1 % kasein per menit pada pH 8 suhu 37 °C.

Pengukuran jumlah tirosin menggunakan koefisien ekstinsi molar dengan rumus :

$$c = A v / b \epsilon$$

A = Absorbansi 280 nm

$\epsilon$  = Koefisien ekstinsi molar, untuk tirosin nilainya adalah  $\pm 1000$  l/mol. Cm.

b = diameter kuvet

c = Jumlah tirosin (mol)

v = volume total reaktan

### 3.6 Uji Aktivitas Enzim Penisilin G asilase secara Kuantitatif

Uji aktivitas enzim penisilin G asilase dilakukan dengan menggunakan metode Kornfeld (1978), sebanyak 100 µl larutan enzim ditambahkan 400 µl larutan substrat (150 mg penisillin G + 10 ml bufer fosfat 0,5 M pH 8) dan diinkubasikan pada suhu 45°C selama 20 menit. Selanjutnya hasil reaksi enzim dan substrat ditambahkan dengan 2,6

ml bufer fosfat 0,5 M pH 6,8 dan 0,1 ml pentanadion kemudian dikocok dengan vortex , reaksi dihentikan dengan pemanasan pada air mendidih selama 20 menit, kemudian ditambahkan 1,5 ml reagen Ehrlich (PDAB 4 g, etanol 95% 380 ml dan HCl 80 ml). Sebagai kontrol adalah larutan enzim dan substrat tanpa inkubasi dan serapan dari larutan ini diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 538 nm. Untuk standar digunakan larutan 6-APA yang dibuat pada konsentrasi 0,021 , 0,043 , 0,064 , 0,086 , 0,108 , 0,129 , 0,151 , 0,173 dan 0,194 mg/ml. Setiap konsentrasi 6-APA dilakukan pengukuran aktivitas enzim penisilin G asilase.

#### 2.4 Pengamatan

- **Pertumbuhan sel**

Jumlah sel dihitung dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

- **Aktivitas enzim protease**

Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan material yang larut dalam campuran TCA, yang ekuivalen dengan 1umol tirosin dari larutan 1% kasein per menit pada pH 8 suhu 37°C.

- **Aktivitas enzim penisilin G**

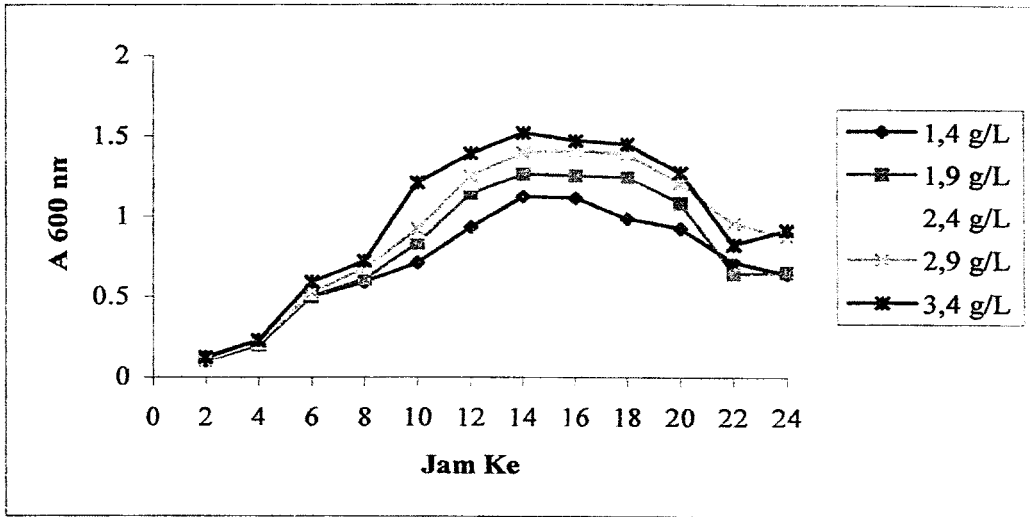
Satu unit aktivitas enzim penisilin G asilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 umol 6-APA per menit dari larutan 15 mg/ml benzilpenisilin dalam bufer fosfat 0,5 M pH 8 pada suhu 45°C.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasar pengukuran yang telah dilakukan terhadap pertumbuhan sel, aktivitas enzim protease dan aktivitas enzim penisilin G asilase didapatkan hasil seperti yang tertera di bawah ini :

