

**Produksi dan Karakterisasi Enzim β -Endoxilanase dari Bakteri
Sistem Intestinal Rayap
(Production and Characterization of Enzyme β -Endoxylanase from Bacteria of
Termite-intestinal System)**

A. A. Istri Ratnadewi¹⁾, Wuryanti Handayani¹⁾, dan Ni Nyoman Tri Puspaningsih²⁾
¹⁾ Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember
²⁾ Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga

ABSTRACT

A mesophile bacteria isolated from intestinal systems of local-soil termite, produced an extracellular β -endoxylanase upon growth on xylan. Optimum production of the enzyme was found in media containing oat-spelt xylan at 37°C after sixth hours. The activities of its β -endoxylanase on oat-spelt xylan was investigated. It had an optimum pH and temperature, 5.0 and 40°C, respectively. However, pH stability occurred between 5.0-8.0. The enzyme was stable at 40°C for four hours and possessed a half life of four hours. β -endoxylanase had an apparent molecular mass of 45.000 to 66.200 Dalton as determined by SDS-PAGE. Analysis of zymogram using SDS-Xylan-PAGE indicated that enzymes could degrade oat-spelt xylan as substrates.

Keywords : intestinal-system bacteria, production, characterization, β -endoxylanase

PENDAHULUAN

Enzim β -endoxilanase (1,4- β -D-xilanxilanolhidrolase, EC. 3.2.1.8) termasuk klasifikasi enzim xilanolitik. Pada umumnya enzim ini dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri dan fungi, namun beberapa diantaranya dapat dihasilkan oleh tumbuhan dan hewan (Subramanian and Prema, 2002). Aktivitas enzim β -endoxilanase terletak pada kemampuannya mendepolimerisasi xilan melalui hidrolisis kerangka utamanya secara acak. Proses depolimerisasi tersebut dilakukan secara sinergi dengan enzim xilanolitik yang lain seperti β -xilidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glukuronidase, asetil-xilan esterase, ferulil dan p-koumaroil esterase (Beg *et al.*, 2001). Enzim β -endoxilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa atau xilooligosakarida.

Enzim xilanase yang berasal dari mikroba telah diklasifikasikan ke dalam dua famili utama berdasarkan berdasarkan karakteristik fisiko-kimianya (titik isoelektrik dan massa molekul relatif) kelompok endoxilanase dengan nilai *pI* yang lebih rendah namun memiliki berat molekul relatif tinggi diklasifikasikan ke dalam famili GH10 atau famili F, sedangkan kelompok endoxilanase dengan nilai *pI* yang lebih tinggi namun memiliki berat molekul relatif rendah disebut famili GH11 atau famili G. Kedua famili tersebut memiliki perbedaan sifat katalitik dimana famili GH10 akan

menyerang ikatan glikosida disebelah percabangan dan mengarah pada ujung nonpereduksi menggunakan dua residu xilopiranosil non-substitusi antara cabang-cabang. Lain halnya dengan famili GH11 yang menggunakan tiga residu xilopiranosil non-substitusi. (Collins *et al.*, 2005).

Pada umumnya enzim β -endoxilanase merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000-30.000 Da, aktif pada temperatur 55°C dengan pH 9,0 (Yang *et al.*, 1988 ; Yu *et al.*, 1991). Pada temperatur 60°C dan pH normal, enzim β -endoxilanase lebih stabil (Tsujiho *et al.*, 1992). Xilanase dari bakteri termofilik seperti *Thermonospora fusca*, *Bacillus sp* dan *Bacillus stearothermophilus* memperlihatkan temperatur optimum dalam kisaran 65 hingga 80°C. Xilanase-A yang dihasilkan oleh anaerob termofilik *Clostridium stercorarium* mempunyai temperatur optimum 70°C dan waktu paruh pada temperatur 80°C selama 90 menit, sedangkan xilanase dari *Thermotoga sp* yang mempunyai temperatur optimum pada 105°C pada pH 5,5 memiliki waktu paruh 90 menit pada temperatur 95°C. Xilanase dari *Dictyoglomus sp* mempunyai waktu paruh 80 menit pada temperatur 90°C (Kulkarni *et al.*, 1999).

