

**PENGHASILAN EKSO-POLIGALAKTURONASE OLEH *Aspergillus niger*
DARIPADA EKSTRAK PEKTIN DAUN *Nephrolepis biserrata* DALAM
FERMENTASI KEADAAN PEPEJAL**

HALIFAH PAGARRA

UNIVERSITI TEKNOLOGI MALAYSIA

PENGHASILAN EKSO-POLIGALAKTURONASE OLEH *Aspergillus niger*
DARIPADA EKSTRAK PEKTIN DAUN *Nephrolepis biserrata* DALAM
FERMENTASI KEADAAN PEPEJAL

HALIFAH PAGARRA

Tesis ini dikemukakan sebagai memenuhi
syarat penganugerahan ijazah
Doktor Falsafah (Kejuruteraan Bioproses)

Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Tenaga
Universiti Teknologi Malaysia

MEI 2016

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang. Setinggi-tinggi kesyukuran dipanjatkan kepada Allah SWT, kerana dengan limpahan rahmat dan kurnia serta izin-Nya jualah kajian ini dapat disempurnakan.

Saya ingin merakamkan penghargaan dan terima kasih kepada kedua-dua penyelia saya, Dr. Roshanida A. Rahman dan Prof. Dr. Rosli bin Md. Illias atas segala ilmu, tunjuk ajar, bimbingan, nasihat dan dorongan yang diberi sepanjang tempoh penyelidikan ini dijalankan.

Penghargaan ini juga saya tujukan kepada Gubernur Provinsi Sulawesi Selatan yang telah memberikan biasiswa untuk meneruskan pengajian di Malaysia dan kepada juruteknik makmal bioproses, Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Tenaga yang banyak membantu saya iaitu En. Yaakop dan En. Latfi. Ucapan terima kasih yang tidak terhingga ditujukan buat rakan-rakan yang telah banyak memberi sokongan dari segi ilmu dan moral iaitu Rachmawaty, Hartati, Nor Azah, Nurul Jannah, Sabrina, Baizura, Dayana dan Ramdan.

Jutaan terima kasih yang tak terhingga dikirimkan buat ibunda tersayang Intang Daeng Baji dan ayahanda Pagarra Daeng Rumpa yang tidak pernah lupa mendoakan kejayaan dan kebahagiaan anakanda. Penghargaan ini juga buat suami terkasih Abd. Hamid Rani, yang tercinta anak-anakku Firman Hamid Pagarra dan Fadliah, Fajrin Hamid Pagarra dan Rona Wiriyanti, Faidah Hamid Pagarra, cucu-cucuku, sodara-sodaraku dan arwah sodaraku Hasnah Pagarra yang sentiasa memberikan semangat dan kiriman doa.

Akhir sekali, penghargaan dan ucapan terima kasih buat semua pihak yang terlibat secara langsung semasa saya menjalankan penyelidikan dan menulis tesis.

PENGHASILAN EKSO-POLIGALAKTURONASE OLEH *Aspergillus niger*
DARIPADA EKSTRAK PEKTIN DAUN *Nephrolepis biserrata* DALAM
FERMENTASI KEADAAN PEPEJAL

HALIFAH PAGARRA

Tesis ini dikemukakan sebagai memenuhi
syarat penganugerahan ijazah
Doktor Falsafah (Kejuruteraan Bioproses)

Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Tenaga
Universiti Teknologi Malaysia

MEI 2016

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang. Setinggi-tinggi kesyukuran dipanjatkan kepada Allah SWT, kerana dengan limpahan rahmat dan kurnia serta izin-Nya jualah kajian ini dapat disempurnakan.

Saya ingin merakamkan penghargaan dan terima kasih kepada kedua-dua penyelia saya, Dr. Roshanida A. Rahman dan Prof. Dr. Rosli bin Md. Illias atas segala ilmu, tunjuk ajar, bimbingan, nasihat dan dorongan yang diberi sepanjang tempoh penyelidikan ini dijalankan.

Penghargaan ini juga saya tujukan kepada Gubernur Provinsi Sulawesi Selatan yang telah memberikan biasiswa untuk meneruskan pengajian di Malaysia dan kepada juruteknik makmal bioproses, Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Tenaga yang banyak membantu saya iaitu En. Yaakop dan En. Latfi. Ucapan terima kasih yang tidak terhingga ditujukan buat rakan-rakan yang telah banyak memberi sokongan dari segi ilmu dan moral iaitu Rachmawaty, Hartati, Nor Azah, Nurul Jannah, Sabrina, Baizura, Dayana dan Ramdan.

Jutaan terima kasih yang tak terhingga dikirimkan buat ibunda tersayang Intang Daeng Baji dan ayahanda Pagarra Daeng Rumpa yang tidak pernah lupa mendoakan kejayaan dan kebahagiaan anakanda. Penghargaan ini juga buat suami terkasih Abd. Hamid Rani, yang tercinta anak-anakku Firman Hamid Pagarra dan Fadliah, Fajrin Hamid Pagarra dan Rona Wiriyanti, Faidah Hamid Pagarra, cucu-cucuku, sodara-sodaraku dan arwah sodaraku Hasnah Pagarra yang sentiasa memberikan semangat dan kiriman doa.

Akhir sekali, penghargaan dan ucapan terima kasih buat semua pihak yang terlibat secara langsung semasa saya menjalankan penyelidikan dan menulis tesis.

ABSTRAK

Pektinase merupakan enzim yang penting dalam industri makanan dan perubatan. Penghasilan pektinase daripada mikroorganisma secara fermentasi memerlukan pektin sebagai pencetus yang biasanya diperoleh daripada ekstrak sitrus. Namun, keupayaan lignoselulosa dalam penghasilan pektin belum banyak lagi diterokai. Oleh yang demikian, kajian ini dijalankan bagi menghasilkan enzim ekso-poligalakturonase (iaitu salah satu daripada jenis enzim pektinase) daripada *Aspergillus niger* dengan menggunakan pektin yang diekstrak daripada daun *Nephrolepis biserrata* (sejenis tumbuhan paku-pakis) yang boleh didapati dengan banyak di negara-negara tropika dan subtropika. Dalam kajian ini, pengekstrakan daun *Nephrolepis biserrata* telah menunjukkan penghasilan pektin optimum iaitu pada 8.16% (g/g) dengan pH 1.5, masa pengekstrakan pada 76.32 min dan suhu pada 100 °C. Pektin ini dicirikan dan seterusnya dibandingkan dengan pektin sitrus komersil apabila digunakan di dalam fermentasi keadaan pepejal bagi menghasilkan ekso-poligalakturonase daripada *Aspergillus niger*. Selain itu, daun *Nephrolepis biserrata* juga turut dirawat dan digunakan sebagai substrat di samping media fermentasi yang digunakan. Rekabentuk komposit berpusat telah digunakan untuk mengoptimumkan empat pembolehubah signifikan hasil daripada proses penyaringan serta dapat memberi kesan terhadap penghasilan ekso-poligalakturonase. Empat pembolehubah itu termasuk masa pengeraman, suhu, kepekatan pektin dan kelembapan medium. Penghasilan ekso-poligalakturonase yang diperoleh adalah optimum pada 54.64 U/g pada masa pengeraman 120 jam, suhu pada 34 °C, kepekatan pektin 5.0 g/L dan juga 75.62% kandungan kelembapan medium. Bagi pencirian separa ekso-poligalakturonase, suhu dan pH optimum masing-masing diperoleh pada 50 °C dan pH 4.0. Kestabilan suhu aktiviti ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* pula diperolehi pada suhu 40 °C hingga 50 °C sehingga 60 min masa pengeraman enzim. Ekso-poligalakturonase juga stabil pada pH 3 hingga pH 7 selepas 120 min pengeraman, di mana aktiviti relatifnya masih melebihi 70%. Seterusnya, pemalar dan pekali pertumbuhan kinetik diperoleh daripada Model Monod dan persamaan Leudeking Piret dengan nilai $\mu_{\max} = 0.043$ per jam, $K_s = 0.473$ g/L, $Y_{X/S} = 0.149$ mg/g, $Y_{E/S} = 16.43$ U/L dan $Y_{E/X} = 114.4$ U/mg. Nilai kadar spesifik penghasilan enzim pula adalah pada $q_E = 4.79$ U/(mg.h) dan kadar spesifik penggunaan glukosa pada $q_S = 0.289$ g/(mg.h). Oleh yang demikian, boleh disimpulkan bahawa daun *Nephrolepis biserrata* yang mengandungi pektin boleh bertindak sebagai substrat untuk penghasilan ekso-poligalakturonase dalam fermentasi keadaan pepejal oleh *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Pectinase is an important enzyme especially in food and medicinal industries. Production of pectinase from fermentation of microorganisms requires pectin as an inducer, which is usually derived from citrus extracts. However, the ability of lignocellulosic material to produce pectin has not been much explored. Therefore, this study was conducted to produce exo-polygalacturonase enzymes (one of the pectinase enzymes) from *Aspergillus niger* using pectin extracted from the *Nephrolepis biserrata* leaves (a type of fern) which are available in abundance in the tropical and subtropical countries. In this study, the optimum production for the extraction of pectin from *Nephrolepis biserrata* leaves was 8.16% (g/g) with pH of 1.5, extraction time at 76.32 min and temperature at 100 °C. The pectin was further characterized and compared with a commercial pectin when it was used in solid state fermentation to produce exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger*. In addition, the *Nephrolepis biserrata* leaves were also treated and used as substrates in addition to the fermentation media used. The central composite design was used to optimize four significant variables resulted from the screening process that has been analyzed for production of exo-polygalacturonase. The variables included incubation time, temperature, concentration of pectin and moisture content. The optimum exo-polygalacturonase production was obtained at 54.64 U/g with the conditions of the significant variables as 120 h of incubation time, 34 °C, 5.0 g/L of pectin concentration and 75.26% of moisture content. For partial characterization of exo-polygalacturonase, the optimum temperature and pH were found to be 50 °C and pH of 4.0, respectively. Temperature stability of exo-polygalacturonase activity by *Aspergillus niger* was achieved at 40 °C to 50 °C up to 60 min of the incubation time. Exo-polygalacturonase was stable at pH of 3 to pH of 7 after 120 min of incubation, with the relative activity above 70%. Later, the kinetic constants and coefficients were determined from the Monod Model and Leudeking Piret equation with $\mu_{\max} = 0.043$ per hour, $K_s = 0.473$ g/L, $Y_{X/S} = 0.149$ mg/g, $Y_{E/S} = 16.43$ U/L and $Y_{E/X} = 114.4$ U/mg. The value of specific enzyme levels were determined at, $q_E = 4.79$ U/(mg.h) and the specific glucose consumption rate is $q_S = 0.289$ g/(mg.h). Therefore, it can be concluded that *Nephrolepis biserrata* leaves contains pectin can act as a substrate for the production of exo-polygalacturonase in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*.

KANDUNGAN

BAB	TAJUK	HALAMAN
	DEKLARASI	ii
	DEDIKASI	iii
	PENGHARGAAN	iv
	ABSTRAK	v
	ABSTRACT	vi
	KANDUNGAN	vii
	SENARAI JADUAL	xiii
	SENARAI RAJAH	xvii
	SENARAI SINGKATAN	xxi
	SENARAI SIMBOL	xxiii
	SENARAI LAMPIRAN	xxv
1	Pengenalan	1
	1.1 Latar belakang Kajian	1
	1.2 Pernyataan Masalah	4
	1.3 Objektif Kajian	6
	1.4 Skop Kajian	6
2	Kajian Literatur	8
	2.1 Pektinase	8

2.2	Mekanisme Tindakbalas Pektinase	10
2.3	Peranan Mikroorganisma dalam Penghasilan Pektinase	11
2.4	Pektin	13
2.4.1	Struktur Pektin dan Peranannya	15
2.4.2	Pengekstrakan Pektin	19
2.4.3	Sumber Pektin daripada Sumber Tumbuhan	20
2.5	Aplikasi Pektinase	23
2.6	Prarawatan Substrat	24
2.7	Proses Fermentasi bagi Penghasilan Pektinase	27
2.8	Pengoptimuman Proses Penghasilan Pektinase	35
2.8.1	Faktor yang Mempengaruhi Penghasilan Pektinase dalam FKP	36
2.8.1.1	pH	36
2.8.1.2	Masa Pengeraman	37
2.8.1.3	Suhu	37
2.8.1.4	Saiz Inokulum	38
2.8.1.5	Kandungan Kelembapan	39
2.9	Pencirian Separa Pektinase	40
2.10	Kadar Pertumbuhan Mikroorganisma	41
2.11	Model Kinetik Pertumbuhan Mikroorganisma	42
2.12	Ringkasan	49
3	KAEDAH KAJIAN	51
3.1	<i>Nephrolepis biserrata</i> sebagai sumber bahan kajian	51
3.2	Kajian Fraksinasi Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	52
3.3	Pengekstrakan Pektin	52
3.4	Pengoptimuman Pengekstrakan Hasil Pektin	53
3.5	Pencirian Pektin Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	56
3.5.1	Berat Setara	56
3.5.2	Kandungan Bermetoksil	57

