

PRODUKSI KITINASE EKSTRASELULER *Aspergillus rugulosus* 501
SECARA OPTIMAL PADA MEDIA CAIR
[Optimally Production of Extracellular Chitinase from
Aspergillus rugulosus 501 in Liquid Medium]

Nunuk Widhyastuti

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong.

ABSTRACT

Chitinases hydrolyzing chitin are produced by various organisms and their physiological functions depend on their sources. Chitinases and its hydrolysis products have a broad range of applications. Increasing commercial interest in chitinase and its products has led to the need of inexpensive, reliable sources of active and stable chitinase preparations. The activity of chitinase produced by *Aspergillus rugulosus* 501 in liquid culture and the parameters that controlled the enzyme synthesis were studied to find optimal conditions for the enzyme production. Hydrolysis products of chitinase were detected by Reissig method. The results showed that fungal chitinase activity in media containing organic nitrogen and phosphate was higher than that in media containing trace element, organic and anorganic nitrogen but lack of phosphate. The maximum enzyme activity reached in the second day incubation. Chitinase production was affected by the initial pH of media, chitin concentration and source of nitrogen, while the concentration of inoculum used in this study did not affect enzyme production. High enzyme activity was found in media with initial pH 5.0-6.5. When using different concentration of colloidal chitin, chitinase activities were also found high in concentration from 0.75% to 1.5%. The organic nitrogen sources gave the better results compared to the anorganic ones.

Kata kunci: Kitinase, produksi, koloidal kitin, *Aspergillus rugulosus* 501.

PENDAHULUAN

Kitin adalah homopolimer yang tersusun dari N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) yang saling berhubungan melalui ikatan linier P-1,4. Kitin merupakan biopolimer terbesar kedua di alam setelah selulosa dan merupakan komponen struktural dinding sel jamur, eksoskeleton insekta, krustasea, nematoda, moluska, alga dan diatom (Gohel *et al.*, 2006).

Kitinase (EC 3.2.1.14) adalah enzim yang menghidrolisis ikatan panjang polimer kitin menjadi ikatan yang lebih pendek. Kitinase dikelompokkan menjadi dua, yaitu endokitinase (menghidrolisa kitin secara acak dari bagian dalam menghasilkan kitooligomer) dan eksokitinase. Eksokitinase terdiri dari kitobiohidrolase yang menghidrolisa kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan kitobiosa sebagai produk akhir dan P-JV-asetilheksosaminidase yang menghidrolisa kitin secara berurutan dari ujung nonreduksi menghasilkan N-asetil glukosamin (Patil *et al.*, 2000).

Kitinase dihasilkan oleh mikroba, tanaman dan hewan termasuk manusia. Beberapa mikroba yang diketahui berpotensi sebagai penghasil kitinase yaitu *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* dan *Trichoderma* (Omumasaba *et al.*, 2001). Aplikasi

kitinase dan produk hidrolisisnya sangat luas. Kitinase diantaranya dimanfaatkan sebagai biokontrol hama dan penyakit tanaman, biokontrol larva nyamuk, preparasi protoplasts, produksi protein sel tunggal dari limbah perikanan, produksi senyawa kitooligosakarida dan N-asetil glukosamin (Patil *et al.*, 2000; Vaidya *et al.*, 2003, Dahiyae *et al.*, 2006).

Dewasa ini senyawa kitooligosakarida menarik perhatian karena aplikasinya yang luas dibidang medis, pertanian dan industri. Senyawa kitooligosakarida memiliki aktivitas antijamur, antibakteri, hipokolesterolemik, antihipertensi dan dapat meningkatkan kualitas pangan (Bhattacharya *et al.*, 2007). Kitoheksaosa dan kitopentaosa diketahui dapat meningkatkan sistem imun tubuh dan memiliki aktivitas antitumor (You-Jin *et al.*, 2000). N-asetil glukosamin digunakan dalam pengobatan osteoarthritis dan digunakan juga sebagai suplemen makanan (Sashiwa *et al.*, 2002).