#### 1 Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein terhadap pertumbuhan sel

Hasil pengukuran kekeruhan kultur cair *B. megaterium* B131 setiap selang waktu 2 jam, digunakan untuk mengetahui pertumbuhan sel selama proses fermentasi pada masing-masing perlakuan dengan pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks. Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks terhadap pertumbuhan sel dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein terhadap pertumbuhan sel *B. megaterium* B131

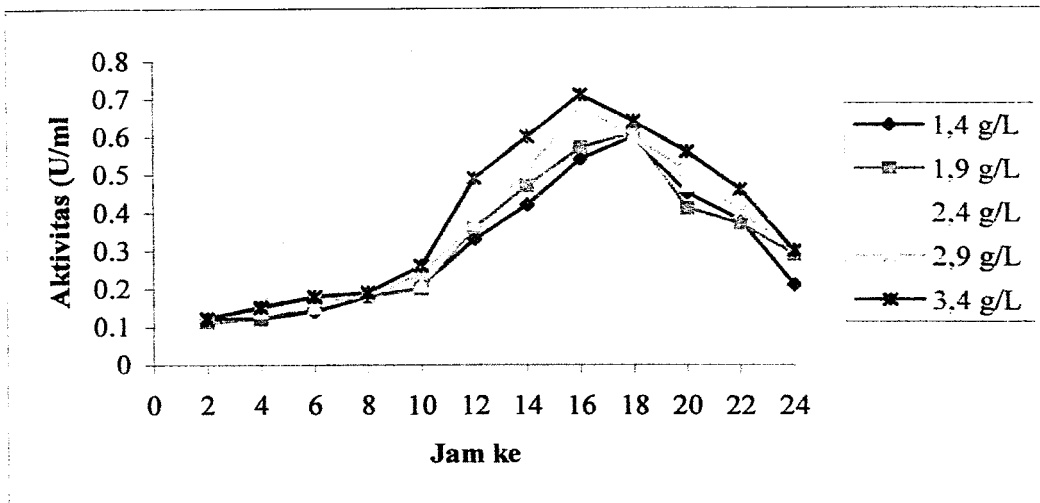
Pada gambar di atas dapat dilihat bahwa pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks dapat mempengaruhi pertumbuhan sel selama proses fermentasi, dimana semakin tinggi pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks semakin besar penurunan jumlah sel bakteri. Hal ini mungkin disebabkan karena kasein merupakan sumber N yang dibutuhkan selama proses fermentasi berlangsung. Seperti yang telah dinyatakan Fardiaz (1988), hidrolisat kasein merupakan sumber nitrogen organik yang sangat dibutuhkan mikroba selama proses fermentasi.

Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein sangat jelas sekali terlihat pada fase logaritmik yaitu mulai dari jam ke 6 sampai jam ke 14, dimana pada fase ini mikroba membutuhkan energi yang lebih banyak dari fase-fase yang lainnya. Oleh sebab itu kekurangan nutrisi pada medianya akan mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri, dimana pada fase ini mikroba paling sensitif terhadap keadaan lingkungan. Fardiaz (1988) menyatakan, pada fase logaritmik mikroba membelah dengan cepat dan konstan, dimana pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya, diantaranya adalah kandungan nutrisi.

Pada fase adaptasi yaitu jam ke 2 dan fase pertumbuhan awal mulai jam ke 2 sampai jam ke 6, pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata. Hal ini mungkin disebabkan mikroba mulai membelah dengan kecepatan yang rendah karena baru mulai menyesuaikan diri, oleh sebab itu kekurangan nutrisi pada media belum terlalu berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan sel.