3.5.3	Asid Nyahhidrouronik (AUA)	57
3.5.4	Darjah Pengesteran	58
3.5.5	Analisis Kandungan Monosakarida Pektin Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	58
3.6	Prarawatan Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	59
3.6.1	Prarawatan Asid	60
3.6.2	Prarawatan Alkali	60
3.6.3	Prarawatan Autohidrolisis	60
3.7	Mikroorganisma dan Penyelenggaraan	62
3.7.1	Agar Dekstrosa Kentang (PDA)	62
3.7.2	Penyediaan Inokulum	62
3.8	Penghasilan Ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP)	63
3.9	Penentuan Kepekatan Protein	65
3.10	Penentuan Biojisim <i>Aspergillus niger</i>	65
3.11	Penyaringan Pembolehubah yang Mempengaruhi Penghasilan Ekso-poligalakturonase Menggunakan Reka Bentuk Faktorial Dua Peringkat	66
3.12	Pengoptimuman Penghasilan Ekso- poligalakturonasedan biojisim <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	67
3.13	Penghasilan Jenis-jenis Pektinase Lain selain Ekso- poligalakturonase	69
3.13.1	Penghasilan Aktiviti Endo- poligalakturonase	71
3.13.2	Penghasilan Aktiviti Pektin Metil Esterase (PME)	71
3.13.3	Penghasilan Aktiviti Pektin liase	72
3.14	Pencirian Separa Ekso-poligalakturonase	72
3.14.1	Pengenalpastian Suhu Optima dan Kestabilan Suhu	73
3.14.2	Pengenalpastian pH Optima dan	

	Kestabilan pH	74
3.14.3	Penentuan Berat Molekul Ekso-poligalakturonase Menggunakan <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> (SDS-PAGE)	74
3.15	Penentuan Kinetik Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i>	75
3.16	Carta Alir Keseluruhan Ujikaji	76
4	KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	78
4.1	Fraksinasi lignoselulosa daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	78
4.2	Prestasi Pengekstrakan Pektin	79
4.3	Pengoptimuman Hasil Ekstraksi Pektin dengan Rekabentuk Komposit Berpusat (RBKB) dalam Kaedah Gerakbalas Permukaan (KGP)	80
4.3.1	Pembentukan Model Matematik dan Analisa Regresi	81
4.3.2	Kaedah Gerakbalas Permukaan (KGP)	84
4.4	Pencirian Pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	89
4.4.1	Berat Setara	89
4.4.2	Kandungan Metoksil	90
4.4.3	Asid Nyahhidrouronik	90
4.4.4	Darjah Pengesteran	91
4.5	Jumlah Kandungan Monosakarida daripada Pektin Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	92
4.6	Prarawatan Daun <i>Nephrolepis biserrata</i> sebagai Substrat Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> dan Penghasilan Ekso-poligalakturonase	95
4.6.1	Kesan Prarawatan yang Berbeza terhadap Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> bagi Penghasilan Ekso-poligalakturonase	96
4.6.2	Kesan Prarawatan Terhadap Struktur	103

	Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	
4.6.3	Perbandingan Penghasilan Ekso-poligalakturonase dalam Prarawatan Daun dengan Menggunakan Pektin sitrus komersil	107
4.7	Penyaringan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Penghasilan Ekso-poligalakturonase Menggunakan Rekabentuk Faktorial Dua Peringkat	112
4.7.1	Analisis Varian (ANOVA)	114
4.7.2	Analisis Respon – Aktiviti Ekso-poligalakturonase	118
4.7.3	Kesan Faktor Utama dan Interaksi terhadap Penghasilan Ekso-poligalakturonase	120
4.7.4	Kesimpulan Kajian Penyaringan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Penghasilan Ekso-poligalakturonase	124
4.8	Pengoptimuman Penghasilan Ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	125
4.8.1	Pembentukan Model Matematik	126
4.8.2	Kaedah Gerakbalas Permukaan (KGP)	127
4.8.3	Pengoptimuman Ekso-poligalakturonase dan Pengesahan Model Matematik	135
4.9	Pengoptimuman Penghasilan Biojisim oleh <i>Aspergillus Niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	136
4.9.1	Pembentukan Model Matematik	137
4.9.2	Plot Kaedah Tindakbalas Permukaan	140
4.10	Pencirian Separa Ekso-poligalakturonase yang Dihasilkan oleh <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	143
4.10.1	Suhu Optimum dan Kestabilan Suhu bagi	144

	Aktiviti Petinase	
4.10.2	pH Optimum dan Kestabilan pH bagi Aktiviti Ekso-poligalakturonase	147
4.11	Penentuan Berat Molekul Ekso-poligalakturonase	149
4.12	Kadar Pertumbuhan Kinetik <i>Aspergillus niger</i> dan Kadar Penggunaan Substrat dan Penghasilan Ekso- poligalakturonase	153
5	KESIMPULAN	160
5.1	Kesimpulan	160
5.2	Cadangan Kajian Masa Hadapan	161
	RUJUKAN	162
	Lampiran A – H	192 -214

SENARAI JADUAL

NO JADUAL	TAJUK	HALAMAN
2.1	Jenis-jenis Enzim Pektinolitik dan Mod Tindakbalas	9
2.2	Kandungan pektin dalam buah-buahan dan sayur-sayuran yang berbeza	17
2.3	Komposisi kimia pokok <i>Nephrolepis biserrata</i>	23
2.4	Aplikasi Pektinase	26
2.5	Kelebihan dalam penghasilan enzim dengan kaedah Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP)	32
2.6	Penghasilan Pektinase dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP)	33
2.7	Penghasilan Pektinase dalam keadaan Fermentasi Tenggelam (FmT)	34
2.8	Nilai parameter kinetik pertumbuhan kulat dalam fermentasi keadaan pepejal dalam penghasilan enzim dengan menggunakan Model Monod dan persamaan Leudeking-Piret	47
3.1	Nilai pembolehubah berkod dan sebenar bagi pengoptimuman pembolehubah bagi penghasilan pektin daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	53
3.2	Rekabentuk eksperimen bagi penghasilan pektin yang optima dengan menggunakan rekabentuk komposit berpusat (RBKB) bagi tiga pembolehubah (berkod)	55

3.3	Medium fermentasi keadaan pepejal (FKP) bagi penghasilan ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i>	64
3.4	Nilai berkod dan sebenar bagi pembolehubah yang digunakan dalam rekabentuk faktorial dua peringkat	67
3.5	Reka bentuk faktorial 2-peringkat bagi pembolehubah bagi penghasilan aktiviti Ekso-poligalakturonase (U/g) dalam fermentasi FKP.	68
3.6	Nilai pembolehubah bagi pengoptimuman penghasilan aktiviti Ekso-poligalakturonase dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i> dalam fermentasi keadaan pepejal.	69
3.7	Matriks RBKB bagi pengoptimuman penghasilan aktiviti Ekso-poligalakturonase dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i> dalam fermentasi keadaan pepejal	70
4.1	Kandungan Lignoselulosa daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	79
4.2	Hasil ekstraksi pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	80
4.3	Hasil eksperimen dan hasil pektin yang terhasil daripada RBKB yang dijalankan	82
4.4	Analisis Regresi (ANOVA) bagi penghasilan ekstraksi pektin menggunakan RBKB	83
4.5	Kandungan monosakarida pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	94
4.6	Kandungan lignoselulosa daripada substrat yang digunakan dalam penghasilan ekso-poligalakturonase	97
4.7	Kesan prarawatan berbeza daun <i>Nephrolepis biserrata</i> bagi penghasilan ekso-poligalakturonase (U/g) dan Biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf)	101

	dengan menggunakan pektin <i>Nephrolepis biserrata</i>	
4.8	Kesan prarawatan berbeza daun <i>Nephrolepis biserrata</i> bagi aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> dengan menggunakan pektin komersial	108
4.9	Aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim yang terhasil dengan media fermentasi tanpa penambahan sebarang pektin	112
4.10	Aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim yang terhasil dengan media fermentasi tanpa penambahan pektin, penambahan pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i> dan pektin sitrus komersil.	113
4.11	Rekabentuk faktorial dua peringkat bagi pembolehubah yang dikaji dan aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g) sebagai respon	115
4.12	Analisis varian (ANOVA) bagi aktiviti ekso-poligalakturonase menggunakan rekabentuk faktorial dua peringkat	118
4.13	Rekabentuk komposit pusat pembolehubah dengan nilai eksperimen dan model aktiviti ekso-poligalakturonase	128
4.14	Analisis regresi (ANOVA) bagi pengoptimuman faktor pembolehubah bagi penghasilan ekso-poligalakturonase	129
4.15	Perbandingan penggunaan pektin sebagai pencetus dalam penghasilan ekso-poligalakturonase	133
4.16	Rekabentuk komposit pusat dengan nilai eksperimen dan model bagi aktiviti ekso-poligalakturonase	138
4.17	Analisa regresi (ANOVA) bagi penghasilan biojisim <i>Aspergillus niger</i> menggunakan RBKP	139
4.18	Aktiviti jenis-jenis enzim ekso-poligalakturonase	153

	yang dihasilkan daripada mikroorganisma dan substrat yang berbeza	
4.19	Nilai kinetik parameter daripada penghasilan ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i>	158

SENARAI RAJAH

NO RAJAH	TAJUK	HALAMAN
2.1	Morfologi <i>Aspergillus niger</i>	13
2.2	Klasifikasi daripada Substrat Pektik dalam dinding sel dan lamela tengah tisu tumbuhan	14
2.3	Aktiviti pektinase pada substrat pektin	16
2.4	Pokok <i>Nephrolepis biserrata</i>	22
2.5	Pengaruh prarawatan terhadap biojisim lignoselulosa	25
2.6	Perbezaan di antara FKP dan juga FMT	29
2.7	Rajah skematik proses pada skala mikro yang berlaku semasa fermentasi keadaan pepejal (FKP)	30
2.8	Keluk pertumbuhan mikroorganisma	41
2.9	Plot Lineweaver-Burk	44
2.10	Keluk hubungan antara kadar biojisim mikrob dan Penggunaan substrat	45
3.1	Proses pengekstrakan pektin.	54
3.2	Carta alir kerja prarawatan daun <i>Nephrolepis biserrata</i> untuk penghasilan ekso-poligalakturonase dan biojisim oleh <i>Aspergillus niger</i> .	61
3.3	Rekabentuk keseluruhan ujikaji bagi penghasilan ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i> dengan menggunakan daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	77
4.1	Kaedah Gerak balas Permukaan hasil ekstraksi	

	pektin bagi kesan pH dan masa ekstraksi dengan suhu pada 80°C	85
4.2	Kaedah Gerak balas Permukaan hasil pektin bagi kesan pH dan suhu dengan masa ekstraksi pada 90 min	87
4.3	Kaedah Gerakbalas Permukaan hasil pektin bagi kesan masa ekstraksi dan suhu dengan pH 2.0	88
4.4	Hasil kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) bagi penentuan monosakarida yang terkandung dalam pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i> . (1) Xilosa, (2) Ramnosa, (3) Arabinosa, (4) Mannosa dan (5) Galaktosa	92
4.5	Kesan prarawatan terhadap aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim pada masa pengeraman: (a) – (d) dengan menggunakan pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	102
4.6	Mikrograf SEM bagi daun <i>Nephrolepis biserrata</i> , (a) Daun segar, (b) Prarawatan autohidrolisis, dan (c) Daun terfermentasi dalam keadaan pepejal	106
4.7	Kesan prarawatan terhadap aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g) dan biojisim pada masa pengeraman: (a) – (d) dengan menggunakan pektin sitrus komersil	109
4.8	Plot kebarangkalian setengah normal bagi kesan pH (A), masa pengeraman (B), suhu (C), kepekatan pektin (D), saiz inokulum (E) dan kelembapan substrat (F)	119
4.9	Plot kesan utama terhadap aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g) (a) Masa pengeraman (jam), (b) Suhu (°C), (c) Kepekatan pektin (g/L), (d) Kelembapan medium (%)	122
4.10	Plot faktor interaksi yang signifikan antara (a) masa pengeraman – suhu, (b) pH – Kepekatan	

	pektin, (c) dengan Masa Pengeraman – Kelembapan medium, terhadap aktiviti ekso- poligalakturonase	123
4.11	Kaedah Gerakbalas Permukaan pengoptimuman aktiviti ekso-poligalakturonase: kesan masa pengeraman dan suhu	130
4.12	Kaedah Gerakbalas Permukaan pengoptimuman aktiviti ekso-poligalakturonase: kesan kepekatan pektin dan masa pengeraman	132
4.13	Kaedah Gerakbalas Permukaan pengoptimuman aktiviti ekso-poligalakturonase: kesan kelembapan substrat dan masa pengeraman	134
4.14	Kaedah Gerakbalas Permukaan biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf): kesan masa pengeraman (jam) dan suhu (°C).	142
4.15	Kaedah Gerakbalas Permukaan biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf): kesan masa pengeraman (jam) dan kepekatan pektin (g/L)	142
4.16	Kaedah Gerakbalas Permukaan biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf): kesan masa pengeraman (jam) dan kelembapan medium (%)	143
4.17	Aktiviti Relatif ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> pada suhu yang berbeza	145
4.18	Kestabilan suhu ekso-poligalakturonase mentah pada suhu berbeza: 30°C hingga 80°C	146
4.19	Aktiviti Relatif ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> pada pH yang berbeza terhadap suhu optimum 50°C	147
4.20	Kestabilan pH terhadap ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> pada pH berbeza: pH 3 hingga pH 10	149
4.21	Analisis SDS-PAGE terhadap ekso- poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i>	150