Meningkatnya kebutuhan terhadap kitin dan derivatnya di bidang farmasi, kosmetika dan pangan fungsional mengakibatkan meningkatnya kebutuhan kitinase. Untuk itu penelitian yang berkelanjutan guna memperoleh kitinase yang murah, memiliki aktivitas tinggi dan stabil perlu dilakukan (Ogawa *et al.*, 2002;

Wasli *et al.*, 2006). Produksi kitinase dapat dilakukan dengan fermentasi terendam (media cair) dan fermentasi permukaan (media padat). Pada umumnya studi produksi kitinase dilakukan dengan fermentasi terendam, meskipun studi dengan fermentasi permukaan juga masih dilakukan (Binod *et al.*, 2007). Studi optimasi media kultur sangat penting untuk membantu pemahaman interaksi antar nutrisi pada berbagai konsentrasi dan untuk penghitungan konsentrasi optimal setiap nutrisi dalam produksi enzim target (Dahiya *et al.*, 2005).

Hasil seleksi awal terhadap beberapa jenis jamur dari genus *Aspergillus* milik koleksi kultur LIPI-MC diperoleh *Aspergillus rugulosus* 501 sebagai penghasil kitinase potensial. Penelitian ini bertujuan memperoleh kondisi optimal dalam produksi kitinase dari jamur tersebut pada media cair. Parameter yang dipelajari yaitu : komposisi media, waktu inkubasi, pH awal media, konsentrasi kitin, sumber nitrogen dan konsentrasi inokulum.

BAHAN DAN METODE

Mikroba

Mikroba yang digunakan yaitu jamur terseleksi *Aspergillus rugulosus* 501 yang merupakan koleksi LIPI-MC, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.

Preparasi Koloidal Kitin

Sebanyak 20 g kitin ditambah 400 ml HCl pekat, distirer selama 2 jam kemudian diinkubasi dalam lemari pendingin selama 24 jam. Larutan tersebut disaring dengan *glass wool*, filtratnya ditambah akuades steril dinginkan IONNaOH sampai pH mencapai 7,0. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10

menit dan endapannya diambil. Endapan dibilas dengan akuades steril dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Endapan yang berupa koloidal kitin disimpan di dalam lemari pendingin.

Media

Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) digunakan untuk pemeliharaan *A. rugulosus* 501 dan preparasi inokulum. Komposisi media cair untuk produksi kitinase tertera dalam Tabel 1.

Produksi kitinase

Preparasi inokulum dilakukan dengan cara menumbuhkan *A. rugulosus* 501 pada media PDA miring, diinkubasi pada suhu kamar sampai sporulasi merata (4 hari). Selanjutnya ditambahkan akuades steril yang mengandung 0,25% tween 80 dan spora dipanen dengan ose. Suspensi spora diukur kerapatan optiknya (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sampai OD mencapai 0,5.

Produksi kitinase dilakukan dengan menginokulasikan 2% inokulum ke dalam 100 ml media cair dan diinkubasi pada suhu kamar selama 6 hari di atas pengocok (*shaker*) dengan kecepatan 120 rpm. Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 2 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Filtrat yang digunakan sebagai larutan enzim diuji aktivitas kitinasenya. Media yang menghasilkan aktivitas kitinase tinggi digunakan dalam pengujian pengaruh waktu inkubasi, pH awal media cair (pH 3,5-7,0), konsentrasi kitin (0,5%-2%), sumber nitrogen (organik dan anorganik) dan konsentrasi inokulum (1-10%) terhadap produksi kitinase.

