

ISBN : 978-602-73685-4-5

Prosiding



SEMINAR NASIONAL
HASIL RISET PENGOLAHAN PRODUK
DAN BIOTEKNOLOGI KELAUTAN DAN PERIKANAN,

PERTEMUAN ILMIAH
TAHUNAN KE-10 &
KONGRES MPHPI

TAHUN 2018

DISELENGGARAKAN ATAS KERJASAMA



BBRP2BKP



MPHPI

**PROSIDING
SEMINAR NASIONAL HASIL RISET PENGOLAHAN PRODUK
DAN BIOTEKNOLOGI KELAUTAN DAN PERIKANAN
TAHUN 2018**

**“PERAN IPTEKIN DAN SUMBER DAYA MANUSIA DALAM
PENYEDIAAN PRODUK PERIKANAN YANG SAH
(SEHAT, AMAN DAN HALAL)”**

JAKARTA, 16-17 OKTOBER 2018



Kerjasama
Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi
Kelautan dan Perikanan
dan
Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia
Jakarta, 2018

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL HASIL RISET PENGOLAHAN PRODUK DAN BIOTEKNOLOGI KELAUTAN DAN PERIKANAN TAHUN 2018

“Peran Iptekin dan Sumber Daya Manusia dalam Penyediaan Produk Perikanan yang SAH (Sehat, Aman dan Halal)”

Jakarta, 16-17 Oktober 2018

Steering Committee:

Prof. Dr. Hari Eko Irianto
Bagus Hendrajana, M.Sc

Organizing Committee:

Asri Pratitis, M.Sc
Syamdid, M.App., Sc
Arif Budiman, S.Pi
Gintung Patantis, M. BiotechSt
Agusman, M.Sc
Kartika Winta Apriliany, M.Dev Pract
Tati Nurhayati, S.Kom
Erki Herdian, A.Md
Faisal Amin, A. Md
Merissa Nur Asih, S.Ikom
Ade Fitri Amalia, A.Md
Ahmad Affandi, S.Kom

Desain Grafis:

Puguh Aji MP

Reviewer:

Prof. Dr. Agus Heri Purnomo
Prof. Dr. Ekowati Chasanah
Dr. Singgih Wibowo
Dr. Muhammad Nursid
Dr. Dwiwitno
Dr. Ariyanti Suhita Dewi
Dr. Ellya Sinurat
Dr. Suryanti
Dr. Subaryono
Dr. Dedi Noviendri
Dr. Hedi Indra Januar
Dr. Dewi Seswita Zilda
Yusma Yenni, M.Si

Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
JI, KS. Tubun Petamburan VI,
Jakarta 10260
Telp. (021) 53650157
Email : semnas.bbrp2b@gmail.com

Copyright © Desember 2018
ISBN: 978-602-73685-4-5

POTENSI ENZIM SELULASE DALAM MENDEGRADASI MATERIAL LIGNOSELULOSA SEBAGAI BAHAN PAKAN IKAN

Lusi Herawati Suryaningrum¹⁾ dan Reza Samsudin

ABSTRAK

Material lignoselulosa mengandung karbohidrat yang melimpah dalam bentuk selulosa dan hemiselulosa yang terbungkus oleh lignin. Pengolahan pendahuluan pada material lignoselulosa diperlukan untuk memperoleh hasil degradasi yang optimal. Setelah dilakukan pengolahan pendahuluan untuk membuka ikatan lignoselulosa, enzim selulase digunakan untuk mendegradasi selulosa dan hemiselulosa yang terdapat pada material lignoselulosa. Proses degradasi tersebut terdiri dari beberapa tahapan. Tahap pertama, enzim endoglukonase menyerang daerah amorf dari selulosa secara acak dan membentuk ujung non pereduksi yang memudahkan kerja eksoglukonase. Selanjutnya enzim eksoglukonase menghidrolisis bagian kristalin selulosa dengan membebaskan dua unit glukosa. Sinergi kedua enzim tersebut menghasilkan unit sakarida yang lebih kecil yang selanjutnya dihidrolisis oleh α -glukosidase menjadi glukosa. Proses degradasi tersebut akan mengubah material lignoselulosa menjadi bahan baku yang mudah dicerna oleh ikan. Tulisan ini bertujuan untuk mengulas pemanfaatan enzim selulase dalam proses degradasi material lignoselulosa dalam rangka pemanfaatannya sebagai bahan baku pakan ikan air tawar.

