

PRODUKSI KITINASE DAN KITIN DEASETILASE DARI *Vibrio harveyi*

Suyuti Nasran, Farida Ariyani, dan Ninoek Indriati¹⁾

ABSTRAK

Penelitian untuk mengetahui potensi *Vibrio harveyi* sebagai penghasil kitinase dan kitin deasetilase telah dilakukan. Untuk mengetahui kondisi yang diperlukan untuk memproduksi enzim, telah dilakukan percobaan produksi enzim pada pH 6,7, dan 8 dengan 3 tingkatan suhu inkubasi yaitu suhu kamar (28-31°C), 37°C, dan 47°C selama 5 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Vibrio harveyi* dapat memproduksi enzim kitinase dan kitin deasetilase seperti ditunjukkan dari hasil uji daya kitinolitik, walaupun aktivitas enzim yang diperoleh masih rendah. Sama halnya dengan perkembangan jumlah bakteri selama masa produksi enzim, aktivitas enzim kitinase dipengaruhi oleh suhu inkubasi, tetapi tidak oleh pH media. Terdapat perbedaan aktivitas enzim pada inkubasi 37°C selama 5 hari yang mencapai rata-rata $10,82 \times 10^{-6}$ u/ml dibandingkan dengan pada suhu 47°C yang hanya mempunyai aktivitas sebesar $3,56 \times 10^{-6}$ u/ml. Sebaliknya, aktivitas enzim kitin deasetilase justru lebih dipengaruhi oleh pH media daripada suhu dan lama inkubasinya. Aktivitas kitin deasetilase rata-rata pada pH 6,7, dan 8 berturut-turut adalah $5,6 \times 10^{-5}$ u/ml; $3,8 \times 10^{-5}$ u/ml, dan $6,0 \times 10^{-5}$ u/ml.

ABSTRACT: *Production of chitinase and chitin deacetylase from Vibrio harveyi. By: Suyuti Nasran, Farida Ariyani and Ninoek Indriati*

Research aimed at finding the potentiality of *Vibrio harveyi* in producing chitinase as well as chitin deacetylase has been carried out. To find out the appropriate condition for producing the enzymes, an experiment on enzyme production was conducted using three levels of pH, i.e. 6, 7, and 8 and three kinds of incubation temperatures, i.e. ambient (28-31°C), 37°C, and 47°C for 5 days. Research result revealed that *Vibrio harveyi* could produce chitinase and chitin deacetylase, though the enzyme activities of both enzymes were still low. Similar to the changes of bacterial count during the production of the enzymes, the activity of chitinase was affected by incubation temperature, but was not by the pH of the growing media. There was a significant difference between the average enzyme activities, which was 10.82×10^{-6} u/ml at incubation temperature of 37°C, compared to only 3.56×10^{-6} u/ml at 47°C. On the contrary, the activity of chitin deacetylase was affected by pH, not by the temperature and time of incubation. The average activities at pH 6, 7, and 8 were 5.6×10^{-5} u/ml; 3.8×10^{-5} u/ml, and 6.0×10^{-5} u/ml respectively.

KEYWORDS: *chitinase, chitin deacetylase, Vibrio harveyi*

PENDAHULUAN

Kitinase dan kitin deasetilase adalah enzim yang aktif mengkatalisis degradasi kitin. Kitinase dapat menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidiknya, sedang kitin deasetilase menghidrolisis kitin menjadi produk yang mempunyai daya guna yang lebih tinggi seperti kitosan.

Proses konversi kitin secara kimiawi dapat dilakukan menggunakan larutan NaOH pada kadar dan suhu tinggi. Teknologinya relatif mudah, tetapi mutu kitosan yang dihasilkan dengan cara ini kurang seragam, meskipun telah dibantu dengan pengadukan (Saleh *et al.*, 1994). Hal ini lebih disebabkan karena hidrolisis secara kimiawi bersifat acak/tidak spesifik pada ikatan/gugus tertentu seperti hidrolisis oleh enzim.

Teknologi alternatif adalah menggunakan enzim kitinase dan kitin deasetilase. Kedua jenis enzim ini terdapat secara ekstraseluler dalam lapisan lendir lambung dan usus serta darah beberapa jenis ikan. Bakteri pembentuk kitinase dan kitobiase dalam saluran pencernaan ikan cod ternyata sangat mirip dengan *Vibrio campbellii* dan *Vibrio anguillarum* (Lindsay dan Gooday, 1985).