Pengujian Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase diuji dengan mengukur kadar

Tabel 1. Komposisi media cair

Media	Bahan	Jumlah (% , b/b)	Trace element*	
			Bahan	Jumlah (% , b/b)
A	Koloidal kitin	0,5		
	Polipepton	0,1	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	KH ₂ PO ₄	0,1	MnSO ₄ .2H ₂ O	0,16
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,14
B	Koloidal kitin	0,5	CoCl ₂	0,2
	Baktopepton	0,1		
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,14		
	Urea	0,03		
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,03		
	Trace element*	0,1 (v/v)		

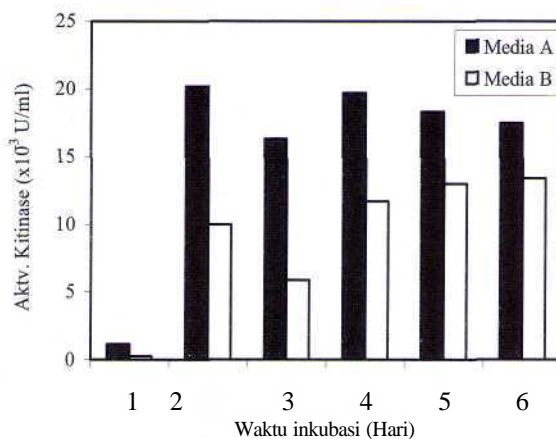
gula amino sebagai produk hidrolisis kitin oleh kitinase. Konsentrasi gula amino diukur menggunakan Metode Reissig (1955). Senyawa N-asetil glukosamin (GlcNAc) digunakan sebagai standar untuk penghitungan aktivitas kitinase. Satu unit kitinase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 μmol N-asetil glukosamin dari substrat koloidal kitin permenit pada suhu 50 °C, pH 5,0. Larutan kitinase yang menghasilkan GlcNAc terlalu tinggi diencerkan terlebih dahulu dan faktor pengenceran digunakan dalam perhitungan aktivitasnya.

Sebanyak 0,5 ml larutan enzim direaksikan dengan 0,5 ml substrat 1% koloidal kitin dalam 50 mM bufer asetat pH 5,0 dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Reaksi enzimatis dihentikan dengan memasukkan campuran ke dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit dan filtrat dipisahkan dari endapan. Sebanyak 250 μl filtrat ditambah 50 μl potasium tetraborat, dididihkan selama 3 menit dan didinginkan dalam air mengalir. Ditambahkan 1.25 ml reagen 4-(dimetilamino)benzaldehida, diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit dan OD dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 584 nm.

HASIL

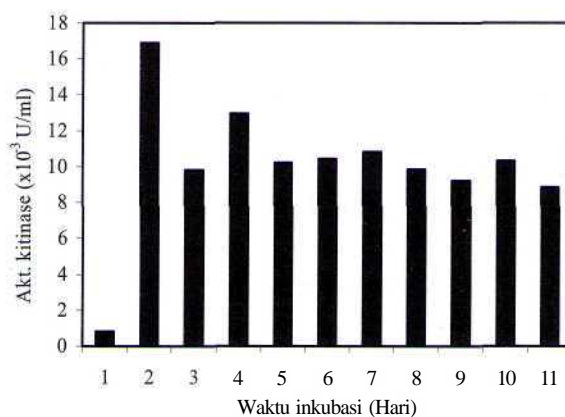
Produksi kitinase pada media cair dilakukan pada 2 macam media yaitu media cair yang mengandung fosfat tanpa penambahan *trace element* (media A) dan media yang mengandung *trace element* tanpa fosfat (media B). Aktivitas kitinase *A. rugulosus* 501 yang ditumbuhkan selama 6 hari inkubasi pada media A lebih besar dibandingkan aktivitasnya pada media B. Namun demikian aktivitas kitinase pada kedua media tersebut memiliki pola yang serupa sampai inkubasi hari ke-4, yaitu mengalami peningkatan yang tinggi pada hari ke-2, sedikit menurun pada hari ke-3 dan meningkat lagi pada hari ke-4 (Gambar 1). Aktivitas kitinase pada media A tertinggi dicapai pada hari ke dua (22×10^{-3} U/ml), sedangkan pada media B pada hari ke-6 ($14,5 \times 10^{-3}$ U/ml). Media A digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi kitinase *A. rugulosus* 501 diamati sampai hari ke-11 inkubasi (Gambar 2). Produksi kitinase pada hari pertama masih sangat rendah dan meningkat tajam mencapai maksimal