- 4.22 Aktiviti daripada jenis-jenis ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* dengan substrat daun *Nephrolepis biserrata* (prawatan autohidrolisis) pada keadaan optimum 152
- 4.23 Hubungan antara kadar pertumbuhan biojisim *Aspergillus niger* dan penggunaan glukosa dalam Fermentasi Keadaan Pepejal pada masa pengeraman 24 jam hingga 192 jam 155
- 4.24 Keluk linear bagi nilai μ_{\max} dan K_s daripada pertumbuhan *Aspergillus niger* dan penggunaan substrat 156
- 4.25 (a) Graf hubungan $(E - E_0)$ melawan $(S_0 - S)$ menentukan pekali $Y_{E/S}$, (b) Graf hubungan $(X - X_0)$ melawan $(S_0 - S)$ menentukan pekali $Y_{X/S}$ dan (c) Graf hubungan $((E - E_0)$ melawan $(X_0 - X)$ menentukan pekali $Y_{E/X}$ 157

SENARAI SINGKATAN

AG	-	Asid Galakturonat
ANOVA	-	Analysis of Variance
AUA	-	Anhydrouronic acid
BSA	-	Bovine Serum Albumin
CO ₂	-	Carbon dioxide
DE	-	Degree Esterification
DNS	-	Dinitrosalicylic acid
FDA	-	Food and Drug Administration
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	Ferus Sulphate Heptayhidrate
FKP	-	Fermentasi Keadaan Pepejal
FmT	-	Fermentasi Tenggelam
G	-	Gas
GAE	-	Gallic Acid Equivalent
GRAS	-	Generally Recognized as Safe
H	-	Haba
HCl	-	Hydrogen Chloride
HM	-	High Methoxyl
H ₂ O	-	Dihydrogen monoxide
HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ SO ₄	-	Sulphuric Acid
KGP	-	Kaedah Gerakbalas Permukaan
KH ₂ PO ₄	-	Potassium Dihydrogen Phosphate
L	-	Liquid
LM	-	Low Methoxyl
M	-	Medium

MeO	-	Methoxyl
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	Magnesium Sulphate Heptahydrate
NaOH	-	Sodium hydroxide
NH ₃	-	Ammonia
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	Ammonium Sulphate
O ₂	-	Oxygen
PAGE	-	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PDA	-	Potato Dextrose Aga
PME	-	Pektin Metil Esterase
PMR	-	Pektin Metoksil Rendah.
PMT	-	Pektin Metoksil Tinggi
RBKB	-	Rekabentuk Komposit Berpusat
Rm	-	Ramnosa
SDS	-	Sodium Dodecyl Sulphate
SEM	-	Scanning Electron Microscopy
T	-	Temperature
TM	-	Tahap Metilasi
TP	-	Tahap Pengesteran
TPA	-	Total Phenolic Acid

SENARAI SIMBOL

μg	-	Mikrogram
μL	-	Mikroliter
μmol	-	Mikromol
$^{\circ}\text{C}$	-	Darjah selsius
g/L	-	Gram per liter
g	-	Gram
v/v	-	Isi padu per isi padu
g/g	-	Gram/gram
kDa	-	Kilo dalton
kg	-	Kilogram
min	-	Minit
ml	-	Mililiter
mm	-	Milimeter
mM	-	Milimolar
P	-	Jumlah ekstrak pektin
B	-	Jumlah awal sampel daun kering
nm	-	Nanometer
OD	-	Ketumpatan optik
psm	-	Putaran seminit
U/g	-	Unit per gram
R^2	-	Pekali regresi
mg/gdsf	-	Miligram per gram berat kering substrat fermentasi
μ	-	Kadar pertumbuhan spesifik
μ_{max}	-	Kadar pertumbuhan maksimum
K_s	-	Malar tepu

S	-	Jumlah Penggunaan Substrat
$Y_{E/S}$	-	Kadar penghasilan enzim terhadap penggunaan substrat
$Y_{E/X}$	-	Kadar penghasilan enzim terhadap pertumbuhan sel
$Y_{X/S}$	-	Kadar penggunaan substrat terhadap pertumbuhan sel
E	-	Jumlah penghasilan enzim
X	-	Jumlah biojisim
ΔX	-	Perubahan jumlah biojisim
ΔE	-	Perubahan jumlah penghasilan enzim
ΔS	-	Perubahan jumlah penggunaan substrat
q_E	-	Kadar penghasilan spesifik
q_S	-	Kadar penggunaan substrat spesifik
$g/(g.h)$	-	Gram per gram dalam jam.
$U/(g.h)$	-	Unit per gram dalam jam
$U/(mg.h)$	-	Unit per miligram dalam jam
mg/mg	-	Miligram per miligram

SENARAI LAMPIRAN

LAMPIRAN	TAJUK	HALAMAN
A	Fraksinasi dan pencirian pektin	192
B	Penghitungan spora menggunakan hemositometer	196
C1	Rekabentuk eksperimen bagi pengoptimuman penghasilan ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i> menggunakan pendekatan Kaedah Komposit Berpusat.	198
C2	Pengiraan Aktiviti Enzim Pektinase	199
C3	Kaedah DNS	200
C4	Kaedah Lowry	202
D	Penentuan Biojisim <i>Aspergillus niger</i> menggunakan kaedah NAG	204
E1	Komposisi Penimbal	207
E2	Penyediaan SDS-PAGE	209
E3	Metodologi kajian bagi pencirian separa daripada ekso-polgalakturonase mentah oleh <i>Aspergillus niger</i>	211
F	Kadar kinetik pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> , penggunaan glukosa dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> dan aktiviti ekso-poligalakturonase	212
G	Surat Maklumat Hasil Identifikasi daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	213
H	Penerbitan	214

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Latar belakang Kajian

Pektinase merupakan salah satu enzim komersial yang terdapat di pasaran dan berfungsi untuk memecahkan pektin yaitu sejenis substrat polisakarida yang terdapat di dalam dinding sel tumbuhan. Enzim ini memecahkan asid poligalakturonik menjadi asid monogalakturonik dengan membuka hubungan glikosidik (Akhter *et al.*, 2011). Pektinase secara umumnya menghidrolisis bahan pektik bergantung kepada keupayaannya bagi penggunaan substrat (pektin dan asid pektik) dan juga mekanisme operasinya (hidrolisis atau trans-eliminasi) (Rezazadeh *et al.*, 2010).

Pada asasnya, pektinase atau enzim pektinase boleh dibahagikan kepada tiga kumpulan yang lebih luas iaitu: i) Protopektinasis yang mengdegradasikan protopektin tidak larut dan meningkatkan polimerisasi pektin larut, ii) Esterasis yang dapat memangkinkan diesterifikasi pektin dengan menyahkan metoksil ester dan iii) Dipolimerasi menjadi pemangkin belahan hidrolitik ikatan glikosidik α -(1-4) dalam asid D-galakturonik bahan pektik (Jayani *et al.*, 2005). Bahan pektin mengandungi pektin dan asid pektik. Rantai utama pektin adalah sebahagiannya metil

esterifikasi-1, 4, D-galakturonan. Dimetilasi pektin dikenali sebagai asid pektik atau asid poligalakturonik (Sieiro *et al.*, 2012).

Pektin merupakan pembolehubah polisakarida kompleks yang diekstrak daripada dinding sel utama tumbuh-tumbuhan (Helena *et al.*, 2005). Pektin mempunyai fungsi dalam pertumbuhan pokok, morfologi, perkembangan dan pertahanan. Pektin terdiri daripada hasil esterifikasi asid D-galakturonik pada rangkaian (1-4) yang mana kumpulan-kumpulan asid di sepanjang rangkaian tersebut, sebahagian besarnya ter-esterifikasi dengan kumpulan metoksil (Ralet *et al.*, 2001). Struktur dan komposisi kimia dan jumlah pektin berbeza di antara tumbuh-tumbuhan dari masa ke semasa dan juga berbeza di bahagian tumbuhan yang berlainan. Ketika buah-buahan ranum, pektin dipecahkan oleh enzim pektinase dan pektin esterase menyebabkan proses di mana buah-buahan menjadi lebih lembut (Srivastava dan Malviya, 2011). Secara umumnya menunjukkan bahawa pektin berfungsi sebagai agen pembentukan gel dan penstabil polimer dalam makanan bagi pelbagai produk khusus makanan selain pelbagai kegunaan dalam bioperubatan. Proses pengekstrakan adalah operasi yang paling penting untuk mendapatkan pektin daripada tisu tumbuhan. Pengekstrakan pektin melibatkan pelbagai peringkat proses fizikal-kimia di mana hidrolisis dan pengekstrakan makromolekul pektin daripada tisu tumbuhan dan kelarutan mereka mengambil masa di bawah pengaruh faktor-faktor yang berbeza, terutamanya pH, masa fermentasi dan suhu (Kliemann *et al.*, 2009).

Pektinase dihasilkan daripada pelbagai jenis mikroorganisma yang menggunakan pektin sebagai sumber karbon (Tariq dan Reyaz, 2012). Terdapat pelbagai sisa pertanian dan agro-industri digunakan sebagai sumber karbon untuk merangsang penghasilan pektinase oleh mikroorganisma (Hannan *et al.*, 2009). Sisa pertanian dan agro-industri ini merupakan bahan semulajadi kompleks yang terdiri daripada tiga komponen utama iaitu hemiselulosa, lignin dan selulosa. Secara umumnya, tiga komponen utama dinding sel tersebut juga dinamakan sebagai lignoselulosa. Contoh-contoh lignoselulosa yang digunakan dalam penghasilan pektin adalah seperti hampas tebu, hampas oren, dedak gandum, bran beras, jerami jagung, bijiran, kulit buah-buahan dan kulit sayur-sayuran (Bansal *et al.*, 2011).

Lignosellulosa daripada sisa pertanian dan agro-industri yang kaya dengan gula dan nutrien ini boleh menyokong pertumbuhan mikroorganisma dan boleh juga menghasilkan pelbagai enzim yang berharga, seperti penghasilan enzim pektinase dalam fermentasi keadaan pepejal (FKP) daripada mikroorganisma (Maller *et al.*, 2012). Selain itu, kajian tentang penghasilan pektinase dengan menggunakan ekstrak pektin daripada sisa pertanian seperti kulit bahan sitrus, daun cincau hijau (*Premna oblongi folia* Merr.), kulit durian (*Durio zibethinus*), kacang soya dan pomase telah dikaji secara meluas (El-Nawawi *et al.*, 1987; Nurdin *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011 dan Lim *et al.*, 2012).

Pelbagai bakteria patogenik-tumbuhan, kulat dan yis dapat menghasilkan enzim pektinase (Patil *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2009). Bakteria seperti *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. dan kulat seperti *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. serta yis *Saccharomyces* dan *Candida* telah dilaporkan mempunyai keupayaan yang tinggi dalam menghasilkan enzim-enzim pektinase (Lang dan Dornenburg, 2000). Walau bagaimanapun, *Aspergillus niger* adalah strain yang biasa digunakan dalam industri penghasilan pektinase (Da Silva *et al.*, 2005). Tambahan pula, *Aspergillus niger* telah diiktiraf sebagai mikroorganisma yang selamat untuk digunakan dalam industri pemprosesan makanan, serta bukan patogenik dan juga bukan toksigenik oleh Pentadbiran Makanan dan Ubat-Ubatan (FDA) US (Sharma, 2012; Schuster *et al.*, 2002; Weihong *et al.*, 2005).

Pada asasnya, *Aspergillus niger* boleh dikultur dengan dua kaedah fermentasi yang berbeza iaitu fermentasi tenggelam (FmT) atau fermentasi keadaan pepejal (FKP), bagi penghasilan pektinase. Perbandingan beberapa laporan penghasilan pektinase antara dua kaedah tersebut menunjukkan bahawa fermentasi keadaan pepejal adalah lebih baik kerana pembentukan produk berlaku pada permukaan hampir ketiadaan air (Martin *et al.*, 2004). Beberapa kajian terdahulu juga telah menunjukkan tentang keupayaan kulat *Aspergillus niger* bagi penghasilan pektinase dengan menggunakan pulpa gula bit, air sisa daripada produksi monosodium glutamat; dedak gandum, hampas tebu, dan kulit oren dalam fermentasi keadaan pepejal (Bay *et al.*, 2004; Alcantara *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2008;

Baladhandayutham *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2011; Vashanti dan Meenakshisundaran, 2012 dan Mrudula *et al.*, 2011). Di samping itu, terdapat juga kajian yang telah dilakukan dalam penghasilan poligalakturonase oleh kulat *Aspergillus awamori* dalam fermentasi keadaan pepejal menggunakan sisa buah-buahan yang berbeza yang kaya dengan pektin seperti epal, kulit pisang, kulit limau (oren), kulit nangka, kulit mangga dan kulit nanas (Padma *et al.*, 2012).

Di antara kajian yang telah dilaporkan sebelum ini hanya melibatkan sumber pektin yang digunakan daripada buah-buahan dan sisa pertanian untuk penghasilan pektinase dan penyelidikan mengenai pengekstrakan pektin serta penghasilan pektinase daripada daun *Nephrolepis biserrata* belum lagi diterokai. *Nephrolepis biserrata* juga dikenali sebagai pakis liar yang tumbuh di bawah pokok sawit dan di lereng-lereng bukit sangat mudah diperolehi di Malaysia dan di negara-negara pertanian yang lain. Kajian daripada Essuman *et al.* (2014) mendapati bahawa tepung daun *Nephrolepis biserrata* mengandungi karbohidrat yang tinggi iaitu sebanyak 43.01% (g/g). Oleh itu, pengekstrakan, pencirian dan pengoptimuman daun *Nephrolepis biserrata* sebagai sumber pektin serta kegunaannya dalam penghasilan ekso-poligalakturonase daripada *Aspergillus niger* dibangunkan di dalam kajian ini.