Banyak jenis mikroorganisme dapat memproduksi enzim pendegradasi kitin dan kitosan, baik bakteri seperti *Pseudomonas aeruginosa* (Wang dan Chang, 1997), *Streptococcus lydicus* (Crawford dan Mahadevan, 1997), *Bacillus circulans* (Alam *et al.*, 1996), *Bacillus megaterium* (Pelletier *et al.*, 1990), *Streptomyces* spp. (Boucher *et al.*, 1992), dan *Vibrio alginolyticus* (Ohishi *et al.*, 1996). Beberapa jenis jamur seperti *Aspergillus carneus* (Sherief *et al.*, 1991),

¹⁾ Peneliti pada Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan

Aspergillus nidulans (Alfonso *et al.*, 1995; Reves *et al.*, 1995), *Mucor rouxii* (Bouriotis *et al.*, 1993; Martinou *et al.*, 1995; Kafetzopoulos *et al.*, 1994) *Absidia coerulea* (Gao *et al.*, 1995), dan *Trichoderma reesei* juga menghasilkan enzim serupa (Morikawa *et al.*, 1998).

Beberapa strain *Vibrio harveyi* diketahui dapat menghasilkan enzim kitinase dan kitin deasetilase (Kirchman *et al.*, 1997). Kitinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme memberikan prospek yang lebih baik dibandingkan kitinase dari sumber lain karena kemudahannya dimanipulasi pada level molekuler (Alam *et al.*, 1996). Svitil *et al.*, (1997) telah membuktikan bahwa *V. harveyi* BB7 menghasilkan beberapa jenis kitinase dengan bobot molekul yang berbeda-beda, yang bervariasi dari 42-130 kDa, sesuai dengan jenis substrat sebagai sumber kitin. *Vibrio alginolyticus* H-8 menghasilkan dua jenis kitinase yaitu C1 dan C3 dengan bobot molekul masing-masing 81 dan 68 kDa (Ohishi *et al.*, 1996). *Bacillus circulans* WL-12 menghasilkan paling kurang 6 jenis kitinase yang berbeda-beda dalam aktivitas enzimnya (Alam *et al.*, 1996).

Beragamnya kemampuan bakteri menghasilkan berbagai jenis kitinase dan enzim pendegradasi kitin lainnya kemungkinan merupakan upaya penyesuaian terhadap beragamnya jenis, tipe, dan struktur kitin yang tersedia di alam.

Untuk mengetahui potensi *V. harveyi* uji sebagai penghasil kitinase dan kitin deasetilase, sekaligus untuk mendapatkan kondisi yang tepat untuk produksi, dilakukan percobaan produksi enzim pada pH, suhu, dan waktu produksi yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Kitin yang digunakan dalam percobaan ini adalah kitin rajungan buatan Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, sedangkan kultur murni *Vibrio harveyi* uji diperoleh dari Balai Besar Penelitian Budidaya Laut Gondol, Bali.

Pembuatan Koloidal Kitin (Sebagai Substrat dalam Pengukuran Aktivitas Kitinase)

Koloidal kitin dibuat dengan melarutkan 10 g kitin dalam 200 ml HCl pekat, kemudian didiamkan semalam pada suhu 4°C, dan disaring menggunakan *glass-wool*. Setelah ditambah 100 ml akuades dingin dan dinetralkan dengan NaOH 12 N (\pm 200 ml), larutan kemudian disentrifus dengan kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Setelah supernatan dibuang, endapan ditambah akuades dingin, dan diaduk untuk melarutkan sisa garam kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 8.000 rpm

selama 20 menit pada suhu 4°C (Arnold & Solomon, 1986).