METODE

Penyiapan Medium Kultur

Medium untuk produksi xilanase merupakan medium yang mengandung tripton 5 g.L⁻¹,

ekstrak khamir 1,5 g.L⁻¹, dekstrosa 1 g.L⁻¹, agar 15 g.L⁻¹, NaCl 0,5 %, *oat-spelt xylan*.

Produksi Enzim β -Endoxilanas

Produksi enzim awalnya dilakukan dengan menetapkan kondisi pertumbuhan melalui observasi menggunakan kurva pertumbuhan. Prosedur pembuatan kurva pertumbuhan ini dilakukan secara aseptis. Pengukuran OD (*optical density*) dilakukan sebanyak 1 ml setiap selang waktu 2 jam selama 24 jam. Sampling pertama dilakukan pada jam ke-2 dilanjutkan hingga nilai OD menunjukkan penurunan yang jelas. OD diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 600 nm.

Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat positif xilanolitik yang diperoleh maka diketahui waktu yang dicapai isolat untuk mencapai fase *log* (eksponensial). Waktu tersebut kemudian digunakan untuk memproduksi enzim. Produksi enzim dilakukan pada temperatur 37°C dengan penggoyangan 170 rpm. Supernatan yang dihasilkan kemudian digunakan sebagai ekstrak kasar enzim (*crude extracts enzyme*).

Penentuan Aktivitas Enzim β -Endoxilanas

Sebanyak 0,5 ml larutan enzim ditambahkan pada 0,5 ml suspensi substrat *oat-spelt xylan* 0,5% (b/v) dalam buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) dan diinkubasi pada 80°C selama 30 menit. Sebanyak 3,0 ml larutan asam 3,5-dinitrosalisilat kemudian ditambahkan pada larutan enzim-substrat. Campuran dididihkan dalam air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dengan cepat dalam air es selama 20 menit. Warna yang timbul dibaca absorbansinya pada λ 550 nm. Satu unit β -endoxilanas (XU) didefinisikan sebagai aktivitasnya untuk melepaskan satu μ mol xilosa selama satu menit.

Penentuan Kadar Protein Enzim β -Endoxilanas

Kadar protein ditentukan menggunakan metode Bradford (1976) secara spektrofotometri pada panjang gelombang λ 595 nm. Standar yang digunakan adalah larutan *bovine serum albumin* (BSA).

Karakterisasi Enzim β -Endoxilanas

Larutan enzim β -endoxilanas hasil dialisis dikarakterisasi meliputi pH optimum, temperatur optimum, stabilitas pH, serta

termostabilitasnya. Pengaruh temperatur diamati setelah mengkondisikan campuran reaksi pada temperatur 0-100°C (rentang 10°C). Aktivitas tertinggi merupakan temperatur optimum. Termostabilitas ditentukan menggunakan temperatur optimum hingga waktu (jam) yang masih menunjukkan kestabilan enzim.

Pengaruh pH diamati setelah mengkondisikan campuran reaksi menggunakan buffer sitrat-fosfat 0,1 M (pH 3,0-7,0), Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0-9,0), dan glisin-NaOH 0,1 M (pH 9,0-10,0). Campuran ditentukan aktivitasnya dan kondisi pH dengan aktivitas tertinggi merupakan pH optimum. Stabilitas pH ditentukan berdasarkan prosentase aktivitas relatif yang tersisa.

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE untuk mengetahui kandungan enzim setelah produksi *crude extracts* dan pemurnian. Preparasi gel atas (*stacking gel*) dan bawah (*resolving gel*) serta *running* elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat dilakukan menurut metode Bio-Rad (Bio-Rad, tanpa tahun).