Kata kunci : degradasi, lignoselulosa, pakan ikan, selulase

PENDAHULUAN

Bahan baku pakan ikan di Indonesia sebagian besar masih mengandalkan impor. Dalam rangka mengurangi impor bahan baku tersebut, maka dicari bahan baku lokal yang memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pakan ikan. Salah satu bahan yang berpotensi dijadikan sebagai bahan baku alternatif adalah material lignoselulosa. Lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, hemiselulosa dan selulosa. Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, menjadikan bahan ini memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai salah satu kandidat bahan baku pakan ikan. Lignoselulosa mengandung tiga komponen penyusun utama yaitu lignin (10-25%), hemiselulosa (20-35%), dan selulosa (35-50%) (Lynd, Elander, & Wyman, 1996). Komponen utama lignoselulosa membentuk kerangka utama pada dinding sel tumbuhan.

Faktor pembatas dalam pemanfaatan material lignoselulosa sebagai bahan pakan ikan adalah adanya ikatan lignoselulosa yang dapat menurunkan tingkat pencernaan pakan, sehingga nilai nutrisi yang dicerna oleh ikan jauh berkurang. Oleh karena itu, sebelum digunakan sebagai bahan baku dalam formulasi pakan, kualitasnya perlu diperbaiki terlebih dahulu. Salah satunya dengan menggunakan enzim selulolitik yang berperan signifikan dalam proses degradasi ikatan lignoselulosa. Akan tetapi karena karakter lignoselulosa yang sangat stabil, maka hidrolisis enzimatik pada material lignoselulosa akan efektif jika sebelumnya dilakukan proses pendahuluan (*pretreatment*).

Tulisan ini bertujuan untuk mengkaji potensi enzim selulolitik dalam rangka meningkatkan kualitas material lignoselulosa untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pakan ikan air tawar. Pemanfaatan material lignoselulosa sebagai bahan pakan memiliki dampak positif bukan hanya terhadap kegiatan budidaya ikan, namun juga lingkungan. Metode yang digunakan dalam tulisan ini adalah *literature review* dari berbagai penelitian yang telah dipublikasikan, didukung oleh data statistik yang relevan.

Material lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan komponen utama dari biomassa yang terdapat pada tanaman yang terbentuk dari proses fotosintesis, dengan produktivitas mencapai 50×10^9 ton per tahun (Sanchez, 2009). Komponen utama lignoselulosa adalah selulosa, hemiselulosa dan lignin. Polimer selulosa, hemiselulosa dan lignin terjalin dengan kuat melalui ikatan kovalen dan non-kovalen (Perez, Dorado, Rubia, & Martinez, 2002). Buranov dan Mazza (2008) menyatakan bahwa lignin berikatan dengan hemiselulosa melalui ikatan kovalen tetapi ikatan yang terjadi antara selulosa dengan lignin belum diketahui dengan jelas. Ikatan lignoselulosa ini merupakan pembatas dalam pemanfaatan material lignoselulosa dalam formulasi pakan karena akan menurunkan tingkat pencernaan sehingga mengurangi nilai nutrisi pakan. Bahan pakan yang mengandung tingkat lignin yang tinggi biasanya berasal dari bahan pakan alternatif atau bahan pakan konvensional, seperti misalnya bahan pakan yang berasal dari limbah pertanian maupun perkebunan.

Lignin merupakan zat organik multi polimer dan merupakan hal yang penting dalam dunia tumbuhan. Lignin memiliki kandungan aromatik-fenolik tinggi, berwarna kecoklatan, dan mudah teroksidasi. Lignin tersusun atas jaringan polimer fenolik yang menghubungkan serat selulosa dan hemiselulosa sehingga terbentuk ikatan yang sangat kuat (Sun & Cheng, 2002). Struktur lignin sangat kompleks dan polanya tidak sama. Gugus aromatik pada lignin dihubungkan oleh rantai alifatik yang terdiri dari dua sampai tiga karbon.