Pembuatan Glikol Kitin (Sebagai Substrat dalam Pengukuran Aktivitas Kitin Deasetilase)

Glikol kitin dibuat dengan melarutkan 1 g glikol kitosan (Sigma) dalam 20 ml asam asetat 10%, kemudian dibiarkan selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah itu ditambahkan 100 ml metanol secara perlahan-lahan, kemudian disaring dengan kertas Whatman No.41 menggunakan pompa vakum. Filtrat yang diperoleh ditambah 1,5 ml asetat anhidrid sambil diaduk pelan-pelan, dan dibiarkan 10 menit pada suhu ruang. Pada saat terbentuk gel, ditambah 150 ml metanol dan dihomogenisasikan, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 7.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Endapan yang diperoleh ditambah dengan 100-150 ml metanol, kemudian dihomogenisasikan kembali sebelum disentrifus ulang dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Endapan ditambah dengan 100 ml 0,02% sodium azide dan dihomogenisasikan selama 4 menit. Larutan yang diperoleh merupakan glikol kitin 1% (b/v) (Trudel & Aselin, 1980).

Uji Daya Kitinolitik Kultur Bakteri

Kultur yang digunakan dalam percobaan diuji terlebih dahulu daya kitinolitiknya menggunakan media sebagai berikut (Rahayu, 2000, dimodifikasi):

Koloidal kitin 2%; K_2HPO_4 0,1%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%; NaCl 3%; Ammonium sulfat 0,7%; Yeast ekstrak 0,05%; Bakterial agar 2%.

Kultur bakteri *Vibrio harveyi* diinokulasikan dengan cara ditusukkan pada media padat dalam cawan petri, kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 48 jam. Perbandingan diameter zona bening di sekeliling koloni (halo) dengan diameter koloni merupakan indeks kitinolitik.

Optimasi Produksi Kitinase dan Kitin Deasetilase dari *Vibrio harveyi*

Media starter dan media produksi yang digunakan adalah sebagai berikut (Rahayu, 2000, dimodifikasi):

Koloidal kitin 0,5%; K_2HPO_4 0,1%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%; NaCl 3%; Ammonium sulfat 0,7%; Yeast ekstrak 0,05%; Trypton 0,1%.

Ke dalam 3 tabung yang berisi masing-masing 50 μ l media starter pada pH 6,7 dan 8 diinokulasikan masing-masing satu ose kultur bakteri dari media padat, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah selesai masa inkubasi, media starter sebanyak 5 ml diinokulasikan masing-masing

ke dalam 150 ml media produksi dengan pH 6,7 dan 8, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar, 37°C dan 47°C selama 5 hari. Setiap hari diambil sampel untuk dihitung jumlah bakterinya dan diukur aktivitas enzim kitin deasetilasenyanya. Aktivitas enzim kitinase diukur pada hari ke 5. Percobaan dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan.

Pengukuran Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase diukur menggunakan metode Wang dan Chang (1997) yang dimodifikasi. Persiapan sampel diawali dengan pembuatan larutan campuran yang terdiri atas campuran substrat kitin 1% dengan larutan penyangga pH-7 dengan perbandingan 1:2. Untuk sampel, larutan campuran tersebut ditambah dengan larutan enzim sebanyak 1/3 bagian dari jumlah larutan campuran, kemudian dikocok dengan vorteks dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Selesai inkubasi, larutan disentrifus pada suhu 4°C, dengan kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Filtrat disebut dengan larutan A. Untuk kontrol, larutan campuran antara substrat kitin dan penyangga (1:2) langsung dikocok dengan vorteks dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah selesai inkubasi, ditambahkan larutan enzim sebanyak 1/3 bagian dari jumlah larutan campuran tersebut, yang disebut dengan larutan B.

Sampel adalah campuran yang terdiri atas 500 µl larutan A, 500 µl akuades dan 1.000 µl reagen *schale* (0,125 g K-ferrisianida dalam 250 ml 0,5 M N-karbonat), sedangkan kontrol adalah campuran yang terdiri atas 500 µl larutan B, ditambah 500 µl akuades dan 1.000 µl reagen *schale*. Adapun blanko dibuat dengan mencampur 1.000 µl akuades dan 1.000 µl reagen *schale*.

Selanjutnya terhadap ketiga campuran tersebut dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Aktivitas kitinase ditentukan berdasarkan kurva standar N-asetil glukosamin yang dibuat dengan mengukur absorbansi dari campuran antara larutan N-asetil glukosamin (berkisar antara 0 hingga 500 µl) dengan akuades (berkisar antara 500 hingga 0 µl) dan 500 µl reagen *schale* pada panjang gelombang 420 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol N-asetil glukosamin per menit.