Analisis Zimogram

Analisis zimogram dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE untuk mengestimasi berat molekul enzim β -endoxilanas dari isolat mikroba sistem intestinal rayap. Preparasi gel atas (*stacking gel*) dan *running* zimogram dilakukan bersamaan dengan SDS-PAGE menurut metode Bio-Rad (Bio-Rad, tanpa tahun). Preparasi gel bawah (*resolving gel*) dilakukan dengan menambahkan substrat *oat-spelt xylan*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim β -Endoxilanas Hasil Produksi

Cairan intestinal rayap sebagai sumber enzim xilanolitik diperoleh melalui penggerusan intestinal rayap dalam larutan garam fisiologis. Hasil pengamatan menunjukkan terdapatnya 96 koloni yang mampu tumbuh dalam media yang mengandung *oat spelt xylan*. Dari 96 isolat bakteri tersebut hanya terdapat 35 isolat bakteri yang terpisah dengan baik. Pengujian visualitatif dengan larutan congo red menunjukkan bahwa dari 35 isolat tersebut hanya lima isolat yang menunjukkan zona terang (halo) disekeliling koloni. Zona terang

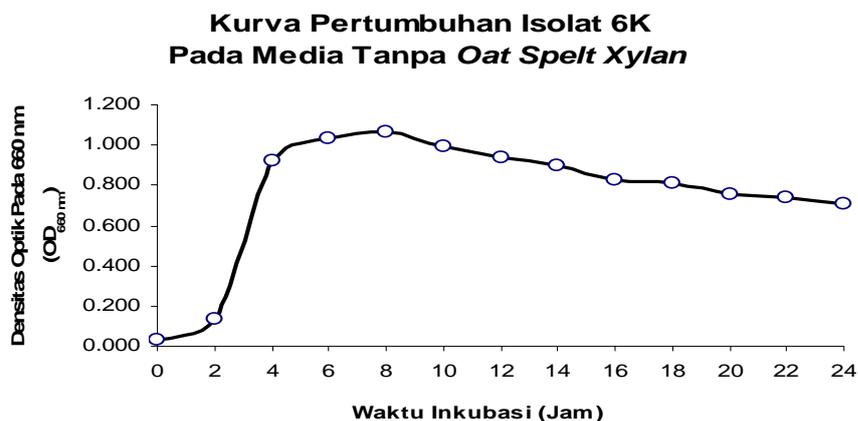
(halo) tersebut menunjukkan kemampuan hidrolisis *oat spelt xylan* dalam *plate* Luria-Bertani oleh enzim xilanolitik.

Aktivitas xilanolitik untuk satu isolat positif (6K) bakteri sistem intestinal rayap mencapai 3,25 Unit. Hal ini menjadikan isolat 6K sebagai sumber enzim xilanolitik yang digunakan.

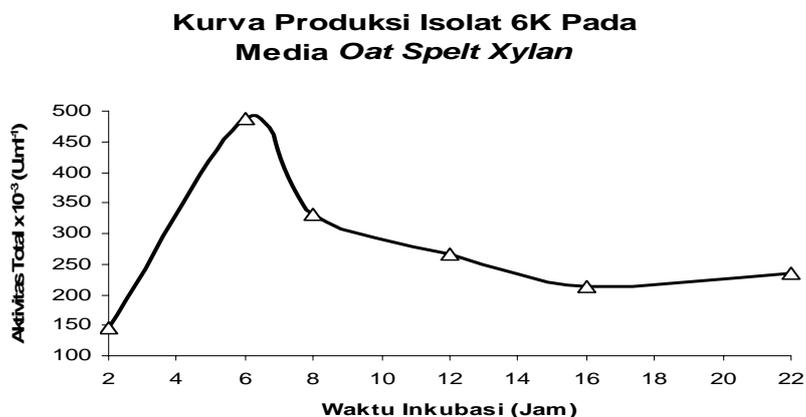
Pada penelitian selanjutnya dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan yang bertujuan untuk mengetahui pola pertumbuhan isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap. Pada penelitian ini, pembuatan kurva pertumbuhan isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap dilakukan selama 24 jam dengan membagi 13 titik pengamatan, seperti yang tampak pada Gambar 1.