Gambar 1. Aktivitas kitinase *A. rugulosus* 501 pada media cair A dan B

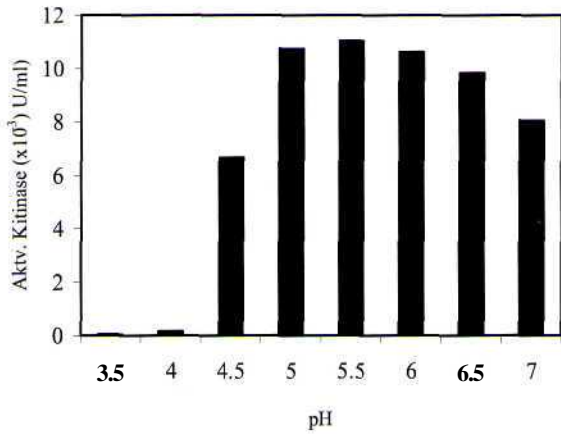
pada hari ke-2 yaitu $16,9 \times 10^{-3}$ U/ml. Aktivitas kitinase pada hari ke-3 mengalami penurunan 42% ($9,8 \times 10^{-3}$ U/ml), kemudian sedikit meningkat lagi pada hari ke-4 ($12,9 \times 10^{-3}$ U/ml). Aktivitas kitinase pada hari ke-5 sampai ke-11 relatif stabil.



Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap produksi kitinase

Pengaruh pH awal media terhadap produksi kitinase diuji dengan menumbuhkan *A. rugulosus* 501 pada pH yang bervariasi selama 2 hari pada suhu 30 °C di atas *shaker* (120 rpm). Jamur menghasilkan kitinase pada media dengan pH awal dari 4,5 sampai 7,0, sedangkan pada pH kurang dari 4,0 tidak menghasilkan kitinase. Aktivitas kitinase yang tinggi diperoleh pada media dengan pH 5,0-6,5 dimana aktivitas tertinggi terdapat pada pH 5,5, yaitu sebesar $11,055 \times 10^{-3}$ U/ml.

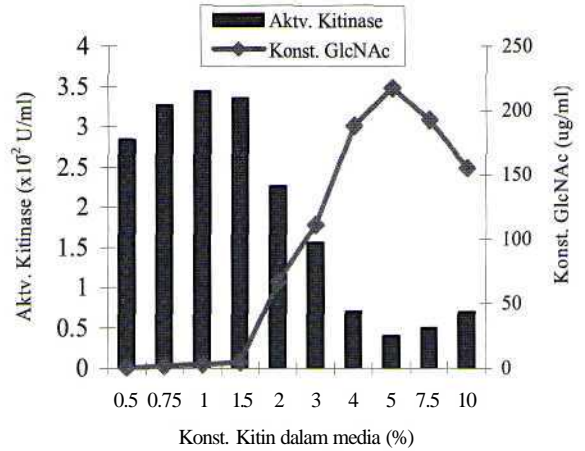
Pengaruh berbagai konsentrasi awal kitin (1%-10%) dalam media diuji dengan mengukur aktivitas



Gambar 3. Pengaruh pH awal media terhadap produksi kitinase

kitinase dan konsentrasi GlcNAc pada filtrat setelah 2 hari inkubasi. Hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas kitinase yang tinggi diperoleh pada media yang mengandung kitin 0,75%-1,5% dengan konsentrasi GlcNAc filtrat di bawah 50 µg/ml. Aktivitas kitinase tertinggi diperoleh pada media dengan konsentrasi kitin 1%, yaitu sebesar 3,435 x10²U/ml. Pada media yang mengandung kitin di atas 1,5% terjadi peningkatan konsentrasi GlcNAc yang disertai dengan penurunan pada aktivitas kitinase (Gambar 4). Produksi kitinase dipengaruhi oleh konsentrasi awal kitin dalam media dan besarnya aktivitas kitinase berbanding terbalik dengan konsentrasi GlcNAc dalam filtrat.