Pengukuran Aktivitas Kitin Deasetilase

Campuran antara 24 µl glikol kitin 1% dengan 136 ml 0,1 M buffer borat pH 8 dan 20 µl enzim diinkubasikan 20 menit pada suhu 37°C. Setelah selesai masa inkubasi, ke dalam campuran

ditambahkan 200 µl asam asetat 33%. Hasil reaksi diambil 200 µl, ditambahkan 200 µl Na-nitrit 5% dan 200 µl asam asetat. Larutan dikocok dengan vorteks, dan dibiarkan 10 menit. Setelah itu, larutan campuran dikocok kembali dengan vorteks dan ditambah dengan 400 µl amonium sulfamat 12,5 % dan dideaminasi selama 30 menit sambil digoyang. Kemudian ditambah dengan 2 ml HCl 5% dan 400 µl indol 1% dalam etanol. Selanjutnya dimasukkan ke dalam air mendidih selama 5 menit, didinginkan, dan ditambah 800 µl etanol absolut, dan dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 492 nm. Untuk blanko, larutan enzim dimasukkan setelah penambahan 200 µl asam asetat 33%. Sebagai standar digunakan 200 µl glukosamin dengan beberapa konsentrasi, yang diperlakukan seperti contoh (Tokuyashu *et al.*, 1996). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol residu glukosamin per menit.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil Uji Daya Kitinolitik

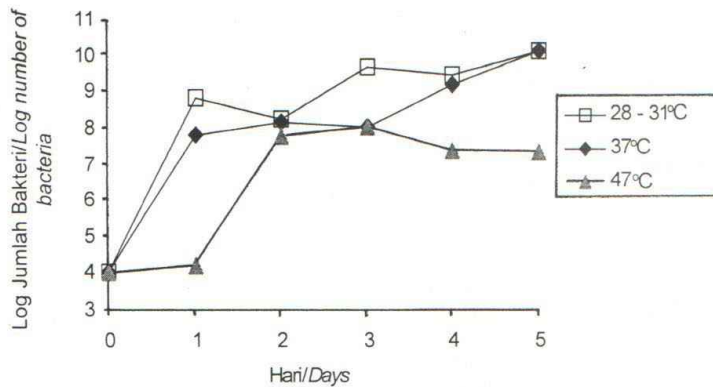
Vibrio harveyi mempunyai daya kitinolitik yang cukup tinggi karena lingkaran jernihnya yang cukup lebar, dengan indeks sekitar 3-5. Bakteri ini ternyata mempunyai daya kitinolitik yang hampir sama dengan *Bacillus* K29-14 yang berasal dari Kawah Kamojang, Jawa Barat (Rahayu *et al.*, 2000), yang bersifat termostabil dengan indeks kitinolitik sebesar 5,0 pada kondisi optimalnya, yakni pH 7 dengan suhu 55°C.

Optimasi Produksi Kitinase dan Kitin Deasetilase dari *Vibrio harveyi*

Jumlah bakteri

Perkembangan jumlah bakteri selama produksi enzim adalah seperti pada Gambar 1.

Perkembangan jumlah bakteri *Vibrio harveyi* uji selama produksi enzim ternyata tidak dipengaruhi oleh pH media, tetapi dipengaruhi oleh suhu inkubasi. Terlihat pada gambar tersebut bahwa pada suhu kamar (28-31°C) bakteri sangat cepat melakukan adaptasi dari periode starter, sehingga mencapai 10^9 dalam waktu 24 jam. Namun pada periode 4 hari berikutnya, jumlah bakteri tidak meningkat secara signifikan. Hal yang hampir sama terjadi pada suhu inkubasi 37°C, meskipun pada suhu tersebut bakteri cenderung masih mengalami pertambahan jumlah hingga akhir pengamatan (5 hari). Pada suhu 47°C, terlihat pola perkembangan bakteri yang berbeda. Masa adaptasi dilalui dengan lambat, sehingga jumlah bakteri tetap 10^4 hingga satu hari inkubasi dalam media produksi enzim. Fase logaritmik baru tercapai setelah periode tersebut. Setelah itu, jumlah bakteri langsung masuk