Pertumbuhan isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap selama 24 jam pada media

tanpa *oat-spelt xylan* tidak menunjukkan adanya fase *lag* (fase adaptasi). Pertumbuhan isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap menunjukkan adanya fase *log* yang langsung tercapai setelah dua jam pertama *sampling* hingga jam keenam. Pada fase *log* (eksponensial) ini terjadi peningkatan jumlah sel karena nutrisi dalam medium masih banyak sehingga sel membelah dengan cepat dan konstan. Fase stasioner tercapai setelah jam ke-6 hingga jam ke-12. Berdasarkan pola pertumbuhan tersebut diketahui bahwa pada fase *log* menghasilkan produksi sesuai pola pada Gambar 2. Kondisi produksi dari isolat 6K yang menunjukkan fase *log* pada jam keenam selanjutnya digunakan pada produksi berikutnya.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat 6K pada media yang tidak mengandung *oat-spelt xylan*



Gambar 2. Kurva produksi isolat 6K pada media yang mengandung *oat-spelt xylan*

Produksi enzim xilanolitik dilakukan dari isolat 6K yang memberikan kondisi halo terluas. Pada penelitian ini, eksistensi enzim β -endoxilanase dari isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap diuji menggunakan substrat *oat-spelt xylan*. Aktivitas enzim β -endoxilanase diketahui berdasarkan penentuan kadar xilosa sebagai produk hidrolisis akhir xilan sekaligus sebagai standar. Isolat yang dipilih ternyata menunjukkan hasil positif terhadap enzim β -endoxilanase. Tabel 1. menunjukkan data isolasi ekstrak kasar enzim.

Aktivitas Enzim β -Endoxilanase Pada Berbagai Temperatur dan Termostabilitasnya

Temperatur merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi, kelarutan dan stabilitas suatu enzim (Deutscher, 1990; Whitaker, 1994). Kondisi temperatur inkubasi dalam penentuan aktivitas enzim β -

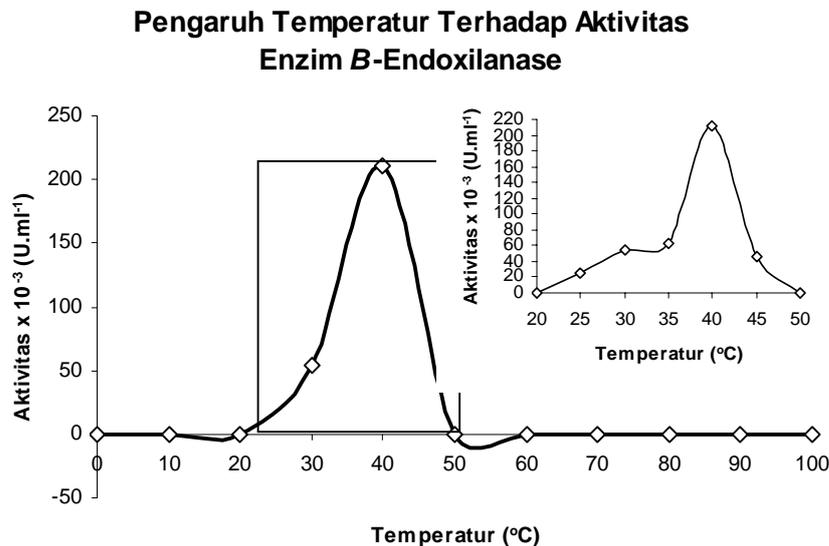
endoxilanase isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap ditentukan antara 0 hingga 100°C.