Pengaruh sumber nitrogen (N) organik (polipepton, ekstrak khamir, bacto pepton bacto tripton, urea) dan anorganik (kalium nitrat, amonium sulfat, amonium nitrat) terhadap produksi kitinase diuji selama 7 hari inkubasi. Secara umum dapat dikatakan bahwa aktivitas kitinase pada media dengan sumber N organik lebih tinggi dibandingkan pada media dengan sumber N anorganik. Aktivitas kitinase tertinggi diperoleh pada media yang mengandung polipepton setelah 5 hari inkubasi (7,602 x10² U/ml). Gambar 5 memperlihatkan adanya perbedaan pola produksi kitinase *A. rugulosus* 501 pada media kitin dengan kedua sumber N tersebut. Aktivitas kitinase pada media dengan sumber N organik meningkat tinggi pada hari kedua, menurun pada hari ketiga dan meningkat lagi pada hari keempat. Aktivitas kitinase pada media dengan sumber N



Gambar 4. Per garuh kadar kitin terhadap produksi kitinase

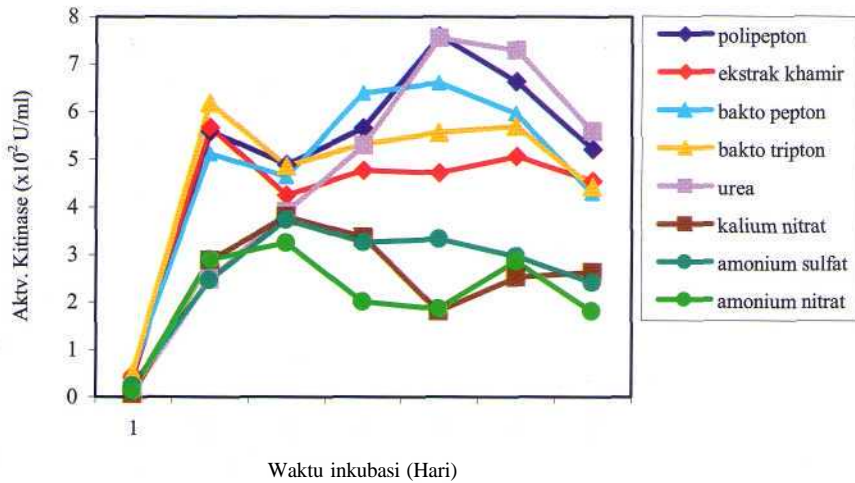
anorganik meningkat sampai hari ketiga dan selanjutnya mengalami penurunan. Berbeda dengan sumber N organik lainnya, aktivitas kitinase pada media dengan urea sebagai sumber N meningkat secara perlahan sampai mencapai maksimal pada hari ke-5 (7,558 x10² U/ml).

Pengaruh konsentrasi inokulum terhadap produksi kitinase diperlihatkan dalam Gambar 6. Aktivitas kitinase pada berbagai konsentrasi inokulum (1 %-10%) berkisar antara 6,3-6,9 x 10³ U/ml. Tampaknya produksi kitinase relatif tidak terpengaruh oleh besarnya konsentrasi inokulum yang diuji.

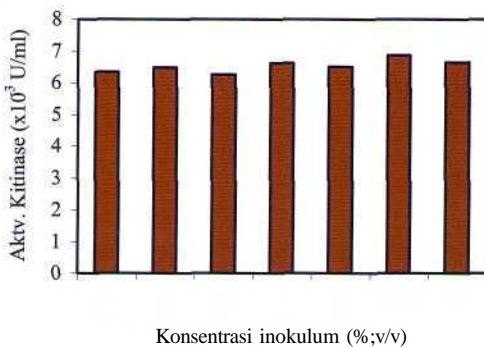
PEMBAHASAN

Produksi kitinase ekstraseluler dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya: sumber karbon, nitrogen, limbah pertanian (dedak padi, gandum) dan faktor lingkungan seperti aerasi, pH dan waktu inkubasi (Dahiya *et ah*, 2006) Hasil pengujian awal diketahui bahwa *A. rugulosus* 501 dapat memproduksi kitinase dengan aktivitas yang tinggi baik pada media cair maupun padat. Pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi kitinase pada media cair. Guna memperoleh komposisi media yang tepat maka dilakukan pengujian terhadap 2 macam media cair yang umum digunakan unruk produksi kitinase (Rattanakit *et ah*, 2002).