Hemiselulosa merupakan polisakarida yang memiliki berat molekul lebih kecil daripada selulosa. Hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula. Lima gula netral, yaitu glukosa, mannanosa, galaktosa (heksosan), xilosa dan arabinosa (pentosan) merupakan konstituen utama hemiselulosa (Fengel & Wegener, 1995). Rantai utama hemiselulosa bisa terdiri hanya dari satu jenis monomer (homopolimer), seperti xilan, atau terdiri atas dua jenis atau lebih monomer (heteropolimer), seperti glukomannan.

Selulosa di alam sangat berlimpah sebagai sisa tanaman atau dalam bentuk sisa pertanian seperti jerami padi, kulit jagung, gandum, kulit tebu dan tumbuhan lainnya (Han & Chen, 2007). Komposisi selulosa berkisar antara 35- 50% dari komposisi total penyusun dinding sel tumbuhan (Koolman, 2001). Selulosa $(C_6H_{10}O_5)_n$ adalah polimer glukosa yang berbentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi baik secara kimia maupun mekanis. Unit penyusun selulosa adalah selobiosa karena unit keterulangan dalam molekul selulosa adalah dua unit gula (D-glukosa). Polimer rantai panjang selulosa terikat bersama oleh ikatan hidrogen dan ikatan *van der Waals*, yang mana menyebabkan selulosa terpaket dalam mikrofibril. Mikrofibril selulosa memiliki bagian kristalin yang besar (2/3 dari total selulosa) dan bagian terkecil yang tak berbentuk (*amorphous*). Semakin kristalin selulosa, akan semakin susah selulosa tersebut untuk terlarut dan terdegradasi (Mussatto et al., 2010).

Rantai selulosa terdiri dari satuan glukosa anhidrida yang saling berikatan melalui atom karbon pertama dan ke empat. Ikatan yang terjadi adalah ikatan β -1,4-glikosidik. Secara alamiah molekul-molekul selulosa tersusun dalam bentuk fibril yang terdiri dari beberapa molekul selulosa yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik. Fibril ini membentuk struktur kristal yang dibungkus oleh lignin. Komposisi kimia dan struktur yang kompleks tersebut membuat bahan yang mengandung selulosa bersifat kuat dan keras. Sifat kuat dan keras yang dimiliki oleh sebagian besar bahan berselulosa membuat bahan tersebut tahan terhadap peruraian. Komposisi kimia bahan lignoselulosa dapat bervariasi berdasar pada faktor geografis, kondisi iklim dan kimia tanah.

Proses *Pretreatment* pada Material lignoselulosa

Proses pendahuluan pada material lignoselulosa perlu dilakukan terlebih dahulu untuk mempermudah tahapan hidrolisis enzimatis. Proses pendahuluan akan membuat selulosa mudah ditembus oleh enzim selulolitik sehingga dapat mengurangi penggunaan enzim serta menekan biaya. Proses pendahuluan dilakukan karena beberapa faktor seperti kandungan lignin, ukuran partikel serta kemampuan hidrolisis dari selulosa dan hemiselulosa (Hendriks & Zeeman, 2009). Proses ini merupakan cara penting untuk proses konversi selulosa yang dapat dilakukan dengan berbagai metoda yaitu secara kimia, fisika maupun biologi. Selain itu juga untuk memisahkan selulosa dari ikatan lignin-hemiselulosa serta mengurangi kristal selulosa (Balan, Bals, Chundawat, Marshall, & Dale, 2009). Beberapa teknologi *pretreatment* yang telah banyak digunakan dan dikembangkan antara lain (1) secara fisika (mekanik dan pirolisis) (Karagoz et al., 2005), (2) fisika kimia (*steam explosion*, *liquid hot water*, CO_2 *explosion*, dan AFEX) (Li, Balan, Yuan, Dale, 2010), (3) kimia (alkali, larutan asam, pelarut organik) (Dien et al., 2006), (4) biologi (jamur) (Tengerdy dan Szakacs, 2003), dan (5) kombinasi dari proses diatas (Huang, Shi, & Langrish, 2007). Menurut Mtui (2009), proses pendahuluan