Hasil penentuan aktivitas pada berbagai temperatur menunjukkan bahwa perubahan temperatur inkubasi dapat mempengaruhi aktivitas enzim β -endoxilanase isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap secara *in vitro*. Profil aktivitas menunjukkan bahwa kenaikan temperatur dari 0 hingga 40°C akan menyebabkan peningkatan aktivitas enzim β -endoxilanase isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap. Aktivitas enzim β -endoxilanase cenderung mengalami penurunan pada kondisi temperatur diatas 40°C. Hal ini diduga karena tingkat kerusakan enzim β -endoxilanase lebih tinggi daripada aktivitas katalitiknya. Aktivitas enzim β -endoxilanase isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap dalam medium yang mengandung *oat-spelt xylan* pada berbagai temperatur ditunjukkan pada Gambar 3.

Tabel 1. Aktivitas dan Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim β -Endoxilanase

Enzim	V (ml)	A (Unit.ml ⁻¹)	A. T. (Unit)	P (mg.ml ⁻¹)	P.T. (mg)	A. S. (Unit.mg ⁻¹)
Ekstrak kasar	100,0	0,048	4,78	0,074	7,37	0,65

Vol., A., A.T., P., PT., A.S. masing-masing adalah volume, aktivitas, aktivitas total, kadar protein, protein total, dan aktivitas spesifik



Gambar 3. Profil aktivitas enzim β -endoxilanase isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap pada berbagai temperatur

Kondisi temperatur berkaitan erat dengan faktor-faktor yang mempengaruhi mekanisme kerja suatu enzim, yaitu energi aktivasi dan stabilitas enzim. Berdasarkan Gambar 3, pada temperatur antara 0 hingga kurang dari 40°C (temperatur rendah) enzim β -endoxilanas belum memiliki energi aktivasi yang memadai untuk memulai reaksi hidrolisis *oat-spelt xylan*, sehingga hidrolisis tersebut tidak dapat berlangsung dengan sempurna yang ditandai dengan aktivitas enzim β -endoxilanas yang rendah. Pada kondisi temperatur optimum 40°C enzim β -endoxilanas telah memiliki energi yang cukup untuk memulai reaksi hidrolisis sehingga reaksi dapat berlangsung dengan sempurna. Dengan kata lain energi yang diperoleh enzim β -endoxilanas sama dengan energi aktivasi yang dibutuhkan untuk menghidrolisis *oat-spelt xylan*.

Kondisi temperatur yang lebih tinggi yaitu lebih dari 40 hingga 45°C (diatas temperatur optimum) dapat menyebabkan ketidakstabilan enzim β -endoxilanas. Hal ini berkaitan erat dengan kelarutan dan perubahan konformasi enzim β -endoxilanas dalam larutan. Walaupun demikian, berdasarkan profil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada temperatur antara 50 hingga 100°C telah terjadi denaturasi enzimatik.

Berbeda dengan reaksi kimiawi pada umumnya, pada reaksi enzim dikenal istilah temperatur optimum. Berdasarkan Gambar 6 dapat pula diketahui bahwa enzim β -endoxilanas memiliki aktivitas maksimum pada temperatur inkubasi 40°C yang juga merupakan temperatur optimum enzim β -endoxilanas rayap. Profil aktivitas enzim β -endoxilanas pada berbagai temperatur tersebut memperlihatkan bahwa perubahan aktivitas dibawah atau diatas temperatur optimum bersifat tidak simetris.

Stabilitas termal enzim merupakan indeks sensitif stabilitas struktur kuarternernya. Stabilitas enzim β -endoxilanas ditentukan pada temperatur optimumnya yaitu 40°C selama 10 jam masa inkubasi. Aktivitas relatif enzim β -endoxilanas menurun sebesar 25,90 dan 46,00% masing-masing pada waktu inkubasi 2 dan 4 jam. Enzim β -endoxilanas hampir tidak aktif pada waktu inkubasi 6, 8, dan 10 jam yang menunjukkan aktivitas residu masing-masing sebesar 14,44, 11,93, dan 0,63%. Enzim β -endoxilanas diperkirakan tidak aktif sama sekali pada waktu inkubasi lebih dari 10 jam. Termostabilitas enzim β -

endoxilanas ditunjukkan pada Tabel 2. berikut.