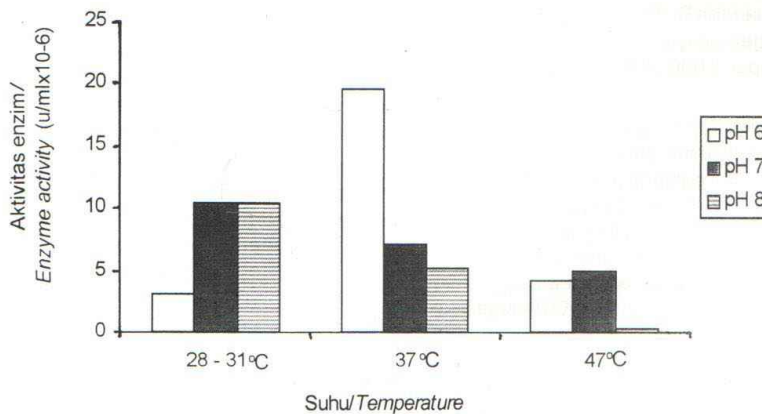
Gambar 1. Perkembangan jumlah bakteri *Vibrio harveyi* pada berbagai suhu inkubasi.
 Figure 1. Changes of colony count of *Vibrio harveyi* during 5 days incubation at different temperatures.

ke fase konstan mengikuti pola kurva bakteri pada umumnya.

Aktivitas kitinase

Aktivitas enzim kitinase yang diproduksi oleh *Vibrio harveyi* setelah diinkubasikan selama 5 hari pada suhu dan pH yang berbeda adalah seperti pada Gambar 2.

Seperti halnya dengan jumlah bakteri, aktivitas enzim kitinase yang diproduksi selama 5 hari inkubasi ternyata tidak dipengaruhi oleh pH, dalam arti aktivitas optimumnya berkisar dari pH 6 hingga 8, dengan aktivitas rata-rata berkisar antara $6,98 \times 10^{-6}$ hingga $11,75 \times 10^{-6}$ u/ml. Fenomena ini tidak banyak berbeda dengan hasil penelitian lain tentang kinerja kitinase yang dihasilkan oleh berbagai jenis bakteri. Rahayu



Gambar 2. Aktivitas enzim kitinase yang diproduksi oleh bakteri *Vibrio harveyi* setelah 5 hari inkubasi.
 Figure 2. Enzyme activity of chitinase produced by *Vibrio harveyi* after 5 days incubation.

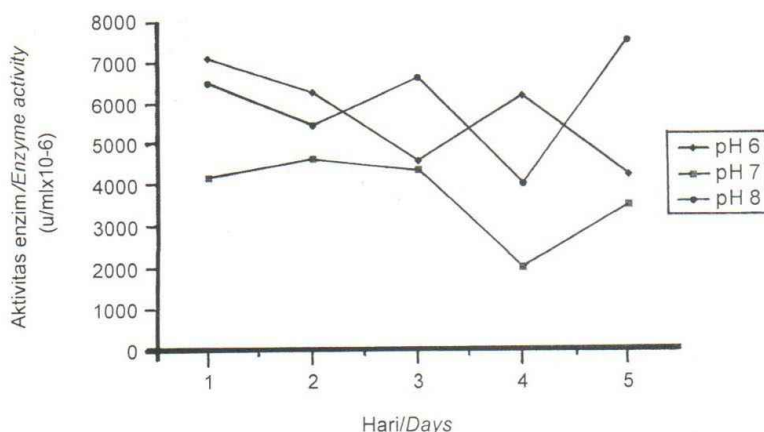
et al. (2000) menyatakan bahwa pH optimum kitinase yang dihasilkan oleh *Bacillus* K29-14 adalah 7. Pada pH optimum tersebut, aktivitas enzim pada 55°C mencapai 2,2 u/ml. Adapun tiga endokitinase termostabil dari *Bacillus* MH-1 mempunyai pH optimum antara 5,5-6,5 (Sakai et al., 1998); dua kitinase yang dihasilkan oleh *Streptomyces* J13-3 mempunyai pH optimum 6,0 (Okazaki et al., 1995); sedangkan dua kitinase yang diproduksi oleh *Pseudomonas aeruginosa* K-187 mempunyai kisaran pH yang luas yaitu masing-masing 6 hingga 9 dan 5 hingga 10 (Wang dan Chang, 1997).