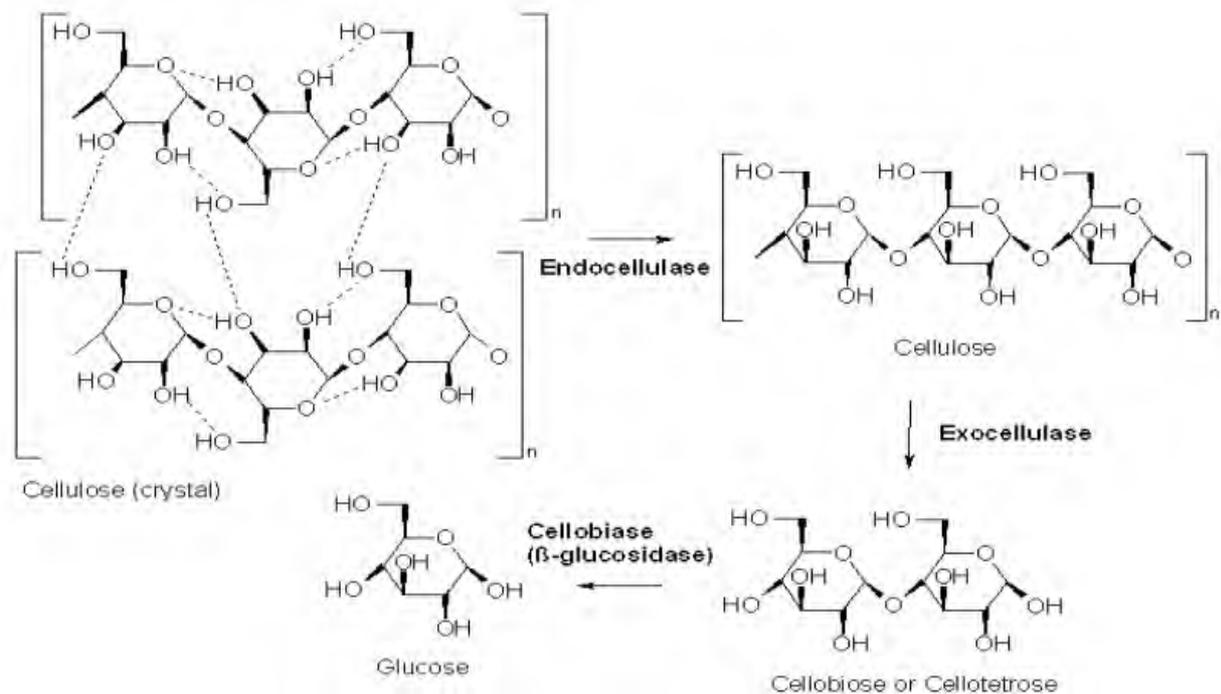
terhadap material lignoselulosa dibedakan secara mekanik (dipotong, digerus, digiling), secara fisik (radiasi dengan *microwave*, pirolisis, radiasi gama), secara fisika kimia (letupan uap, *ammonia fiber explosion* (AFEX), cairan air panas, secara kimia (oksidator (O_3 , H_2O_2), alkali ($NaOH$, $Ca(OH)_2$), asam kuat (HCl , H_2SO_4 , H_3NO_3), asam organik (asam malat, asam glutarat, dan sebagainya) serta proses *organic solvent*.

Metode *steam explosion pretreatment* terhadap komponen kayu yang keras (Shimizu et al., 1998) serta metoda *autohydrolysis* dan perkolasi dengan ammonia, terbukti mampu menghilangkan lignin serta mendapatkan hemiselulosa (Yoon, 1998). Selain itu, *supercritical CO₂* dilaporkan dapat membantu proses hidrolisis dari selulosa sehingga dapat meningkatkan gula pereduksi dari 14,5% menjadi 84,7% terhadap kayu keras dan 12,8 menjadi 27,3% terhadap kayu lunak (Kim & Holtzapple, 2005). Metoda *ammonia fiber expansion* (AFEX) merupakan kombinasi proses fisika (temperatur tinggi disertai dengan tekanan) serta proses kimia (amonia) untuk mendapatkan hasil yang efektif. Perlakuan ini menghasilkan glukosa sekitar 98% (Balan et al., 2009).