Tabel 2. Termostabilitas Enzim β -Endoxilanas Pada 40°C

Waktu Inkubasi (Jam)	Aktivitas Residu (%)
0	100,00
2	74,21
4	54,09
6	14,47
8	11,95
10	0,63

Pada penelitian yang telah dilakukan, kondisi temperatur antara 25 hingga 45°C belum menyebabkan denaturasi pada enzim β -endoxilanas. Keadaan ini menunjukkan bahwa enzim β -endoxilanas masih memiliki stabilitas enzim hingga terjadinya denaturasi pada temperatur yang lebih tinggi. Faulet *et al.* (2006) melaporkan bahwa pada temperatur 37 dan 50°C akan menyebabkan stabilitas enzim β -endoxilanas rayap *Macrotermes subhyalinus* Rambur hingga lebih dari 6 jam dan pada 60°C hanya selama 30 menit.

Aktivitas dan Stabilitas Enzim β -Endoxilanas Pada Berbagai pH

Derajat keasaman atau pH merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas dan stabilitas enzim (Whitaker, 1994). Kondisi pH dalam pengujian aktivitas enzim β -endoxilanas ditentukan antara pH 3,0 hingga 10,0 dengan interval 1,0 satuan pH berdasarkan aktivitas minimum pada keadaan asam dan basa. Gambar 4 menunjukkan bahwa perubahan pH medium dapat mempengaruhi aktivitas enzim β -endoxilanas secara in vitro. Peningkatan pH dimulai dari 3,0 hingga pH 5,0 menyebabkan aktivitas enzim β -endoxilanas juga meningkat dan selanjutnya mengalami penurunan aktivitas pada pH diatas 5,0. Aktivitas enzim β -endoxilanas dalam medium buffer untuk berbagai pH ditunjukkan pada Gambar 4.

Kondisi pH 5,0 merupakan pH optimum dimana aktivitas enzim β -endoxilanas sebesar 100%. pH optimum ini merupakan salah satu karakteristik enzim β -endoxilanas yaitu jumlah ion-ion pada pH tersebut membuat

konformasi enzim β -endoxilanase tepat berpasangan dengan konformasi substratnya.

Pada penelitian ini diketahui pula bahwa enzim β -endoxilanase stabil pada pH reaksi antara 5,0 dan 8,0. Aktivitas relatif enzim β -endoxilanase sebesar 83,8 dan 67,6% masing-masing untuk nilai pH 6,0 dan 7,0, serta mencapai 100% untuk nilai pH 5,0. Aktivitas relatif enzim β -endoxilanase tinggal 51,4% bila reaksi terjadi pada pH 8,0 dan apabila nilai pH dinaikkan lebih ekstrim hingga diatas 8,0 dapat dikatakan bahwa enzim β -endoxilanase tidak akan memiliki aktivitas lagi. Faulet *et al.* (2006) telah melaporkan bahwa pada pH optimum rayap *Macrotermes subhyalinus* Rambur berkisar 5,0-5,6, dengan stabilitas antara 4,6 hingga 5,6. Tabel 3 dan Gambar 5 berikut menunjukkan stabilitas enzim β -endoxilanase pada berbagai pH dengan waktu inkubasi selama 60 menit.

Elektroforegram dan Zimogram Enzim β -Endoxilanase

Elektroforesis dilakukan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul akibat pengaruh filtrasi gel. Pada penelitian ini metode yang digunakan adalah SDS-PAGE diskontinyu dimana digunakan *resolving gel* 12,5% dan *stacking gel* 8%. Analisis zimogram dilakukan untuk membuktikan eksistensi enzim β -endoxilanase. Pada penelitian ini pembuktian dilakukan menggunakan teknik SDS-PAGE dengan penambahan substrat *oat-spelt xylan*.