Komposisi media sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan produksi enzim. Media cair A dan B yang digunakan dalam penelitian ini



Gambar 5. Pengaruh sumber nitrogen terhadap produksi kitinase



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi inokulum terhadap produksi kitinase

mengandung nutrisi yang diperlukan baik untuk pertumbuhan sel maupun produksi kitinase. Kitin terutama merupakan sumber karbon yang sekaligus berfungsi sebagai induktor untuk sintesa kitinase. *A. rugulosus* 501 menghasilkan aktivitas kitinase lebih tinggi pada media A dibandingkan pada media B. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan perbedaan sumber nitrogen, rasio C/N dan elemen mikro pada kedua media. Sumber nitrogen pada media A hanya dalam bentuk organik (0,1% polipepton), sedangkan pada media B dalam bentuk organik (0,1% baktopepton) dan anorganik (0,14% amonium sulfat dan 0,013% urea). Kadar nitrogen yang tinggi akan mengakibatkan rasio C/N menjadi lebih kecil. Selain itu pada media A terdapat sumber fosfat (KH_2PO_4), sedangkan pada media B tidak ada. Fosfat merupakan

mineral utama yang penting untuk pertumbuhan sel (Suhartono, 1989). Hasil yang serupa diperoleh Rattanakit *et al.* (2002) yang menumbuhkan *Aspergillus* sp.S 1-13 pada media cair dimana aktivitas kitinase pada media cair yang mengandung fosfat 6,5 kali lebih besar dibandingkan pada media tanpa fosfat. Meskipun elemen mikro diperlukan untuk pertumbuhan jamur, tetapi beberapa diantaranya dapat menghambat aktivitas kitinase. Ion Fe^{2+} dan Zn^{2+} diketahui menghambat kitinase *A. fumigatus* YJ-407 (Xia *et al.*, 2001) dan eksokitinase (7V-asetilheksoaminidase) *A. niger* dan *A. tamari* (Scigelova dan Crout, 1999). Ion Co^{2+} dapat menghambat aktivitas kitinase dengan cara berikatan pada sisi aktif enzim (Wasli *et al.*, 2006). Hal ini dapat menjelaskan mengapa aktivitas kitinase *A. rugulosus* 501 pada media B yang mengandung elemen mikro Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} dan Co^{2+} lebih rendah dibandingkan media A yang tidak mengandung elemen mikro tersebut.

Keasaman (pH) media berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi enzim. Pada umumnya jamur tumbuh dan menghasilkan berbagai macam enzim dengan baik pada kisaran pH asam. *A. rugulosus* 501 menghasilkan kitinase yang tinggi pada kisaran pH 5,0-6,0 dengan aktivitas tertinggi pada pH 5,5. Produksi kitinase oleh *Trichoderma harzianum* juga mencapai maksimum pada pH 5,5 (Sandhya *et al.*, 2004).