Degradasi Material lignoselulosa menggunakan Enzim Selulase

Biodegradasi merupakan proses perubahan substrat oleh mikroorganisme yang melibatkan sejumlah reaksi sehingga dihasilkan produk yang lebih sederhana. Aktivitas merombak komponen substrat membutuhkan nutrisi yang diperoleh dari hasil perombakan. Mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa disebut sebagai mikroorganisme selulolitik yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan ke media pertumbuhan. Enzim selulase dihasilkan untuk mengkatalis proses pemecahan selulosa menjadi glukosa dengan pemutusan ikatan β -1,4-glukosidik yang terdapat pada selulosa. Ambriyanto (2010) menyebutkan bahwa proses perombakan enzimatik terjadi dengan adanya enzim selulase sebagai agen perombak yang bersifat spesifik untuk menghidrolisis ikatan β -(1,4)-glikosidik, rantai selulosa dan derivatnya. Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, sedangkan hidrolisis tidak sempurna akan menghasilkan disakarida yaitu selobiosa. Enzim selulase dapat diaplikasikan untuk meningkatkan kualitas material pada industri pangan, sebagai dekomposer pada bahan organik, meningkatkan nutrisi pada pakan ternak, berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas serta dapat mengurangi dampak negatif dari polusi limbah terhadap lingkungan (Hartanti, 2010). Enzim selulase dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok yaitu endo- β -1,4-glukonase (CMCase, Cx selulase endoselulase), ekso- β -1,4-glukonase (aviselase, selobiohidrolase, C1 selulase), dan β -1,4-glukosidase atau selobiase (Meryandini et al., 2009). Ketiga komponen enzim tersebut bekerjasama dalam menghidrolisis selulosa yang tidak dapat larut menjadi glukosa (Da Silva et al., 2005). Proses degradasi selulosa oleh enzim selulase ditunjukkan pada Gambar 1 yang memperlihatkan tahap-tahap pemecahan selulosa oleh kompleks enzim selulase (endoglukonase, eksoglukonase, dan β -glukosidase). Tahap pertama, enzim endoglukonase menyerang daerah amorf dari selulosa secara acak dan membentuk makin banyak ujung-ujung nonpereduksi yang memudahkan kerja eksoglukonase. Enzim eksoglukonase selanjutnya menghidrolisis daerah kristal dari selulosa dengan membebaskan dua unit glukosa. Kerja sama kedua enzim ini menghasilkan unit-unit sakarida yang lebih kecil yang selanjutnya dihidrolisis oleh β -glukosidase menghasilkan glukosa.

Mikroorganisme seperti bakteri, kapang dan aktinomisetes diketahui dapat menghasilkan selulase. Bakteri yang mampu mendegradasi selulosa disebut sebagai bakteri selulolitik. Beberapa genus bakteri selulolitik adalah *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Acetivibrio*, *Misrobispora*, dan *Streptomyces* yang dapat memproduksi enzim selulase secara efektif (Saratale, Saratale, Chang, Govindwar, & 2011). Bakteri selulolitik memiliki kemampuan menghidrolisis material yang mengandung selulosa. Bakteri selulolitik mendegradasi molekul kompleks pada substrat tidak larut air dengan menggunakan enzim untuk memutuskan ikatan di lokasi yang berbeda di dalam substrat. Bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase sebagai respon terhadap adanya selulosa di lingkungannya. Bakteri aerob dan anaerob khususnya bakteri tanah dapat mendegradasi selulosa dan hemiselulosa, akan tetapi bakteri anaerob seperti *Clostridium* sp. dan *Ruminococcus* sp. berbeda cara degradasinya. Bakteri anaerob menghasilkan multi enzim selulase kompleks yang stabil dan sering disebut dengan selulosom. Jenis bakteri ini dapat bekerja secara sinergi. Multi enzim ini mempunyai aktivitas yang tinggi terhadap selulosa kristal, seperti *Clostridium cellulyticum*, *C. cellulovorans*, *C. josui*, *C. papyrosolvans* dan *C. thermocellum* (Ohara, Karita, Kimura, Sakka, & Ohmiya, 1998). Kapang dari genus *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Melanocarpus*, *Penicillium* dan *Trichoderma* banyak ditemui sebagai penghasil hemiselulase yang memiliki aktivitas selulolitik dan hemiselulolitik yang tinggi (Chandel et al., 2007).



Gambar 1. Tahapan pemecahan selulosa (Karmakar & Ray, 2011)

Material lignoselulosa yang telah diperbaiki kualitasnya akan meningkat nilai nutrisinya. Ikatan lignoselulosa didegradasi menjadi bentuk yang paling sederhana (monomer) sehingga bisa dengan mudah dicerna oleh ikan. Protein yang terkandung dalam material lignoselulosa akan meningkat sehingga mendukung pertumbuhan ikan. Serat kasar yang merupakan zat anti nutrisi akan berkurang, sehingga secara keseluruhan pemanfaatan material lignoselulosa dapat mengurangi penggunaan bahan baku impor dalam formulasi pakan ikan air tawar.