Gambar 5 menunjukkan pita zimogram enzim β -endoxilanase, pita-pita elektroforesis dan zimogram protein enzim β -endoxilanase.

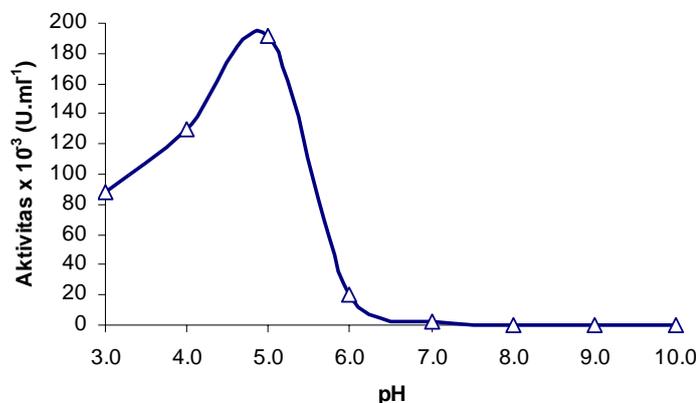
Tabel 3. Stabilitas pH Enzim β -Endoxilanase

pH	Aktivitas Residu (%)
4,0	0,0
5,0	100,0
6,0	83,8
7,0	67,6
8,0	51,4
9,0	0,0
10,0	0,0

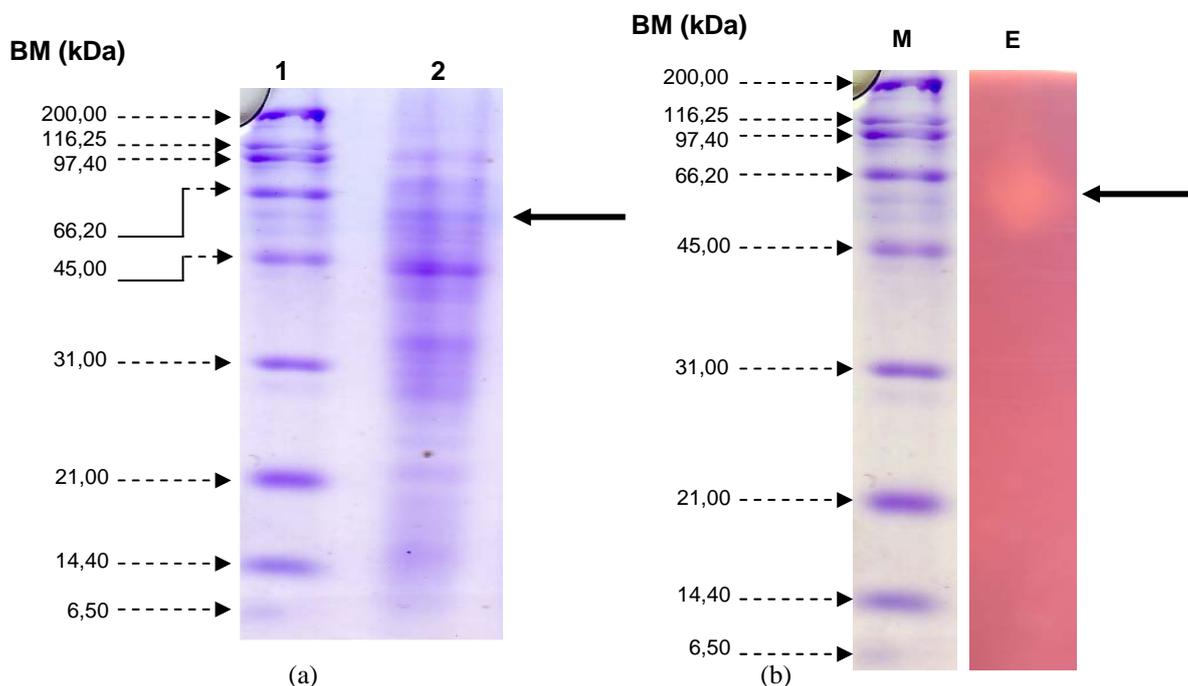
Hasil SDS-PAGE menunjukkan munculnya pita-pita protein β -endoxilanase pada kisaran berat molekul 45.000 – 66.200 Dalton. Keseluruhan data tersebut didukung pula oleh data zimogram yang menunjukkan pita protein enzim β -endoxilanase dengan kisaran berat molekul 45.000 – 66.200 Dalton.