Suhu inkubasi berpengaruh nyata, walaupun tidak terdapat perbedaan nyata antara inkubasi pada suhu 28-31°C dengan 37°C atau dengan 47°C. Perbedaan nyata hanya terlihat antara suhu 37°C dengan 47°C dengan aktivitas yang lebih tinggi pada suhu 37°C, yakni dengan nilai rata-rata mencapai $10,82 \times 10^{-6}$ u/ml

($3,8 \times 10^{-5}$ u/ml), tetapi tidak berbeda dengan pH 8 ($6,0 \times 10^{-5}$ u/ml). Walaupun demikian, ada interaksi antara pH dan suhu inkubasi serta antara ketiga faktor tersebut dalam mempengaruhi besarnya aktivitas enzim. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa aktivitas enzim tidak ditentukan oleh besaran jumlah sel bakteri, tetapi lebih pada faktor kondisi lingkungan, yaitu pH. Bila dibandingkan dengan *Bacillus* K29-14, aktivitas ini belum cukup tinggi, karena pada kondisi optimumnya, *Bacillus* K29-14 dapat memproduksi kitin deasetilase dengan aktivitas mencapai 4,2 u/ml (Rahayu et al., 2000)

KESIMPULAN DAN SARAN

Vibrio harveyi dapat memproduksi enzim kitinase dan kitin deasetilase yang ditunjukkan dari hasil uji daya kitinolitik, walaupun aktivitas enzim yang diperoleh masih rendah. Sama halnya dengan



Gambar 3. Aktivitas enzim kitin deasetilase yang diproduksi oleh bakteri *Vibrio harveyi* pada pH yang berbeda.
Figure 3. Enzyme activity of chitin deacetylase produced by *Vibrio harveyi* at different pHs.

ml, dibandingkan dengan aktivitas pada 47 °C, yang nilai rata-ratanya hanya mencapai $3,56 \times 10^{-6}$ u/ml.

Aktivitas kitin deasetilase

Aktivitas enzim kitin deasetilase yang diproduksi oleh *Vibrio harveyi* selama masa inkubasi pada pH yang berbeda adalah seperti pada Gambar 3.

Berbeda dengan perkembangan jumlah bakteri, aktivitas enzim kitin deasetilase ternyata justru dipengaruhi oleh pH media tetapi tidak oleh suhu dan waktu inkubasi. Aktivitas enzim rata-rata pada pH 6 ($5,6 \times 10^{-5}$ u/ml) berbeda nyata dengan pada pH 7

perkembangan jumlah bakteri selama masa produksi enzim, aktivitas enzim kitinase dipengaruhi oleh suhu inkubasi, tetapi tidak oleh pH media. Aktivitas ini mencapai rata-rata $10,82 \times 10^{-6}$ u/ml pada suhu 37°C dan $3,56 \times 10^{-6}$ u/ml pada suhu 47 °C. Sebaliknya, aktivitas enzim kitin deasetilase justru lebih dipengaruhi oleh pH media daripada suhu inkubasinya. Aktivitas rata-rata kitin deasetilase pada pH 6, 7, dan 8 berturut-turut adalah $5,6 \times 10^{-5}$ u/ml; $3,8 \times 10^{-5}$ u/ml, dan $6,0 \times 10^{-5}$ u/ml.

Untuk memanfaatkan kedua jenis enzim ini, tampaknya diperlukan upaya khusus, antara lain dengan perlakuan terhadap substrat misalnya dengan