Konsentrasi kitin dalam media berpengaruh

terhadap produksi kitinase. Kitin merupakan sumber karbon yang akan dihidrolisis oleh kitinase menjadi kitooligosakarida sederhana dan monomernya (GlcNAc). Pada mikroba kitinolitik, kitinase konstitutif disintesa dalam jumlah yang sangat rendah untuk menghidrolisis kitin yang terdapat dalam media. Senyawa kitooligosakarida sederhana dan GlcNAc hasil hidrolisis kitin tersebut pada konsentrasi yang rendah akan berfungsi sebagai induktor untuk sintesis kitinase induktif, tetapi pada konsentrasi yang tinggi justru akan berfungsi sebagai inhibitor (sintesa kitinase bersifat represi katabolit). Produksi kitinase *A. rugulosus* 501 meningkat dengan meningkatnya konsentrasi kitin sampai mencapai 1%, selanjutnya produksi kitinase mengalami penurunan dengan makin tingginya konsentrasi kitin. Konsentrasi GlcNAc pada media yang mengandung kitin 0,5%-1,5% sangat rendah sehingga berfungsi sebagai induktor sintesa kitinase yang ditunjukkan dengan tingginya aktivitas kitinase. Sebaliknya pada media yang mengandung kitin lebih dari 1,5% konsentrasi GlcNAc meningkat yang mengakibatkan terhambatnya sintesa kitinase yang ditunjukkan dengan menurunnya aktivitas kitinase (Gambar 4). Pengaruh konsentrasi kitin terhadap produksi kitinase juga terjadi pada *Colletotrichum gloeosporioides*. Aktivitas endokitinase *C. gloeosporioides* mengalami peningkatan dengan semakin tingginya konsentrasi kitin dalam media sampai konsentrasi kitin mencapai 1% (Souza *et al.*, 2005).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa senyawa organik (polipepton, ekstrak khamir, bakto pepton, bakto tripton dan urea) merupakan sumber N yang lebih baik untuk produksi kitinase *A. rugulosus* 501 dibandingkan senyawa anorganik (kalium nitrat, amonium sulfat, amonium nitrat). Tampaknya senyawa organik kompleks (yang berasal dari jaringan hewan, kasein atau sel khamir) memberikan efek yang lebih cepat terhadap produksi kitinase dibandingkan dengan senyawa organik sederhana (urea). Hal ini karena senyawa organik kompleks akan dihidrolisis oleh protease *A. rugulosus* 501 menjadi berbagai asam amino yang merupakan komponen dasar untuk sintesa berbagai protein (termasuk protein kitinase) dan untuk pertumbuhan sel. Menurut Dahiya *et al.* (2006), penambahan beberapa asam amino atau analognya ke

dalam media produksi dapat meningkatkan sintesa kitinase. Selain itu, vitamin (terutama vitamin B kompleks) yang terkandung dalam ekstrak khamir dapat membantu pertumbuhan jamur. Hasil serupa juga diperoleh Souza *et al.* (2005) yang menguji berbagai sumber karbon dan nitrogen terhadap produksi endokitinase *Colletotrichum gloeosporioides*. Aktivitas endokitinase *C. gloeosporioides* lebih tinggi pada media dengan sumber nitrogen organik dibandingkan dengan sumber nitrogen anorganik.

Meskipun konsentrasi inokulum merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produksi kitinase, namun pada penelitian ini produksi kitinase *A. rugulosus* 501 relatif tidak dipengaruhi oleh konsentrasi inokulum yang digunakan (1 %-10%). Perlu diteliti lebih lanjut pengaruh konsentrasi inokulum dibawah 1% terhadap produksi kitinase *A. rugulosus* 501.

KESIMPULAN

Produksi kitinase ekstraseluler *A. rugulosus* 501 pada media cair dipengaruhi oleh komposisi media, waktu inkubasi, pH awal media, konsentrasi kitin dan sumber nitrogen, namun tidak dipengaruhi oleh konsentrasi inokulum yang diuji (1%-10%). Besarnya konsentrasi iV-asetil glukosamin dalam media fermentasi dipengaruhi oleh konsentrasi awal kitin dan nilainya berbanding terbalik dengan aktivitas kitinase. Sumber nitrogen organik memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan sumber nitrogen anorganik. Jamur *A. rugulosus* 501 dapat menghasilkan kitinase dengan aktivitas tinggi apabila inokulum suspensi spora sebanyak 1% diinokulasikan pada media cair yang mengandung kitin 0,75%-1,5% dengan sumber nitrogen organik kompleks, pH awal media 5,0-6,0 dan diinkubasi selama 2 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang setulusnya penulis sampaikan kepada ibu Kasirah dan Ninuk Setianingrum atas bantuannya selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhattacharya D, A Nagpure and RK Gupta. 2007. Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology* 27,21 -28.
Binod P, C Sanhya, P Suma, G Szakacs and A Pandey.