1.2 Pernyataan Masalah

Penghasilan pektinase daripada sisa agro-industri telah pun mantap dan telah dikaji oleh ramai penyelidik. Selain itu, sumber pektin yang kerap digunakan di dalam penghasilan pektinase adalah terdiri daripada buah-buahan atau bahan buangannya seperti kulit oren dan kulit epal. Sementara itu, di Malaysia, oren dan epal bukanlah merupakan buah-buahan tempatan. Namun, bahan-bahan lignoselulosa boleh didapati dengan banyaknya di Malaysia dan juga di negara-negara tropika yang belum lagi diterokai sepenuhnya. Oleh itu, bahan-bahan lignoselulosa ini boleh dikaji sebagai sumber alternatif bagi penghasilan pektinase secara umumnya dan juga ekso-

poligalakturonase khususnya. Penggunaan bahan lignosellulosa seperti daun *Nephrolepis biserrata* yang dicadangkan dalam kajian ini untuk penghasilan ekso-poligalakturonase dan juga untuk pengekstrakan pektin dipilih kerana kandungan asid amino yang tinggi serta boleh diperolehi dengan mudah.

Kajian awal menunjukkan bahawa daun *Nephrolepis biserrata* mengandungi lignosellulosa yang boleh ditukar menjadi produk yang lebih berharga seperti pektin. Di samping itu, daun *Nephrolepis biserrata* telah digunakan sebagai anti-oksidan dan juga ubat makan terapeutik bagi wanita hamil. Jadi, ia adalah selamat untuk tujuan farmaseutikal dan makanan. Oleh itu, daun *Nephrolepis biserrata* digunakan sebagai substrat dalam kajian ini untuk penghasilan pektinase menggunakan *Aspergillus niger* dalam fermentasi keadaan pepejal. Pektin dari daun *Nephrolepis biserrata* harus terlebih dahulu diekstrak dan parameter juga perlu dioptimumkan. Pektin yang diekstrak ini digunakan untuk penghasilan pektinase dalam proses fermentasi. Kesemua parameter operasi dan juga komposisi media bagi proses fermentasi seperti pH, masa pengeraman, suhu, kepekatan pektin, kandungan kelembapan dan saiz inokulum daripada spora perlu dioptimumkan untuk penghasilan ekso-poligalakturonase. Kajian ini perlu dilaksanakan kerana penggunaan bahan lignoselulosa seperti daun *Nephrolepis biserrata* sebagai sumber karbon boleh menjadi sumber alternatif selain buah-buahan dan sisanya bagi penghasilan pektin dan juga ekso-poligalakturonase.

1.3 Objektif Kajian

Objektif utama kajian ini adalah untuk mengoptimumkan penghasilan ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* dengan menggunakan ekstrak pektin daun *Nephrolepis biserrata* dalam Fermentasi Keadaan Pepejal. Berikut adalah objektif spesifik bagi kajian ini:

1. Mengekstrak pektin daripada daun *Nephrolepis biserrata* dan pengoptimuman parameter yang terlibat dalam proses pengekstrakan.
2. Mengoptimumkan penghasilan ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* dengan menggunakan pektin yang diekstrak daripada daun *Nephrolepis biserrata* dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP).
3. Menentukan pencirian separa ekso-poligalakturonase yang terhasil daripada proses fermentasi yang dijalankan.
4. Menentukan pemalar dan pekali kinetik pertumbuhan bagi *Aspergillus niger* dan ekso-poligalakturonase yang dihasilkan semasa proses fermentasi.

1.4 Skop Kajian

Bagi mencapai objektif kajian ini, skop kajian adalah seperti berikut:

1. Pengekstrakan pektin daripada daun *Nephrolepis biserrata* dengan menggunakan pengekstrakan 'Modified Method' (Rehman *et al.*, 2004) dan pengoptimuman proses parameter dengan menggunakan Rekabentuk komposit berpusat (RBKB).
2. Pengoptimuman penghasilan ekso-poligalakturonase adalah terdiri daripada pH, suhu, masa pengeraman, kepekatan pektin, kandungan kelembapan dan saiz inokulum spora dengan menggunakan Kaedah

Gerakbalas Permukaan (KGP). Penghasilan ekso-poligalakturonase dijalankan dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP) daripada *Aspergillus niger*.

3. Pencirian enzim ekso-poligalakturonase yang dihasilkan adalah terdiri daripada kajian terhadap kesan optimum pH dan suhu ke atas aktiviti enzim, kestabilan pH dan suhu dan juga penentuan berat molekul yang dijalankan melalui kaedah SDS-PAGE.
4. Pemalar dan pekali kinetik pertumbuhan *Aspergillus niger* semasa proses fermentasi dalam penghasilan ekso-poligalakturonase daripada pektin dan substrat daun *Nephrolepis biserrata* ditentukan dengan menggunakan Model Monod dan Persamaan Leudeking Piret.

BAB 2

KAJIAN LITERATUR

2.1 Pektinase

Pektinase (EC 3.2.1.15) adalah sekumpulan enzim yang menguraikan pektin sebagai struktur polisakarida daripada tisu tanaman menjadi molekul sederhana seperti asid galakturonik (Pedrolli *et al.*, 2009). Pektinase atau pektinolitik secara semulajadi adalah dihasilkan oleh tumbuhan, filamen kulat, bakteria dan yis (Maciel *et al.*, 2013). Peranan pektinase yang utama dalam industri jus adalah bagi penjernihan dan pengurangan kelikatan dalam penghasilan jus buah-buahan serta mempunyai pelbagai aplikasi bioteknologi (Tapre dan Jain, 2014).

Berdasarkan mod tindakbalas dan jenis substrat yang digunakan, enzim pektinase atau pektinolitik ini boleh dibahagikan kepada tiga jenis iaitu protopektinase, esterase dan depolimerase. Protopektinase merupakan enzim yang melarutkan protopektin dengan membentuk pektin larut. Esterase pula (terdiri daripada pektin metil esterases dan pektin asetil esterases) adalah enzim yang menyahkan metoksil dan sisa asetil daripada pektin sehingga terbentuknya asid poligalakturonik. Pektin metil esterase atau pektinesterase (EC 3.1.1.11) ini memangkinkan proses nyahesterifikasikan kumpulan pektin bermetoksil dan

membentuk asid pektik dan metanol. Manakala pektin asetil esterase (EC 3.1.1.6) pula menghidrolisis ester asetil pektin bagi membentuk asid pektik dan asetat. Jenis yang ketiga adalah depolimerase yang merupakan enzim pektinase yang memutuskan ikatan α -(1-4) glikosidik antara sisa galakturonik melalui hidrolisis (Poligalakturonase) dan trans-eliminasi (terdiri daripada Pektat liase dan Pektin liase) (Sieiro *et al.*, 2012). Pektat liase ini memotong hujung glikosidik pada asid poligalakturonik dan membentuk hasil tak tepu (α - 4.5-D-galakturonat) melalui reaksi trans-eliminasi dan diklasifikasikan sebagai endo-pektat liase (EC 4.2.2.2) yang bertindak terhadap substrat secara rawak, dan ekso-pektat liase (EC 4.2.2.9) yang menjadi pemangkin pembahagian substrat. Manakala pektin liase pula memangkinkan pembahagian pektin secara rawak pada hujung pengesteran pektin tinggi dan menghasilkan metil oligogalakturonat tak tepu melalui trans-eliminasi dari glikosidik. Sehingga kini, semua pektin liases yang dilaporkan adalah endo-pektin liase (EC 4.2.2.10) (Maciel *et al.*, 2011). Ringkasan bagi jenis-jenis pektinase yang dibincangkan ditunjukkan di dalam Jadual 2.1.

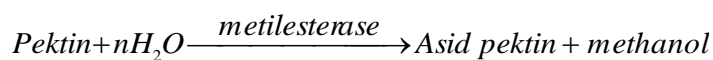
Jadual 2.1 Jenis-jenis Enzim Pektinolitik dan Mod Tindakbalas (Sieiro *et al.*, 2012)

Sistem Pektinolitik	Nombor EC	Substrat utama	Mod tindakbalas	Produk akhir
Protopektinase		Protopektin	Hidrolisis	Pektin
Esterase				
Pektin metil esterase	3.1.1.11	Pektin	Hidrolisis	Asid Pektik+ metanol
Pektin metil esterase	3.1.1.6	Pektin	Hidrolisis	Asid Pektik+ metanol
Depolimerase				
<i>Hidrolisis</i>				
Endo-poligalakturonase	3.2.1.1.5	Asid Pektik	Hidrolisis	Oligo-galakturonat
Ekso-poligalakturonase	3.2.1.6.7	Asid Pektik	Hidrolisis	Mono-galakturonat
<i>Liasis</i>				
Endo-Pektatliase	4.2.2.2	Asid Pektik	Trans-eliminasi	Oligo-galakturonat tak tepu
Ekso-Pektatliase	4.2.2.9	Asid Pektik	Trans-eliminasi	Oligo-galakturonat tak tepu
Endo-pektinliase	4.2.2.10	Asid Pektik	Trans-eliminasi	Oligo-galakturonat tak tepu

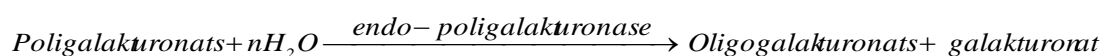
2.2 Mekanisme Tindakbalas Pektinase

Secara umumnya terdapat dua mekanisme tindak balas asas bagi pektinase iaitu hidrolisis dan trans-eliminasi (Jadual 2.1). Mekanisme hidrolisis memerlukan kehadiran air manakala berbeza dengan mekanisme trans-eliminasi yang bertindak balas tanpa kehadiran air serta memberikan produk dengan ikatan berganda.

Pektin metilesterase (EC 3.1.1.11) bertindakbalas ke atas pektin untuk mengeliminasi kumpulan bermetoksil C-6 daripada kumpulan karboksil unit galakturonat melalui tindakbalas hidrolisis. Produk akhir tindakbalas tersebut adalah asid pektin, metanol dan H⁺ daripada pengionan kumpulan karboksil. Pembebasan H⁺ daripada kumpulan karboksil ini akan mengurangkan pH media tindak balas. Oleh itu, aktiviti pektin metilesterase boleh ditentukan dengan pengukuran pH selepas proses tindakbalas (Van, 2006).



Pektin asetilesterase pula menghidrolisis pektin dengan membebaskan kumpulan asetil daripada C2 dan kumpulan hidroksil unit galakturonat daripada C3. Endo-poligalakturonase (EC 3.2.1.15) dan ekso-poligalakturonase (EC 3.2.1.67) seterusnya menghidrolisis ikatan dalaman glikosidik daripada poligalakturonat. Produk tindak balas ini merupakan satu siri poligalakturonat saiz pertengahan (untuk endo-poligalakturonase) atau saiz galakturonat (untuk ekso-poligalakturonase) seperti berikut:



ABSTRAK

Pektinase merupakan enzim yang penting dalam industri makanan dan perubatan. Penghasilan pektinase daripada mikroorganisma secara fermentasi memerlukan pektin sebagai pencetus yang biasanya diperoleh daripada ekstrak sitrus. Namun, keupayaan lignoselulosa dalam penghasilan pektin belum banyak lagi diterokai. Oleh yang demikian, kajian ini dijalankan bagi menghasilkan enzim ekso-poligalakturonase (iaitu salah satu daripada jenis enzim pektinase) daripada *Aspergillus niger* dengan menggunakan pektin yang diekstrak daripada daun *Nephrolepis biserrata* (sejenis tumbuhan paku-pakis) yang boleh didapati dengan banyak di negara-negara tropika dan subtropika. Dalam kajian ini, pengekstrakan daun *Nephrolepis biserrata* telah menunjukkan penghasilan pektin optimum iaitu pada 8.16% (g/g) dengan pH 1.5, masa pengekstrakan pada 76.32 min dan suhu pada 100 °C. Pektin ini dicirikan dan seterusnya dibandingkan dengan pektin sitrus komersil apabila digunakan di dalam fermentasi keadaan pepejal bagi menghasilkan ekso-poligalakturonase daripada *Aspergillus niger*. Selain itu, daun *Nephrolepis biserrata* juga turut dirawat dan digunakan sebagai substrat di samping media fermentasi yang digunakan. Rekabentuk komposit berpusat telah digunakan untuk mengoptimumkan empat pembolehubah signifikan hasil daripada proses penyaringan serta dapat memberi kesan terhadap penghasilan ekso-poligalakturonase. Empat pembolehubah itu termasuk masa pengeraman, suhu, kepekatan pektin dan kelembapan medium. Penghasilan ekso-poligalakturonase yang diperoleh adalah optimum pada 54.64 U/g pada masa pengeraman 120 jam, suhu pada 34 °C, kepekatan pektin 5.0 g/L dan juga 75.62% kandungan kelembapan medium. Bagi pencirian separa ekso-poligalakturonase, suhu dan pH optimum masing-masing diperoleh pada 50 °C dan pH 4.0. Kestabilan suhu aktiviti ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* pula diperolehi pada suhu 40 °C hingga 50 °C sehingga 60 min masa pengeraman enzim. Ekso-poligalakturonase juga stabil pada pH 3 hingga pH 7 selepas 120 min pengeraman, di mana aktiviti relatifnya masih melebihi 70%. Seterusnya, pemalar dan pekali pertumbuhan kinetik diperoleh daripada Model Monod dan persamaan Leudeking Piret dengan nilai $\mu_{\max} = 0.043$ per jam, $K_s = 0.473$ g/L, $Y_{X/S} = 0.149$ mg/g, $Y_{E/S} = 16.43$ U/L dan $Y_{E/X} = 114.4$ U/mg. Nilai kadar spesifik penghasilan enzim pula adalah pada $q_E = 4.79$ U/(mg.h) dan kadar spesifik penggunaan glukosa pada $q_S = 0.289$ g/(mg.h). Oleh yang demikian, boleh disimpulkan bahawa daun *Nephrolepis biserrata* yang mengandungi pektin boleh bertindak sebagai substrat untuk penghasilan ekso-poligalakturonase dalam fermentasi keadaan pepejal oleh *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