cara swelling terhadap substrat supaya mempermudah kerja enzim, maupun dengan pemurnian enzim.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, Md. M., Mizutani, T., Isono, M., Nikaidou, N. and Watanabe, T. 1996. Three chitinase genes (*chiA*, *chiB*, and *chiC*) comprise the chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12. *J. Ferment Bioeng.* 82(1): 28-36.
- Alfonso, C., Neuro, O.M., Santamaria, F. and Reves, F. 1995. Purification of heat stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *J. Curr. Microbiol.* 30(1): 49-54
- Arnold, L.D. and Solomon, N.A. . 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotech.* American Society for Microbiology, Washington.
- Boucher, I, Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W.A. and Brzezinski, R. 1992. Purification and characterization of chitosanase from *Streptomyces* N-174. *J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 38(2): 188-193
- Bouriotis, V., Kafetzopoulos, D. and Vournakis, J. 1993. Process for isolating and preparing purified chitin deacetylase. *Inst. Mol. Biol. Biotechnol.* US Patent No. 5219749
- Crawford D.L. and Mahadevan, B. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC-108. *Enzyme Microb. Technol.* 20(7): 489-493
- Gao, X.D., Katsumoto, T., and Ondera, K. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.* 117(2): 257-263
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A., Tsigos, I., Christodoulidou, A., Kavelaki, P. and Bouriotis, V. 1994. Chitin deacetylation by enzymic means. *J. Prog. Biotechnol.* 9(1): 291-294
- Kirchman, D.L., Svitil, A.L., Chadain, S.M.N. and Moore, J.A. 1997. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing in different form of chitin. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 63(2): 408-413
- Lindsay, G.J.H. and Gooday, G.W. 1985. Chitinolytic enzymes and the bacterial microflora in digestive tract of cod, *Gadus morhua*. *J. Fish Biol.* 26(3): 255-266
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation process. *J. Carbohydr. Res.*, 273(2): 235-242
- Morikawa, Y., Nogawa, M., Takahashi, H., Kashigawa, A., Oshima, K. and Okada, H. 1998. Purification and characterization of exo-beta D-glucosaminidase from cellulotic fungus *Trichoderma reesei* PC-37. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 64(3): 890-895
- Okazaki, K., Kato, F., Watanabe, N. and Yusada, S. 1995. Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces* J13-3. *Bioschi. Biotech. Biochem.* 59(8): 1586-1587
- Ohishi, K., Yamagishi, M., Okta, T., Suzuki, M. and Izumida, H. 1996. Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *J. Ferment. Bioeng.* 82(6): 598-600
- Pelletier, A. and Sygusch, J. 1990. Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* Pl. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 56(4): 844-848
- Rahayu, S., Suhartono, M.T. dan Syah, D. 2000. Karakterisasi dan pemurnian kitinase dan kitin deasetilase termostabil dari isolat K29-14 asal Kawah Kamojang, Jawa Barat. *Seminar Program Pasca Sarjana IPB.*
- Reves, F., Alfonso, C., Neuro, O.M. and Santamaria, F. 1995. Purification of heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Current Microbiol.* 30(1): 49-54
- Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M. and Moriguchi, M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *J. Appl. Environ. Microb.* 64(9): 3397-3402
- Saleh, M., Abdilah, R., Suherman, M., Basmal, J. dan Indriati, N. 1994. Pengaruh suhu, waktu, dan konsentrasi pelarut pada ekstraksi kitosan dari limbah pengolahan udang beku terhadap beberapa parameter mutu kitosan. *Jurnal Pen. Pasca Panen Perikanan* No.81:30-43
- Sherief, A. A., El-Sawah, M.M., El-Naby, M. A. Abd. 1991. Some properties of chitinase produced by a potent *Aspergillus carneus* strain. *J. Appl. Microbiol. Biotech.* 35(2): 228-230
- Svitil, A. L., Sinead, M., Chadhain, N. I., Moore, J. A. and Kirchman, D.L. 1996. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different form of chitin. *J. Appl. Environ. Microbiol.* Feb.: 408-413
- Tokuyasu, K., Kameyasa, M.O. and Hayashi, K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotricum lindemuthianum*. *Bioschi. Biochem.* 60(10): 1598-1603
- Trudel, J. and Aselin, A. 1980. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochem.* 178: 362-366
- Wang, San-Lang and Chang, Wen-Tsu, 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 63(2): 380-386
- Wang, San-Lang and Chio, Sau-Hwa, 1998. Reversible immobilization of chitinase through coupling of reversibly soluble polymer. *Enzyme Microb. Technol.* 22(7): 634-640
- Wang, San-Lang, Chang, Wen-Tsu, and Lu, M. C. 1995. Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. Proc. of the National Science Council. Rep. of China, Part B: *Life Sciences*, 19(2): 105-112