## 2. Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein terhadap aktivitas protease

Hasil pengujian aktivitas enzim protease secara kuantitatif pada beberapa perlakuan pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3.2. Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein terhadap aktivitas protease

Berdasarkan gambar di atas dapat dilihat bahwa pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks berpengaruh pada aktivitas protease dari *B. megaterium* B131, dimana semakin besar pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein

aktivitas protease semakin berkurang. Hal ini dapat dilihat pada gambar mulai dari jam ke 12 sampai jam ke 16 aktivitas protease masing-masing perlakuan memperlihatkan perbedaan. Berbedanya aktivitas protease pada masing-masing perlakuan diatas



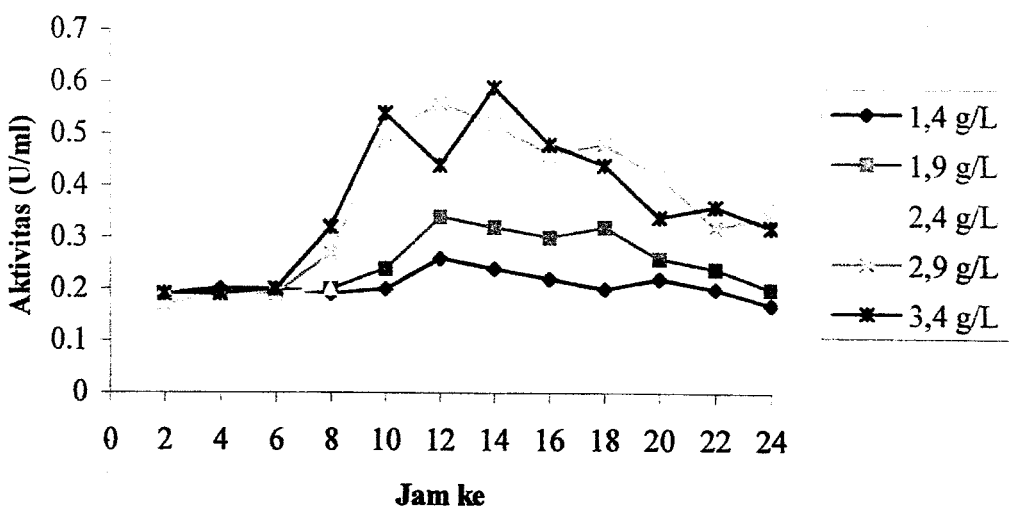
disebabkan oleh berbedanya konsentrasi hidrolisat kasein pada masing-masing media yang digunakan, karena kasein merupakan substrat untuk aktivitas enzim protease. Sebagaimana yang telah dinyatakan Rachman (1989), Aktivitas enzim protease ekstraseluler sangat tergantung kepada ketersediaan substrat pada medium pertumbuhan, bila substrat (protein) tersedia dalam jumlah yang cukup tinggi maka aktivitas protease akan meningkat, dan apabila substratnya berkurang maka aktivitas enzim protease juga akan menurun.

Aktivitas enzim protease mulai dari jam ke 2 sampai jam ke 10 pada masing-

masing perlakuan tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata. Hal ini mungkin disebabkan pada saat itu pertumbuhan yang sedang berlangsung adalah fase adaptasi, dan fase pertumbuhan awal, pada saat ini pertumbuhan sel belum terlalu cepat sehingga nutrisi yang tersedia masih cukup untuk pertumbuhannya.

### 3. Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein terhadap aktivitas Penisilin G Asilase

Pengujian aktivitas enzim penisilin G asilase secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode Kornfeld (1978). Hasil pengukuran tersebut dapat dilihat pada gambar 3.3 di bawah ini.