Hasil analisis zimogram pada gambar tersebut menunjukkan adanya satu pita protein aktif yang mampu menghidrolisis *oat-spelt xylan*. Performa hasil analisis ini adalah terbentuknya zona terang pada media gel yang mengandung substrat enzim β -endoxilanase (*oat-spelt xylan*) setelah divisualisasi dengan larutan pewarna (congo-red) yang menunjukkan daerah terdegradasinya xilan. Protein aktif tersebut tampak diantara kisaran berat molekul 45.000–66.200 Dalton.

Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim β -Endoxilanase



Gambar 4. Profil aktivitas enzim β -endoxilanase isolat 6K bakteri sistem intestinal rayap pada berbagai pH



Gambar 5. Elektroforetogram (a) dan zimogram (b) protein enzim β -endoxilanase. Lajur 1 : marker. Lajur 2 : ekstrak kasar. M : marker. E : enzim β -endoxilanase

KESIMPULAN

Intestinal rayap memiliki sistem enzim xilanolitik yang dihasilkan dari lima isolat. Salah satu dari lima isolat tersebut yaitu isolat 6K memiliki aktivitas enzim xilanolitik sebesar 3,25 Unit. Enzim β -endoxilanase dari bakteri sistem intestinal rayap memiliki aktivitas spesifik mencapai 0,65 Unit.mg⁻¹ dan dicirikan dengan temperatur dan pH optimum masing-masing 40°C dan 5,0, serta stabil pada 40°C selama 4 jam pada pH 5,0. Protein enzim β -endoxilanase memiliki berat molekul berkisar 45.000 hingga 66.200 Dalton seperti yang telah ditentukan berdasarkan elektroforesis dan analisis zimogram.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada penyandang dana penelitian Hibah Pekerti Direktorat Pembinaan Penelitian Dan Pengabdian Pada Masyarakat (DP4M) Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, serta kepada seluruh Pihak di Universitas Jember dan Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Beg Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S. 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** : 326-338.
- Bio-Rad. Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell Instruction Manual BIO-RAD. Hercules, CA : Bio-Rad Laboratories, Inc.
- Bradford M. M. 1976. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Collins T., Gerday, C., and Feller, G. 2005. *FEMS-Microbiol. Revs.*, **29** : 3-23.
- Deutscher M. P. 1990. *Meth. Enzymol.*, **182** : 83-85.
- Faulet B. M., Niamké, S., Gonnety, J. T., and Louame, L. P. 2006. *Bull. Insect.* **LIX** :17-26.
- Kulkarni N., Shendye, A., and Rao, M. 1999. *FEMS-Microbiol. Revs.*, **23** : 411-456.
- Subramaniyan S., and Prema, P. 2002. *Crit. Revs. Biotechnol.*, **22** : 33-64.
- Tsujibo H., Miyomoto, K., Kuda, T., Minami, K., Sakamoto, T., Hasegawa, T., and Lanamori, Y. 1992. *Appl. Env. Microbiol.*, **58** : 371-375.
- Whitaker J. R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences (2nd ed.)*. New York : Marcel Dekker, Inc.

- Yang R. C. A., McKenzi, C. R., Bilous, D., Seligy, V. I., and Narang, S. S. 1988. *Appl. Env. Microbiol.*, **54** : 1023-1029.
- Yu J., Park, Y., Yum, D., Kim., J., Kong, I., and Bai, D. 1991. *Appl. Env. Microbiol.*, **3** : 139-145.