Pectinase is an important enzyme especially in food and medicinal industries. Production of pectinase from fermentation of microorganisms requires pectin as an inducer, which is usually derived from citrus extracts. However, the ability of lignocellulosic material to produce pectin has not been much explored. Therefore, this study was conducted to produce exo-polygalacturonase enzymes (one of the pectinase enzymes) from *Aspergillus niger* using pectin extracted from the *Nephrolepis biserrata* leaves (a type of fern) which are available in abundance in the tropical and subtropical countries. In this study, the optimum production for the extraction of pectin from *Nephrolepis biserrata* leaves was 8.16% (g/g) with pH of 1.5, extraction time at 76.32 min and temperature at 100 °C. The pectin was further characterized and compared with a commercial pectin when it was used in solid state fermentation to produce exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger*. In addition, the *Nephrolepis biserrata* leaves were also treated and used as substrates in addition to the fermentation media used. The central composite design was used to optimize four significant variables resulted from the screening process that has been analyzed for production of exo-polygalacturonase. The variables included incubation time, temperature, concentration of pectin and moisture content. The optimum exo-polygalacturonase production was obtained at 54.64 U/g with the conditions of the significant variables as 120 h of incubation time, 34 °C, 5.0 g/L of pectin concentration and 75.26% of moisture content. For partial characterization of exo-polygalacturonase, the optimum temperature and pH were found to be 50 °C and pH of 4.0, respectively. Temperature stability of exo-polygalacturonase activity by *Aspergillus niger* was achieved at 40 °C to 50 °C up to 60 min of the incubation time. Exo-polygalacturonase was stable at pH of 3 to pH of 7 after 120 min of incubation, with the relative activity above 70%. Later, the kinetic constants and coefficients were determined from the Monod Model and Leudeking Piret equation with $\mu_{\max} = 0.043$ per hour, $K_s = 0.473$ g/L, $Y_{X/S} = 0.149$ mg/g, $Y_{E/S} = 16.43$ U/L and $Y_{E/X} = 114.4$ U/mg. The value of specific enzyme levels were determined at, $q_E = 4.79$ U/(mg.h) and the specific glucose consumption rate is $q_S = 0.289$ g/(mg.h). Therefore, it can be concluded that *Nephrolepis biserrata* leaves contains pectin can act as a substrate for the production of exo-polygalacturonase in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*.

KANDUNGAN

BAB	TAJUK	HALAMAN
	DEKLARASI	ii
	DEDIKASI	iii
	PENGHARGAAN	iv
	ABSTRAK	v
	ABSTRACT	vi
	KANDUNGAN	vii
	SENARAI JADUAL	xiii
	SENARAI RAJAH	xvii
	SENARAI SINGKATAN	xxi
	SENARAI SIMBOL	xxiii
	SENARAI LAMPIRAN	xxv
1	Pengenalan	1
	1.1 Latar belakang Kajian	1
	1.2 Pernyataan Masalah	4
	1.3 Objektif Kajian	6
	1.4 Skop Kajian	6
2	Kajian Literatur	8
	2.1 Pektinase	8

2.2	Mekanisme Tindakbalas Pektinase	10
2.3	Peranan Mikroorganisma dalam Penghasilan Pektinase	11
2.4	Pektin	13
2.4.1	Struktur Pektin dan Peranannya	15
2.4.2	Pengekstrakan Pektin	19
2.4.3	Sumber Pektin daripada Sumber Tumbuhan	20
2.5	Aplikasi Pektinase	23
2.6	Prarawatan Substrat	24
2.7	Proses Fermentasi bagi Penghasilan Pektinase	27
2.8	Pengoptimuman Proses Penghasilan Pektinase	35
2.8.1	Faktor yang Mempengaruhi Penghasilan Pektinase dalam FKP	36
2.8.1.1	pH	36
2.8.1.2	Masa Pengeraman	37
2.8.1.3	Suhu	37
2.8.1.4	Saiz Inokulum	38
2.8.1.5	Kandungan Kelembapan	39
2.9	Pencirian Separa Pektinase	40
2.10	Kadar Pertumbuhan Mikroorganisma	41
2.11	Model Kinetik Pertumbuhan Mikroorganisma	42
2.12	Ringkasan	49
3	KAEDAH KAJIAN	51
3.1	<i>Nephrolepis biserrata</i> sebagai sumber bahan kajian	51
3.2	Kajian Fraksinasi Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	52
3.3	Pengekstrakan Pektin	52
3.4	Pengoptimuman Pengekstrakan Hasil Pektin	53
3.5	Pencirian Pektin Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	56
3.5.1	Berat Setara	56
3.5.2	Kandungan Bermetoksil	57

3.5.3	Asid Nyahhidrouonik (AUA)	57
3.5.4	Darjah Pengesteran	58
3.5.5	Analisis Kandungan Monosakarida Pektin Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	58
3.6	Prarawatan Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	59
3.6.1	Prarawatan Asid	60
3.6.2	Prarawatan Alkali	60
3.6.3	Prarawatan Autohidrolisis	60
3.7	Mikroorganisma dan Penyelenggaraan	62
3.7.1	Agar Dekstrosa Kentang (PDA)	62
3.7.2	Penyediaan Inokulum	62
3.8	Penghasilan Ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP)	63
3.9	Penentuan Kepekatan Protein	65
3.10	Penentuan Biojisim <i>Aspergillus niger</i>	65
3.11	Penyaringan Pembolehubah yang Mempengaruhi Penghasilan Ekso-poligalakturonase Menggunakan Reka Bentuk Faktorial Dua Peringkat	66
3.12	Pengoptimuman Penghasilan Ekso- poligalakturonasedan biojisim <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	67
3.13	Penghasilan Jenis-jenis Pektinase Lain selain Ekso- poligalakturonase	69
3.13.1	Penghasilan Aktiviti Endo- poligalakturonase	71
3.13.2	Penghasilan Aktiviti Pektin Metil Esterase (PME)	71
3.13.3	Penghasilan Aktiviti Pektin liase	72
3.14	Pencirian Separa Ekso-poligalakturonase	72
3.14.1	Pengenalpastian Suhu Optima dan Kestabilan Suhu	73
3.14.2	Pengenalpastian pH Optima dan	

	Kestabilan pH	74
3.14.3	Penentuan Berat Molekul Ekso-poligalakturonase Menggunakan <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> (SDS-PAGE)	74
3.15	Penentuan Kinetik Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i>	75
3.16	Carta Alir Keseluruhan Ujikaji	76
4	KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	78
4.1	Fraksinasi lignoselulosa daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	78
4.2	Prestasi Pengekstrakan Pektin	79
4.3	Pengoptimuman Hasil Ekstraksi Pektin dengan Rekabentuk Komposit Berpusat (RBKB) dalam Kaedah Gerakbalas Permukaan (KGP)	80
4.3.1	Pembentukan Model Matematik dan Analisa Regresi	81
4.3.2	Kaedah Gerakbalas Permukaan (KGP)	84
4.4	Pencirian Pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	89
4.4.1	Berat Setara	89
4.4.2	Kandungan Metoksil	90
4.4.3	Asid Nyahhidrouronik	90
4.4.4	Darjah Pengesteran	91
4.5	Jumlah Kandungan Monosakarida daripada Pektin Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	92
4.6	Prarawatan Daun <i>Nephrolepis biserrata</i> sebagai Substrat Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> dan Penghasilan Ekso-poligalakturonase	95
4.6.1	Kesan Prarawatan yang Berbeza terhadap Pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> bagi Penghasilan Ekso-poligalakturonase	96
4.6.2	Kesan Prarawatan Terhadap Struktur	103

	Daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	
4.6.3	Perbandingan Penghasilan Ekso-poligalakturonase dalam Prarawatan Daun dengan Menggunakan Pektin sitrus komersil	107
4.7	Penyaringan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Penghasilan Ekso-poligalakturonase Menggunakan Rekabentuk Faktorial Dua Peringkat	112
4.7.1	Analisis Varian (ANOVA)	114
4.7.2	Analisis Respon – Aktiviti Ekso-poligalakturonase	118
4.7.3	Kesan Faktor Utama dan Interaksi terhadap Penghasilan Ekso-poligalakturonase	120
4.7.4	Kesimpulan Kajian Penyaringan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Penghasilan Ekso-poligalakturonase	124
4.8	Pengoptimuman Penghasilan Ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	125
4.8.1	Pembentukan Model Matematik	126
4.8.2	Kaedah Gerakbalas Permukaan (KGP)	127
4.8.3	Pengoptimuman Ekso-poligalakturonase dan Pengesahan Model Matematik	135
4.9	Pengoptimuman Penghasilan Biojisim oleh <i>Aspergillus Niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	136
4.9.1	Pembentukan Model Matematik	137
4.9.2	Plot Kaedah Tindakbalas Permukaan	140
4.10	Pencirian Separa Ekso-poligalakturonase yang Dihasilkan oleh <i>Aspergillus niger</i> dalam Fermentasi Keadaan Pepejal	143
4.10.1	Suhu Optimum dan Kestabilan Suhu bagi	144

	Aktiviti Petinase	
4.10.2	pH Optimum dan Kestabilan pH bagi Aktiviti Ekso-poligalakturonase	147
4.11	Penentuan Berat Molekul Ekso-poligalakturonase	149
4.12	Kadar Pertumbuhan Kinetik <i>Aspergillus niger</i> dan Kadar Penggunaan Substrat dan Penghasilan Ekso- poligalakturonase	153
5	KESIMPULAN	160
5.1	Kesimpulan	160
5.2	Cadangan Kajian Masa Hadapan	161
	RUJUKAN	162
	Lampiran A – H	192 -214

SENARAI JADUAL

NO JADUAL	TAJUK	HALAMAN
2.1	Jenis-jenis Enzim Pektinolitik dan Mod Tindakbalas	9
2.2	Kandungan pektin dalam buah-buahan dan sayur-sayuran yang berbeza	17
2.3	Komposisi kimia pokok <i>Nephrolepis biserrata</i>	23
2.4	Aplikasi Pektinase	26
2.5	Kelebihan dalam penghasilan enzim dengan kaedah Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP)	32
2.6	Penghasilan Pektinase dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP)	33
2.7	Penghasilan Pektinase dalam keadaan Fermentasi Tenggelam (FmT)	34
2.8	Nilai parameter kinetik pertumbuhan kulat dalam fermentasi keadaan pepejal dalam penghasilan enzim dengan menggunakan Model Monod dan persamaan Leudeking-Piret	47
3.1	Nilai pembolehubah berkod dan sebenar bagi pengoptimuman pembolehubah bagi penghasilan pektin daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	53
3.2	Rekabentuk eksperimen bagi penghasilan pektin yang optima dengan menggunakan rekabentuk komposit berpusat (RBKB) bagi tiga pembolehubah (berkod)	55

3.3	Medium fermentasi keadaan pepejal (FKP) bagi penghasilan ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i>	64
3.4	Nilai berkod dan sebenar bagi pembolehubah yang digunakan dalam rekabentuk faktorial dua peringkat	67
3.5	Reka bentuk faktorial 2-peringkat bagi pembolehubah bagi penghasilan aktiviti Ekso-poligalakturonase (U/g) dalam fermentasi FKP.	68
3.6	Nilai pembolehubah bagi pengoptimuman penghasilan aktiviti Ekso-poligalakturonase dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i> dalam fermentasi keadaan pepejal.	69
3.7	Matriks RBKB bagi pengoptimuman penghasilan aktiviti Ekso-poligalakturonase dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> daripada daun <i>Nephrolepis biserrata</i> dalam fermentasi keadaan pepejal	70
4.1	Kandungan Lignoselulosa daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	79
4.2	Hasil ekstraksi pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	80
4.3	Hasil eksperimen dan hasil pektin yang terhasil daripada RBKB yang dijalankan	82
4.4	Analisis Regresi (ANOVA) bagi penghasilan ekstraksi pektin menggunakan RBKB	83
4.5	Kandungan monosakarida pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	94
4.6	Kandungan lignoselulosa daripada substrat yang digunakan dalam penghasilan ekso-poligalakturonase	97
4.7	Kesan prarawatan berbeza daun <i>Nephrolepis biserrata</i> bagi penghasilan ekso-poligalakturonase (U/g) dan Biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf)	101

	dengan menggunakan pektin <i>Nephrolepis biserrata</i>	
4.8	Kesan prarawatan berbeza daun <i>Nephrolepis biserrata</i> bagi aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> dengan menggunakan pektin komersial	108
4.9	Aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim yang terhasil dengan media fermentasi tanpa penambahan sebarang pektin	112
4.10	Aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim yang terhasil dengan media fermentasi tanpa penambahan pektin, penambahan pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i> dan pektin sitrus komersil.	113
4.11	Rekabentuk faktorial dua peringkat bagi pembolehubah yang dikaji dan aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g) sebagai respon	115
4.12	Analisis varian (ANOVA) bagi aktiviti ekso-poligalakturonase menggunakan rekabentuk faktorial dua peringkat	118
4.13	Rekabentuk komposit pusat pembolehubah dengan nilai eksperimen dan model aktiviti ekso-poligalakturonase	128
4.14	Analisis regresi (ANOVA) bagi pengoptimuman faktor pembolehubah bagi penghasilan ekso-poligalakturonase	129
4.15	Perbandingan penggunaan pektin sebagai pencetus dalam penghasilan ekso-poligalakturonase	133
4.16	Rekabentuk komposit pusat dengan nilai eksperimen dan model bagi aktiviti ekso-poligalakturonase	138
4.17	Analisa regresi (ANOVA) bagi penghasilan biojisim <i>Aspergillus niger</i> menggunakan RBKP	139
4.18	Aktiviti jenis-jenis enzim ekso-poligalakturonase	153

	yang dihasilkan daripada mikroorganisma dan substrat yang berbeza	
4.19	Nilai kinetik parameter daripada penghasilan ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i>	158