Gambar 3.3 Pengaruh pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein terhadap aktivitas penisilin G asilase

Pada gambar di atas dapat dilihat bahwa aktivitas penisilin G asilase pada masing-masing perlakuan berbeda-beda, dimana semakin besar pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein semakin rendah aktivitas penisilin G asilasnya. Namun pada perlakuan tanpa pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein 3,4 g/L (kontrol), aktivitas penisilin G asilase cukup tinggi tetapi tidak stabil. Berkurangnya aktivitas penisilin G asilase pada masing-masing perlakuan dengan pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein, disebabkan karena berkurangnya nutrisi (protein) pada media sehingga menyebabkan pertumbuhan sel juga berkurang yang akan berpengaruh pada produksi enzim dari mikroba tersebut.

Aktivitas penisilin G asilase pada perlakuan tanpa pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein terlihat tidak stabil yaitu mulai dari jam ke 10 sampai jam ke 16, hal ini disebabkan pada saat ini aktivitas protease cukup tinggi sehingga terjadi degradasi oleh enzim protease. Protease adalah enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida dari suatu protein sehingga terurai menjadi unit peptida yang lebih kecil, hidrolisis sempurna protein akan menghasilkan asam amino (Rao

*et. al.*, 1998). Aktivitas protease ekstraseluler di dalam medium akan menyebabkan terjadinya penguraian enzim ekstraseluler lainnya yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Untuk itu pada beberapa kasus enzim protease diinaktivasi untuk mengisolasi protein ekstraseluler lain yang dihasilkan oleh bakteri yang sama (Doi dan McGloughlin, 1992)

Aktivitas penisilin G asilase pada jam ke 2, ke 4 dan ke 6 pada masing-masing perlakuan relatif sama, ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi hidrolisat kasein pada saat itu belum berpengaruh karena pertumbuhan sel baru pada fase adaptasi dan fase pertumbuhan awal, sehingga produksi enzimnya juga masih sedikit. Enzim penisilin G asilase umumnya diproduksi selama fase logaritmik dan fase stasioner pada pertumbuhan sel.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dapat diambil kesimpulan kesimpulan sebagai berikut :

- Pengurangan konsentrasi hidrolisat kasein pada media kompleks dapat menurunkan pertumbuhan sel,

aktivitas enzim protease dan aktivitas enzim penisilin G asilase dari *B megaterium* B131.

- Konsentrasi hidrolisat kasein 2,9 g/L dapat menurunkan aktivitas enzim protease dan meningkatkan aktivitas enzim penisilin G asilase.
- Aktivitas enzim penisilin G asilase mempunyai kestabilan yang tinggi pada konsentrasi hidrolisat kasein 2,9 g/L.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Creighton, T.E. 1990. *Protein Function a Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press. London
- Doi, R.H. and McGloughlin, M. 1992. *Biology of Bacilli Applications to Industry*. Butter Worth-Heinemann. USA.
- Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. PAU dan Lembaga Sumberdaya Informasi IPB. Bogor.
- Kornfeld, J.M. 1978. *A New Colorimetric Method for Determination of 6-Aminopenicillanic Acid*. Analytical Biochemistry. **86** : 118 – 126.
- Muharni, 2001. Penggunaan EDTA Untuk Menurunkan Aktivitas Protease *Bacillus megaterium* Sebagai Upaya Meningkatkan Aktivitas Penisilin G Asilase. Laporan Penelitian. PPD HEDS dan FMIPA UNSRI.
- Priest, F.G., 1985. *Aspect of Microbiology Extracellular Enzymes*. Van Nostrand Reinhold (UK) Co. LTD. England.
- Rachman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Depdikbud. Dikti PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Rao, M.B., Aparna, M.T., Mohini,S.G., and Vasanti, V.D., 1998. *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 597 – 635.
- Valle, F., Balbas, P., Merino, E., and Bolivar, F. 1991. *The Role of Penicillin Amidases in Nature and in Industry*. TIBS. **16** : 36 – 40.
- Vandamme, E.J. 1988. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Marcel Dekker Inc. USA.
- Verhaert, R.M.D., Riemens, A.M., Laan, J.M., Duin, J. and Quax, W.J. 1997. *Molecular Cloning and Analysis of the Gene Encoding the Thermostable Penicillin G Acylase from *Alcaligenes faecalis**. Applied and Environmental Microbiology. **63** : 3412 – 3412