KESIMPULAN

Enzim selulase berperan penting dalam proses degradasi material lignoselulolitik menjadi bahan baku pakan yang dapat dicerna oleh ikan. Proses hidrolisis menggunakan enzim selulase tersebut dioptimalkan dengan perlakuan pendahuluan (*pretreatment*) yang dilakukan sebelumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambriyanto, K. S. (2010). *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumput Gajah (Pennisetum purpureum schaum)*. Surabaya, Indonesia: Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh November.
- Balan, V., Bals, B., Chundawat, S. P. S., Marshall, D., Dale, B. E. (2009). Lignocellulose biomass treatment using AFEX. *Method in Molecular Biology*, 58(1), 61-77.
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 237-259.
- Chandel, A. K., Chan, E. S., Rudravaram, R., Narasu, M. L., Rao, L. V., Ravindra, P. (2007). *Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal*. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(1), 14-32.
- Da Silva, R., Lago, E. S., Merheb, C. W., Machione, M. M., Park, Y. K., Gomes, E. (2005). Production xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus auranticus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3), 235-241.

- Dien, B. S., Jung, H. J. G., Vogel, K. P., Casler, M. D., Lamb, J. F. S., Iten, L., Mitchell, R. B., Sarath, G. (2006). Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass Bioenergy*, 30(1), 880-891.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Kayu; Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi*. Yogyakarta, Indonesia: Gadjah Mada University Press.
- Han, Y., & Chen, H. (2007). Synergism between corn stover protein and cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5), 638-645.
- Hartanti. (2010). *Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Kawah Air Panas Gunung Pancar, Bogor*. Bogor, Indonesia: Skripsi. Departemen Biokimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor
- Hendriks, A. T., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresources Technology*, 100(1), 10-8.
- Huang, G., Shi, J. X., Langrish, T. A. G. (2007). NH₄OH-KOH pulping mechanism and kinetics of rice straw, *Bioresource Technology*, 98(2), 1218-1223.
- Karagoz, S., Bhaskar, T., Muto, A., Sakata, Y., Oshiki, T., Kishimoto, T. (2005). Low temperature catalytic hydrothermal treatment of woody biomass: analysis of liquid products, *Chemical Engineering Journal*, 108(1), 127-137.
- Karmakar, M., & Ray, R. R. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Microbiology*, 6(1), 41-53.
- Koolman, J. 2001. *Atlas Berwarna dan Teks Biokimia*. Jakarta, Indonesia: Penerbit Hipokrates.
- Li, B. Z., Balan, V., Yuan, Y. J., Dale, B. E. (2010). Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment, *Bioresources Technology*, 101(2), 1285-1292.
- Lynd, L. R., Elander, R. T., Wyman, C. E. (1996). Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 57/58, 741- 761.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, N., Rahmania, N., Satria, H. (2009). Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains*, 13, 33-38.
- Mtui, Y. S. (2009). *Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products*. *African Journal of Biotechnology*, 8(8), 1398-1415.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimaraes, P. M., Silva, J. P., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 817-830.
- Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (1998). *Cellulase complex from Ruminococcus albus*. *Annual Report IC Biotechnology*, 21, 358-370.
- Perez, J., Dorado, J. M., Rubia, T., Martinez, J. (2002). *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. *International Microbiology*, 5(1), 53- 63.
- Sanchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(1), 185-194.
- Saratale, G. D., Saratale, R. G., Chang, J. S., Govindwar, S. P. (2011). Fixed – bed decolorization of reactive blue 172 by *Proteus vulgaris* NCIM- 2027 immobilized on *Luffa cylindrica* sponge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(2), 494-503
- Shimizu, K., Sudo, K., Ono, H., Ishihara, M., Fujii, T., Hishiyama, S. (1998). Integrated process for total utilization of wood componen by steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 195-203
- Sun, Y., & Cheng, J. J. (2002). Hydrolysis of lignocellulose materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
- Tengerdy, R. P., & Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substract fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 169-179.
- Yoon, H. H. (1998). Pretreatment of lignocellulosic biomass by autohydrolysis and aqueous ammonia percolation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 15(6), 631-636.