2007. Fungal Biosynthesis of Endochitinase and Chitinase in Solid State Fermentation and Their Application for The production of *N*-acetyl-D-glucosamine from Colloidal Chitin. *Bioresource Technology* **98**,2742-2748.
- Dahiya N, R Tewari, RP Tiwari and GS Hoondal.** 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its Purification, Characterization and Reaction Pattern. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(2), 134-145.
- Dahiya N, R Tewari and GH Hoondal.** 2006. Biotechnological Aspects of Chitinolytic Enzymes: A Review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**(6), 773-782.
- Gohel V, A Singh, M Vimal, P Ashwini and HS Chhatpar.** 2006. Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganism. *African Journal of Biotechnology* 5(2), 54-72
- Ogawa K, N Yoshida, K Kariya, C Ohnishi and R Ikeda.** 2002. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from *Burkholderia cepacia* Strain KH2 Isolated from The Bed Log of *Lentinus edodes*, Shitake Mushroom. *Journal of General and Applied Microbiology* 48,25-33.
- Omumasaba CA, N Yoshida and K Ogawa.** 2001. Purification and Characterization of Chitinase from *Trichoderma viride*. *Journal of General and Applied Microbiology* 47,53-61.
- Patil RS, V Ghormade and MV Deshpande.** 2000. Chitinolytic Enzymes: An Exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 473-483.
- Rattanakit N, A Plikomol, S Yano, M Wakayama and T Tachiki.** 2002. Utilization of Shrim Shellfish Waste as a Substrate for Solid-State Cultivation of a Culture Based on Chitinase Formation Which Is Necessary for Chitin Assimilation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93**(6), 550-556.
- Reissig JL, JL Strominger and LF Leloir.** 1955. A Modified Colorimetric Method for The Estimation of *N*-acetylamino Sugars. *Journal of Biological Chemistry* **217**, 959-966.
- Sandhya C, LK Adapa, KM Nampoothiri, P Binod, G Szakacs and P Ashok.** 2004. Extracellular Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* in Submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology* **44**(1), 49-58.
- Sashiwa H, S Fujishima, N Yamano, N Kawasaki, A Nakayam, E Muraki, K Hiraga, K Oda and S Aiba.** 2002. Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from cc-chitin by Crude Enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydrate Research* **337**, 761-763.
- Scigelova M and DGH Crout.** 1999. Microbial *N*-acetylhexosaminidase and Their Biotechnological Applications. *Enzyme and Microbial Technology IS*, 3-14.
- Souza RF, RMA Soares, RP Nascimento, RRR Coelho and RC Gomes.** 2005. Effect of Different Carbon Sources on Endochitinase Production by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Microbiology* 51,16-21.
- Suhartono MT.** 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: PAU BioteknologiIPB.
- Vaidya R, P Vyas and HS Chhatpar.** 2003. Statistical Optimization of Medium Components for The Production of Chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Enzyme Microbial Technology* **33**,92-96.
- Wasli AS, MM Salleh and RM Illias.** 2006. Production and Characterization of Crude Chitinase from *Trichoderma virens*. *Regional Post Graduate Conference on Engineering and Science (RPCES)*, Johore 26-27 July.
- Xia G, C Jin, J Zhou, S Yang, S Zhang and C Jin.** 2001. A Novel Chitinase Having A Unique Mode of Action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *European Journal of Biochemistry* **268**,4079-4085.
- You-Jin J, F Shahidi and K Se-Kwon.** 2000. Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and Their Applications in Physiological Functional Foods. *Food Reviews International* **16**(2), 159-176.