SENARAI RAJAH

NO RAJAH	TAJUK	HALAMAN
2.1	Morfologi <i>Aspergillus niger</i>	13
2.2	Klasifikasi daripada Substrat Pektik dalam dinding sel dan lamela tengah tisu tumbuhan	14
2.3	Aktiviti pektinase pada substrat pektin	16
2.4	Pokok <i>Nephrolepis biserrata</i>	22
2.5	Pengaruh prarawatan terhadap biojisim lignoselulosa	25
2.6	Perbezaan di antara FKP dan juga FMT	29
2.7	Rajah skematik proses pada skala mikro yang berlaku semasa fermentasi keadaan pepejal (FKP)	30
2.8	Keluk pertumbuhan mikroorganisma	41
2.9	Plot Lineweaver-Burk	44
2.10	Keluk hubungan antara kadar biojisim mikrob dan Penggunaan substrat	45
3.1	Proses pengekstrakan pektin.	54
3.2	Carta alir kerja prarawatan daun <i>Nephrolepis biserrata</i> untuk penghasilan ekso-poligalakturonase dan biojisim oleh <i>Aspergillus niger</i> .	61
3.3	Rekabentuk keseluruhan ujikaji bagi penghasilan ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i> dengan menggunakan daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	77
4.1	Kaedah Gerak balas Permukaan hasil ekstraksi	

	pektin bagi kesan pH dan masa ekstraksi dengan suhu pada 80°C	85
4.2	Kaedah Gerak balas Permukaan hasil pektin bagi kesan pH dan suhu dengan masa ekstraksi pada 90 min	87
4.3	Kaedah Gerakbalas Permukaan hasil pektin bagi kesan masa ekstraksi dan suhu dengan pH 2.0	88
4.4	Hasil kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) bagi penentuan monosakarida yang terkandung dalam pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i> . (1) Xilosa, (2) Ramnosa, (3) Arabinosa, (4) Mannosa dan (5) Galaktosa	92
4.5	Kesan prarawatan terhadap aktiviti ekso-poligalakturonase dan biojisim pada masa pengeraman: (a) – (d) dengan menggunakan pektin daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	102
4.6	Mikrograf SEM bagi daun <i>Nephrolepis biserrata</i> , (a) Daun segar, (b) Prarawatan autohidrolisis, dan (c) Daun terfermentasi dalam keadaan pepejal	106
4.7	Kesan prarawatan terhadap aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g) dan biojisim pada masa pengeraman: (a) – (d) dengan menggunakan pektin sitrus komersil	109
4.8	Plot kebarangkalian setengah normal bagi kesan pH (A), masa pengeraman (B), suhu (C), kepekatan pektin (D), saiz inokulum (E) dan kelembapan substrat (F)	119
4.9	Plot kesan utama terhadap aktiviti ekso-poligalakturonase (U/g) (a) Masa pengeraman (jam), (b) Suhu (°C), (c) Kepekatan pektin (g/L), (d) Kelembapan medium (%)	122
4.10	Plot faktor interaksi yang signifikan antara (a) masa pengeraman – suhu, (b) pH – Kepekatan	

	pektin, (c) dengan Masa Pengeraman – Kelembapan medium, terhadap aktiviti ekso- poligalakturonase	123
4.11	Kaedah Gerakbalas Permukaan pengoptimuman aktiviti ekso-poligalakturonase: kesan masa pengeraman dan suhu	130
4.12	Kaedah Gerakbalas Permukaan pengoptimuman aktiviti ekso-poligalakturonase: kesan kepekatan pektin dan masa pengeraman	132
4.13	Kaedah Gerakbalas Permukaan pengoptimuman aktiviti ekso-poligalakturonase: kesan kelembapan substrat dan masa pengeraman	134
4.14	Kaedah Gerakbalas Permukaan biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf): kesan masa pengeraman (jam) dan suhu (°C).	142
4.15	Kaedah Gerakbalas Permukaan biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf): kesan masa pengeraman (jam) dan kepekatan pektin (g/L)	142
4.16	Kaedah Gerakbalas Permukaan biojisim <i>Aspergillus niger</i> (mg/gdsf): kesan masa pengeraman (jam) dan kelembapan medium (%)	143
4.17	Aktiviti Relatif ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> pada suhu yang berbeza	145
4.18	Kestabilan suhu ekso-poligalakturonase mentah pada suhu berbeza: 30°C hingga 80°C	146
4.19	Aktiviti Relatif ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> pada pH yang berbeza terhadap suhu optimum 50°C	147
4.20	Kestabilan pH terhadap ekso-poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i> pada pH berbeza: pH 3 hingga pH 10	149
4.21	Analisis SDS-PAGE terhadap ekso- poligalakturonase daripada <i>Aspergillus niger</i>	150

- 4.22 Aktiviti daripada jenis-jenis ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* dengan substrat daun *Nephrolepis biserrata* (prawatan autohidrolisis) pada keadaan optimum 152
- 4.23 Hubungan antara kadar pertumbuhan biojisim *Aspergillus niger* dan penggunaan glukosa dalam Fermentasi Keadaan Pepejal pada masa pengeraman 24 jam hingga 192 jam 155
- 4.24 Keluk linear bagi nilai μ_{\max} dan K_s daripada pertumbuhan *Aspergillus niger* dan penggunaan substrat 156
- 4.25 (a) Graf hubungan $(E - E_0)$ melawan $(S_0 - S)$ menentukan pekali $Y_{E/S}$, (b) Graf hubungan $(X - X_0)$ melawan $(S_0 - S)$ menentukan pekali $Y_{X/S}$ dan (c) Graf hubungan $((E - E_0)$ melawan $(X_0 - X)$ menentukan pekali $Y_{E/X}$ 157

SENARAI SINGKATAN

AG	-	Asid Galakturonat
ANOVA	-	Analysis of Variance
AUA	-	Anhydrouronic acid
BSA	-	Bovine Serum Albumin
CO ₂	-	Carbon dioxide
DE	-	Degree Esterification
DNS	-	Dinitrosalicylic acid
FDA	-	Food and Drug Administration
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	Ferus Sulphate Heptayhidrate
FKP	-	Fermentasi Keadaan Pepejal
FmT	-	Fermentasi Tenggelam
G	-	Gas
GAE	-	Gallic Acid Equivalent
GRAS	-	Generally Recognized as Safe
H	-	Haba
HCl	-	Hydrogen Chloride
HM	-	High Methoxyl
H ₂ O	-	Dihydrogen monoxide
HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ SO ₄	-	Sulphuric Acid
KGP	-	Kaedah Gerakbalas Permukaan
KH ₂ PO ₄	-	Potassium Dihydrogen Phosphate
L	-	Liquid
LM	-	Low Methoxyl
M	-	Medium

MeO	-	Methoxyl
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	Magnesium Sulphate Heptahydrate
NaOH	-	Sodium hydroxide
NH ₃	-	Ammonia
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	Ammonium Sulphate
O ₂	-	Oxygen
PAGE	-	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PDA	-	Potato Dextrose Aga
PME	-	Pektin Metil Esterase
PMR	-	Pektin Metoksil Rendah.
PMT	-	Pektin Metoksil Tinggi
RBKB	-	Rekabentuk Komposit Berpusat
Rm	-	Ramnosa
SDS	-	Sodium Dodecyl Sulphate
SEM	-	Scanning Electron Microscopy
T	-	Temperature
TM	-	Tahap Metilasi
TP	-	Tahap Pengesteran
TPA	-	Total Phenolic Acid

SENARAI SIMBOL

μg	-	Mikrogram
μL	-	Mikroliter
μmol	-	Mikromol
$^{\circ}\text{C}$	-	Darjah selsius
g/L	-	Gram per liter
g	-	Gram
v/v	-	Isi padu per isi padu
g/g	-	Gram/gram
kDa	-	Kilo dalton
kg	-	Kilogram
min	-	Minit
ml	-	Mililiter
mm	-	Milimeter
mM	-	Milimolar
P	-	Jumlah ekstrak pektin
B	-	Jumlah awal sampel daun kering
nm	-	Nanometer
OD	-	Ketumpatan optik
psm	-	Putaran seminit
U/g	-	Unit per gram
R^2	-	Pekali regresi
mg/gdsf	-	Miligram per gram berat kering substrat fermentasi
μ	-	Kadar pertumbuhan spesifik
μmax	-	Kadar pertumbuhan maksimum
K_s	-	Malar tepu

S	-	Jumlah Penggunaan Substrat
$Y_{E/S}$	-	Kadar penghasilan enzim terhadap penggunaan substrat
$Y_{E/X}$	-	Kadar penghasilan enzim terhadap pertumbuhan sel
$Y_{X/S}$	-	Kadar penggunaan substrat terhadap pertumbuhan sel
E	-	Jumlah penghasilan enzim
X	-	Jumlah biojisim
ΔX	-	Perubahan jumlah biojisim
ΔE	-	Perubahan jumlah penghasilan enzim
ΔS	-	Perubahan jumlah penggunaan substrat
q_E	-	Kadar penghasilan spesifik
q_S	-	Kadar penggunaan substrat spesifik
$g/(g.h)$	-	Gram per gram dalam jam.
$U/(g.h)$	-	Unit per gram dalam jam
$U/(mg.h)$	-	Unit per miligram dalam jam
mg/mg	-	Miligram per miligram

SENARAI LAMPIRAN

LAMPIRAN	TAJUK	HALAMAN
A	Fraksinasi dan pencirian pektin	192
B	Penghitungan spora menggunakan hemositometer	196
C1	Rekabentuk eksperimen bagi pengoptimuman penghasilan ekso-poligalakturonase oleh <i>Aspergillus niger</i> menggunakan pendekatan Kaedah Komposit Berpusat.	198
C2	Pengiraan Aktiviti Enzim Pektinase	199
C3	Kaedah DNS	200
C4	Kaedah Lowry	202
D	Penentuan Biojisim <i>Aspergillus niger</i> menggunakan kaedah NAG	204
E1	Komposisi Penimbal	207
E2	Penyediaan SDS-PAGE	209
E3	Metodologi kajian bagi pencirian separa daripada ekso-polgalakturonase mentah oleh <i>Aspergillus niger</i>	211
F	Kadar kinetik pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> , penggunaan glukosa dan biojisim <i>Aspergillus niger</i> dan aktiviti ekso-poligalakturonase	212
G	Surat Maklumat Hasil Identifikasi daun <i>Nephrolepis biserrata</i>	213
H	Penerbitan	214

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Latar belakang Kajian

Pektinase merupakan salah satu enzim komersial yang terdapat di pasaran dan berfungsi untuk memecahkan pektin yaitu sejenis substrat polisakarida yang terdapat di dalam dinding sel tumbuhan. Enzim ini memecahkan asid poligalakturonik menjadi asid monogalakturonik dengan membuka hubungan glikosidik (Akhter *et al.*, 2011). Pektinase secara umumnya menghidrolisis bahan pektik bergantung kepada keupayaannya bagi penggunaan substrat (pektin dan asid pektik) dan juga mekanisme operasinya (hidrolisis atau trans-eliminasi) (Rezazadeh *et al.*, 2010).

Pada asasnya, pektinase atau enzim pektinase boleh dibahagikan kepada tiga kumpulan yang lebih luas iaitu: i) Protopektinasis yang mengdegradasikan protopektin tidak larut dan meningkatkan polimerisasi pektin larut, ii) Esterasis yang dapat memangkinkan diesterifikasi pektin dengan menyahkan metoksil ester dan iii) Dipolimerasi menjadi pemangkin belahan hidrolitik ikatan glikosidik α -(1-4) dalam asid D-galakturonik bahan pektik (Jayani *et al.*, 2005). Bahan pektin mengandungi pektin dan asid pektik. Rantain utama pektin adalah sebahagiannya metil

esterifikasi-1, 4, D-galakturonan. Dimetilasi pektin dikenali sebagai asid pektik atau asid poligalakturonik (Sieiro *et al.*, 2012).

Pektin merupakan pembolehubah polisakarida kompleks yang diekstrak daripada dinding sel utama tumbuh-tumbuhan (Helena *et al.*, 2005). Pektin mempunyai fungsi dalam pertumbuhan pokok, morfologi, perkembangan dan pertahanan. Pektin terdiri daripada hasil esterifikasi asid D-galakturonik pada rangkaian (1-4) yang mana kumpulan-kumpulan asid di sepanjang rangkaian tersebut, sebahagian besarnya ter-esterifikasi dengan kumpulan metoksil (Ralet *et al.*, 2001). Struktur dan komposisi kimia dan jumlah pektin berbeza di antara tumbuh-tumbuhan dari masa ke semasa dan juga berbeza di bahagian tumbuhan yang berlainan. Ketika buah-buahan ranum, pektin dipecahkan oleh enzim pektinase dan pektin esterase menyebabkan proses di mana buah-buahan menjadi lebih lembut (Srivastava dan Malviya, 2011). Secara umumnya menunjukkan bahawa pektin berfungsi sebagai agen pembentukan gel dan penstabil polimer dalam makanan bagi pelbagai produk khusus makanan selain pelbagai kegunaan dalam bioperubatan. Proses pengekstrakan adalah operasi yang paling penting untuk mendapatkan pektin daripada tisu tumbuhan. Pengekstrakan pektin melibatkan pelbagai peringkat proses fizikal-kimia di mana hidrolisis dan pengekstrakan makromolekul pektin daripada tisu tumbuhan dan kelarutan mereka mengambil masa di bawah pengaruh faktor-faktor yang berbeza, terutamanya pH, masa fermentasi dan suhu (Kliemann *et al.*, 2009).

Pektinase dihasilkan daripada pelbagai jenis mikroorganisma yang menggunakan pektin sebagai sumber karbon (Tariq dan Reyaz, 2012). Terdapat pelbagai sisa pertanian dan agro-industri digunakan sebagai sumber karbon untuk merangsang penghasilan pektinase oleh mikroorganisma (Hannan *et al.*, 2009). Sisa pertanian dan agro-industri ini merupakan bahan semulajadi kompleks yang terdiri daripada tiga komponen utama iaitu hemiselulosa, lignin dan selulosa. Secara umumnya, tiga komponen utama dinding sel tersebut juga dinamakan sebagai lignoselulosa. Contoh-contoh lignoselulosa yang digunakan dalam penghasilan pektin adalah seperti hampas tebu, hampas oren, dedak gandum, bran beras, jerami jagung, bijiran, kulit buah-buahan dan kulit sayur-sayuran (Bansal *et al.*, 2011).

Lignosellulosa daripada sisa pertanian dan agro-industri yang kaya dengan gula dan nutrien ini boleh menyokong pertumbuhan mikroorganisma dan boleh juga menghasilkan pelbagai enzim yang berharga, seperti penghasilan enzim pektinase dalam fermentasi keadaan pepejal (FKP) daripada mikroorganisma (Maller *et al.*, 2012). Selain itu, kajian tentang penghasilan pektinase dengan menggunakan ekstrak pektin daripada sisa pertanian seperti kulit bahan sitrus, daun cincau hijau (*Premna oblongi folia* Merr.), kulit durian (*Durio zibethinus*), kacang soya dan pomase telah dikaji secara meluas (El-Nawawi *et al.*, 1987; Nurdin *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011 dan Lim *et al.*, 2012).

Pelbagai bakteria patogenik-tumbuhan, kulat dan yis dapat menghasilkan enzim pektinase (Patil *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2009). Bakteria seperti *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. dan kulat seperti *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. serta yis *Saccharomyces* dan *Candida* telah dilaporkan mempunyai keupayaan yang tinggi dalam menghasilkan enzim-enzim pektinase (Lang dan Dornenburg, 2000). Walau bagaimanapun, *Aspergillus niger* adalah strain yang biasa digunakan dalam industri penghasilan pektinase (Da Silva *et al.*, 2005). Tambahan pula, *Aspergillus niger* telah diiktiraf sebagai mikroorganisma yang selamat untuk digunakan dalam industri pemprosesan makanan, serta bukan patogenik dan juga bukan toksigenik oleh Pentadbiran Makanan dan Ubat-Ubatan (FDA) US (Sharma, 2012; Schuster *et al.*, 2002; Weihong *et al.*, 2005).

Pada asasnya, *Aspergillus niger* boleh dikultur dengan dua kaedah fermentasi yang berbeza iaitu fermentasi tenggelam (FmT) atau fermentasi keadaan pepejal (FKP), bagi penghasilan pektinase. Perbandingan beberapa laporan penghasilan pektinase antara dua kaedah tersebut menunjukkan bahawa fermentasi keadaan pepejal adalah lebih baik kerana pembentukan produk berlaku pada permukaan hampir ketiadaan air (Martin *et al.*, 2004). Beberapa kajian terdahulu juga telah menunjukkan tentang keupayaan kulat *Aspergillus niger* bagi penghasilan pektinase dengan menggunakan pulpa gula bit, air sisa daripada produksi monosodium glutamat; dedak gandum, hampas tebu, dan kulit oren dalam fermentasi keadaan pepejal (Bay *et al.*, 2004; Alcantara *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2008;

Baladhandayutham *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2011; Vashanti dan Meenakshisundaran, 2012 dan Mrudula *et al.*, 2011). Di samping itu, terdapat juga kajian yang telah dilakukan dalam penghasilan poligalakturonase oleh kulat *Aspergillus awamori* dalam fermentasi keadaan pepejal menggunakan sisa buah-buahan yang berbeza yang kaya dengan pektin seperti epal, kulit pisang, kulit limau (oren), kulit nangka, kulit mangga dan kulit nanas (Padma *et al.*, 2012).

Di antara kajian yang telah dilaporkan sebelum ini hanya melibatkan sumber pektin yang digunakan daripada buah-buahan dan sisa pertanian untuk penghasilan pektinase dan penyelidikan mengenai pengekstrakan pektin serta penghasilan pektinase daripada daun *Nephrolepis biserrata* belum lagi diterokai. *Nephrolepis biserrata* juga dikenali sebagai pakis liar yang tumbuh di bawah pokok sawit dan di lereng-lereng bukit sangat mudah diperolehi di Malaysia dan di negara-negara pertanian yang lain. Kajian daripada Essuman *et al.* (2014) mendapati bahawa tepung daun *Nephrolepis biserrata* mengandungi karbohidrat yang tinggi iaitu sebanyak 43.01% (g/g). Oleh itu, pengekstrakan, pencirian dan pengoptimuman daun *Nephrolepis biserrata* sebagai sumber pektin serta kegunaannya dalam penghasilan ekso-poligalakturonase daripada *Aspergillus niger* dibangunkan di dalam kajian ini.

1.2 Pernyataan Masalah

Penghasilan pektinase daripada sisa agro-industri telah pun mantap dan telah dikaji oleh ramai penyelidik. Selain itu, sumber pektin yang kerap digunakan di dalam penghasilan pektinase adalah terdiri daripada buah-buahan atau bahan buangannya seperti kulit oren dan kulit epal. Sementara itu, di Malaysia, oren dan epal bukanlah merupakan buah-buahan tempatan. Namun, bahan-bahan lignoselulosa boleh didapati dengan banyaknya di Malaysia dan juga di negara-negara tropika yang belum lagi diterokai sepenuhnya. Oleh itu, bahan-bahan lignoselulosa ini boleh dikaji sebagai sumber alternatif bagi penghasilan pektinase secara umumnya dan juga ekso-

poligalakturonase khususnya. Penggunaan bahan lignosellulosa seperti daun *Nephrolepis biserrata* yang dicadangkan dalam kajian ini untuk penghasilan ekso-poligalakturonase dan juga untuk pengekstrakan pektin dipilih kerana kandungan asid amino yang tinggi serta boleh diperolehi dengan mudah.

Kajian awal menunjukkan bahawa daun *Nephrolepis biserrata* mengandungi lignosellulosa yang boleh ditukar menjadi produk yang lebih berharga seperti pektin. Di samping itu, daun *Nephrolepis biserrata* telah digunakan sebagai anti-oksidan dan juga ubat makan terapeutik bagi wanita hamil. Jadi, ia adalah selamat untuk tujuan farmaseutikal dan makanan. Oleh itu, daun *Nephrolepis biserrata* digunakan sebagai substrat dalam kajian ini untuk penghasilan pektinase menggunakan *Aspergillus niger* dalam fermentasi keadaan pepejal. Pektin dari daun *Nephrolepis biserrata* harus terlebih dahulu diekstrak dan parameter juga perlu dioptimumkan. Pektin yang diekstrak ini digunakan untuk penghasilan pektinase dalam proses fermentasi. Kesemua parameter operasi dan juga komposisi media bagi proses fermentasi seperti pH, masa pengeraman, suhu, kepekatan pektin, kandungan kelembapan dan saiz inokulum daripada spora perlu dioptimumkan untuk penghasilan ekso-poligalakturonase. Kajian ini perlu dilaksanakan kerana penggunaan bahan lignoselulosa seperti daun *Nephrolepis biserrata* sebagai sumber karbon boleh menjadi sumber alternatif selain buah-buahan dan sisanya bagi penghasilan pektin dan juga ekso-poligalakturonase.

1.3 Objektif Kajian

Objektif utama kajian ini adalah untuk mengoptimumkan penghasilan ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* dengan menggunakan ekstrak pektin daun *Nephrolepis biserrata* dalam Fermentasi Keadaan Pepejal. Berikut adalah objektif spesifik bagi kajian ini:

1. Mengekstrak pektin daripada daun *Nephrolepis biserrata* dan pengoptimuman parameter yang terlibat dalam proses pengekstrakan.
2. Mengoptimumkan penghasilan ekso-poligalakturonase oleh *Aspergillus niger* dengan menggunakan pektin yang diekstrak daripada daun *Nephrolepis biserrata* dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP).
3. Menentukan pencirian separa ekso-poligalakturonase yang terhasil daripada proses fermentasi yang dijalankan.
4. Menentukan pemalar dan pekali kinetik pertumbuhan bagi *Aspergillus niger* dan ekso-poligalakturonase yang dihasilkan semasa proses fermentasi.

1.4 Skop Kajian

Bagi mencapai objektif kajian ini, skop kajian adalah seperti berikut:

1. Pengekstrakan pektin daripada daun *Nephrolepis biserrata* dengan menggunakan pengekstrakan 'Modified Method' (Rehman *et al.*, 2004) dan pengoptimuman proses parameter dengan menggunakan Rekabentuk komposit berpusat (RBKB).
2. Pengoptimuman penghasilan ekso-poligalakturonase adalah terdiri daripada pH, suhu, masa pengeraman, kepekatan pektin, kandungan kelembapan dan saiz inokulum spora dengan menggunakan Kaedah

Gerakbalas Permukaan (KGP). Penghasilan ekso-poligalakturonase dijalankan dalam Fermentasi Keadaan Pepejal (FKP) daripada *Aspergillus niger*.

3. Pencirian enzim ekso-poligalakturonase yang dihasilkan adalah terdiri daripada kajian terhadap kesan optimum pH dan suhu ke atas aktiviti enzim, kestabilan pH dan suhu dan juga penentuan berat molekul yang dijalankan melalui kaedah SDS-PAGE.
4. Pemalar dan pekali kinetik pertumbuhan *Aspergillus niger* semasa proses fermentasi dalam penghasilan ekso-poligalakturonase daripada pektin dan substrat daun *Nephrolepis biserrata* ditentukan dengan menggunakan Model Monod dan Persamaan Leudeking Piret.

(3) Pencirian separa ekso-poligalakturonase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* memberikan suhu dan pH optimum masing-masing pada 50°C dan pH 4. Kestabilan ekso-poligalakturonase menyusut apabila suhu pengeraman meningkat. Walaubagaimanapun, ekso-poligalakturonase didapati stabil pada pH berasid. *Aspergillus niger* tumbuh di dalam substrat pepejal dengan daun *Nephrolepis biserrata* sebagai substrat dan menghasilkan ekso-poligalakturonase melalui pengvisualan pada SDS-PAGE menunjukkan 2 jalur protein dengan berat 35 dan 71. Jenis enzim pektinase yang telah dikaji adalah ekso-poligalakturonase 54.64 U/g, endo-poligalakturonase 32.05 U/g, pektin metil esterase 2.47 U/g dan pektin liase 7.73 U/g.

(4) Kadar pertumbuhan kinetik *Aspergillus niger* dan penggunaan glukosa sebagai substrat menggunakan Model Monod telah membuktikan bahawa penggunaan maksimum glukosa 0.32 g/L dengan biojisim *Aspergillus niger* senilai 0.496 mg/gdsf daripada pengambilan glukosa 5.96 g/L hingga 0.32 g/L pada 24 jam hingga 120 jam masa pengeraman. Melalui persamaan garis linear diperolehinilai $\mu_{\max} = 0.043$ per jam dan $K_s = 0.473$ g/L selama 120 jam masa pengeraman. Nilai-nilai parameter kinetik dan jumlah biojisim mempunyai hubungan signifikan dengan R^2 bersamaan 0.801 dan aktiviti ekso-poligalakturonase optimum pada 54.64 U/g. Data yang diperolehi untuk parameter kinetik semasa penilaian terhadap pengeluaran ekso-poligalakturonase pada FKP oleh *Aspergillus niger*, nilai $Y_{X/S}$ adalah 0.149 mg/g dengan menggunakan glukosa daripada medium sebagai sumber karbon, dengan kepekatan glukosa awal adalah 5.96 g/L menurun hingga 0.32 mg/L dari masa pengeraman 24 jam hingga 120 jam. Hal ini ditakrifkan bahawa penghasilan ekso-poligalakturonase per gram biojisim *Aspergillus niger* telah menggunakan glukosa sebanyak 0.32 g/L. Penggunaan glukosa sebagai substrat untuk pertumbuhan *Aspergillus niger* dengan aktiviti enzima dalam secara berkadar terus, iaitu dengan meningkatnya jumlah biojisim telah meningkatkan aktiviti enzim. Nilai-nilai pekali kinetik bagi penghasilan ekso-poligalakturonase adalah $Y_{E/S} = 16.43$ U/g, $Y_{E/X} = 114.4$ U/mg dan pemalar kinetik pula adalah $q_E = 4.79$ U/(mg.h) dan $q_S = 0.289$ g/(mg.h)

5.2 Cadangan kajian masa hadapan

Beberapa cadangan penting berdasarkan kajian ini disenaraikan untuk kajian pada masa hadapan dengan isu-isu sebagai berikut:

1. Enzim ekso-poligalakturonase mentah yang dihasilkan daripada kajian ini dicadangkan untuk melalui proses penulenan enzim. Kerana enzim biasanya berlaku dalam sel bersama dengan lain-lain protein, asid nukleik, polisakarida dan lipid. Dengan penulenan maka aktiviti enzim ekso-poligalakturonase hubungannya dengan total protein yang hadir boleh ditentukan. Hal ini menjadi sangat penting dan dipertimbangkan bilamana diaplikasikan pada pelbagai industri.
2. Penghasilan ekso-poligalakturonase dalam proses FKP dicadangkan dengan menggunakan pengkulturan campuran di antara kulat dan bakteria. Kelebihan FKP dalam pengkulturan campuran ini dijangka akan meningkatkan sinergisme metabolik di antara mikroorganisma tersebut.
3. Pengekstrakan pektin daripada daun *Nephrolepis biserrata* boleh diterokai dengan pelbagai kaedah pengekstrakan yang lain seperti kaedah alkali dan juga penggunaan ketuhar gelombang mikro.

Pektin yang dihasilkan daripada daun *Nephrolepis biserrata* ini boleh diterokai kegunaannya dalam bidang kesihatan yang lain selain daripada digunakan di dalam penghasilan pektinase.

RUJUKAN

- Abdul-Wahab S. and Abdo J. (2007). Optimization of Multistage Flash Desalination Process by using a Two-Level Factorial Design. *Applied Thermal Engineering*, 27 (2): 413-421.
- Abdul, M.M. (2014). *Design Aspects of Solid State Fermentation*. Doctor of Philosophy. University of Manchester.
- Abdul, S.R., Ibrahim, D. and Pugeg, N.A. (2013). Effect of Cultural Conditions on Lovastatin Production by *Aspergillus niger* SAR I using Combination of Rice Bran and Brown Rice as Substrate. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4(2): 150-156.
- Abdul, S.R., Ibrahim, D. and Che Omar, I. (2012). Mannanase Production by *Aspergillus niger* USM F4 via Solid Substrate Fermentation in a Shallow Tray using Palm Kernel Cake as a Substrate. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(4): 273-279.
- Abid, H., Hussain, A., Ali, S. and Ali, J. (2009). Technique for Optimum Extraction of Pectin from Sour Orange Peels and Its Chemical Evaluation. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*. 31, 459-461.
- Adiele Nora, I. (2012). *Production and Characterization of Pectinase Induced from Aspergillus niger using Pectin Extracted from Pineapple Peels as Carbon Source*. Master of Science. University of Nigeria Nsukka.
- Agbor, V., Cicek, N. Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B. (2011). Biomass Pretreatment: Fundamentals Toward Application. *Biotechnology Advances*, 29: 675–685.
- Ahmed, S.A. and Mostafa, F.A.. (2013). Utilization of Orange Bagasse and Molokhia Stalk for Production of Pectinase Enzyme. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(3): 449 – 456.

- Ahmed, I., Anjum, M. Z., Azhar, M. H., Akram, Z., Tahir, M. N. And Nowrouzi, A.(2015). Bioprocessing of Citrus Waste Peel for Induced Pectinase Production by *Aspergillus niger*; Its Purification and Characterization Q4. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* xxx, 1-7.
- Aina, V.O., Barau, M.M., Mamman, O.A., Zakari, A., Haruna, H., Hauwa, M.S.U. and Baba, Y.A. (2012). Extraction and Characterization of Pectin from Peels of Lemon (*Citrus limon*), Grapefruit (*Citrus paradisi*) and Sweet Orange (*Citrus sinensis*). *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(6): 259-262.
- Akcan, N., Serin, B and Uyarb, F. (2012). Production and Optimization Parameters of Amylases from *Bacillus subtilis* RSKK96 Under Solid State Fermentation. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 26(3): 233–239.
- Akhter, N., Morshed, M.A., Uddin, A., Begum, F., Sultan, T. and Azad, K. A. (2011). Production of Pectinase by *Aspergillus niger* Cultured in Solid-State Media. *International Journal of Boiscience*, 1(1): 33-42.
- Alberto, J.V.C., Colla, E., Magagnin, G., Oliveria, L.S., Vendrucolo, M. and Elita, T.B (2007). Simultaneous Amyloglucosidase and Exo-polygalacturonase Production by *Aspergillus niger* using Solid-state Fermentation. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*. 50(5): 759-766..
- Alcantara, S. R., Almeida, F.A.C. and Silva, F. L. H. (2010). Pectinase Production by Solid-State Fermentation with Cashew Apple Bagasse: Water Activity and Influence of Nitrogen Source. *Chemical Engineering Transactio*, 20: 121-126.
- Alcantara, S.R., Leite, N.J. and Da Silva, F.L.H. (2013). Scale Up of Polygalacturonase Production by Solid State Fermentation Process. *InTech*, 399-420.
- Ali, J., Ahmed, J.S., Assad, Q., Hussain, A., Abid, H., and Gul, F. (2010). Optimization of Pectinase Enzyme Production using Sour Oranges Peel (*Citrus aurantium* L) as Substrate. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.*, 43(3): 126-130.
- Alimardani-Theuil, P.; Gainvors-Claisse., A.; Duchiron, F. (2011). Yeasts: An Attractive Source of Pectinases—From Gene Expression to Potential Applications: A Review. *Process Biochemistry*, 46: 1525-1537.

- Altaf, U., Immanuel, G. And Iftikhar, F. (2015). Extraction and Characterization of Pectin Derived From Papaya (*Carica Papaya* Linn.) Peel, *International Journal of Science, Engineering and Technology*, 3(4): 1-5.
- Altiook Duygu. (2004). *Kinetic Modelling of Lactic Acid Production from Whey*. Master Of Science. Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey.
- Aquilar, C.N., Augur, C., Favela, E.T. and Viniestra, G.G. (2001). Production of Tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in Submerged and Solid State Fermentation: Influence of Glucose and Tannic Acid. *Journal of Industrial Microbiology*, 26: 296-302.
- Aranda, C., Robledo, A., Loera, O., Contreras, J.C.E., odríguez, R. and Cristóbal Noé Aguilar, C.N. (2006). Fungal Invertase Expression in Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 44 (2): 229–233.
- Arijit, D., Sourav, B., Naimisha, R.V. and Sundara Rajan, S.S. (2013). Improved Production and Purification of Pectinase from *Streptomyces* sp. GHBA10 Isolated from Valapattanam Mangrove Habitat, Kerala, India. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(3): 16-22.
- Asif, M.S., Pande, V., and Arif, M. (2012). Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Rhizomucor pusillus* Isolated from Decomposing Orange Peels. *Enzyme Research.*, 01-08.
- Awad, G.E.A., Elnashar, M.M.M. and Danial, E.N. (2011). Optimization of Phytase Production by *Penicillium funiculosum* NRC467 under Solid State Fermentation by Using Full Factorial Design. *World Applied Sciences Journal*, 15 (11): 1635-1644, 2011
- Azad., A.K.M., Ali, M.A., Sorifa, Mst., Jiaur, Md.R. and Ahmed, M. (2014). Isolation and Characterization of Pectin Extracted from Lemon Pomace during Ripening. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2(2), 30-35.
- Azzas, H.H., Murad, H.A., Kholif, A.M., Morsy, T.A., Mansour, A.M. and El-Sayed, H.H. (2013). Pectinase Production Optimization and Its Application in Banana Fiber Degradation. *Egyptian Journal Nutrition and Feed.*, 16(2): 117-125.
- Babayemi, O., Bamikole, M.A. and Omojola, A.B. (2006). Evaluation of the Nutritive Value and Free Choice Intake of Two Aquatic Weeds (*Nephrrolepis biserrata* and *Spirodela polyrhiza*) by West African Dwarf Goats. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 6(1): 15-21.

- Bai, Z.H., Zhang, H.X., Peng, X.W. and Li, B.J. (2005). Pectinase Production by *Aspergillus niger* using Wastewater in Solid State Fermentation Resistance. *Bioresour. Technology*, 95(1): 49-52.
- Baladhandayutham, S. and Viruthagiri, T. (2011). Optimization and Kinetics of Solid-State Fermentation Production of Pectinase by *Aspergillus awamori*. *Indian Journal of Science and Technology*. 3(4): 1758-1764.
- Bansal, J., Malviya, R., Malaviya, T., Bhardway, V. And Kumar, P.S. (2014). Evaluation of Banana Peel Pectin as Excipient in Solid Oral Dosage Form, *Global Journal of Pharmacology*, 8(2): 275-278.
- Bansal, N., Tewari, R., Kishore, J.G., Soni, R. And Kumar, S.S. (2011). A Novel Strain of *Aspergillus niger* Producing a Cocktail of Hydrolytic Depolymerising Enzymes for the Production of Second Generation Biofuels. *Bioresources*, 6(1): 552-569.
- Basha, N.S., Rekha, R., Komala, M. and Ruby, S. (2009). Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme Lasparaginase from Marine Actinomycetes by Solid State and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(4), 353-360
- Bay, Z.H., Zhang, H.X., Qi, H.Y., Peng, X.W. and Li, B.J. (2004). Pectinase Production by *Aspergillus niger* using Wastewater in Solid State Fementation for Eliciting Plant Disease Resistance. *Bioresourse Technology*, 95, 49-52.
- Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. (2011). Optimization of Cultural Conditions Affecting Growth and Improved Bioactive Metabolite Production by a Subsurface *aspergillus* strain tsf 146. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(4): 133-143.
- Biscaro, D.P., and Cano, E.C. (2014). Purification and Characterization of a Unique Pectin Lyase from *Aspergillus giganteus* able to Release Unsaturated Monogalacturonate During Pectin Degradation. *Enzyme Research*, 1-8.
- Biswas, A.K., Yang, W. and Blasiak W. (2011). Steam Pretreatment of Salix to Upgrade Biomass Fuel for Wood Pellet Production. *Fuel Proc. Technol.*, 92(9):1711-1717.
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S.S., Cantero, D. and Webb, C. (2002). Polygalacturonase Production by *Aspergillus awamori* on Wheat in Solid-State Fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 164–169.

- Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S.S. and Webb, C. (2001). Utilization of Whole Wheat Flour for the Production of Extracellular Pectinases by Some Fungal Strains. *Process Biochem.*, 37(5): 497-503.
- Bohórquez, C., Amado-González, E. and Martínez-Reina, M.. (2014). Effect of Pretreatment Dilute Acid - Peroxide on Napier Grass (*pennisetum purpureum schumach*) to Enhance Reducing Sugar Yield by Enzymatic Hydrolysis, *AVANCES Investigación en Ingeniería*, 11(2): 48-55.
- Boonrod, D., Reanma, K. and Niamsup, H. (2006). Extraction and Physicochemical Characteristics of Acid-Soluble Pectin from Raw Papaya (*Carica papaya*) Peel, *Chiang Mai J. Sci.*, 33(1) : 129-135
- Botella, C. De Oryó, I., Webb, C. Cantero, D. And Blandino, A. (2005). Hydrolytic Enzyme Production by *Aspergillus awamori* on Grape Pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 26: 100–106.
- Brodeur Gary. (2013). Developing A Novel Two-Stage Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Bioprocessing. Doctor of Philosophy. The Florida State University.
- Brugnago, R.J, Satyanarayana, K.G., Wypych,.F. and Ramos, L.P. (2011). The Effect of Steam Explosion on the Production of Sugarcane Bagasse/Polyester Composites. *Composites Part A: Appl. Sci. Manufact.*, 42(4):364-370.
- Burana-osot, J., Soonthornchareonnonb, N., Chaidedgumjorna, A., Hosoyamac, S. and Toidac, T. (2010). Determination of Galacturonic Acid from Pomelo Pectin in Term of Galactose by HPAEC with Fluorescence Detection. *Carbohydrate Polymers*, 81: 461–465.
- Carvalho, F., Duarte, L.C. and Gírio, F.M. (2008). Hemicellulose Biorefineries: A Review on Biomass Pretreatments Florbela Carvalho. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67: 849-864
- Canilha, L., Kumar, A.C., Suzane, T.S.M., Antonio, F.F.A., Luiz. W.C.F., Gracias, M.A.F. and Silverio, S.S. (2012). Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-15.
- Carol, S.K.L., Chenyu Du., Koutinas, A., Wang, R. and Colinwebb. (2008). Substrate and Product Inhibition Kinetics in Succinic Acid Production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 41: 128–135.

- Castillo-Israel, K.A.T., Baguio, S.F., Diasanta, M.D.B., Lizardo, R.C.M., Dizon, E.I. and Mejico, M.I.F. (2015). Extraction and Characterization of Pectin from Saba Banana [*Musa 'saba'*(*Musa acuminata* x *Musa balbisiana*)] Peel Wastes: A Preliminary Study. *International Food Research Journal*, 22(1): 202-207.
- Catarina, A., Tomáš B., Pedro, M.F. and José. (2003). Continuous Production of Pectinase by Immobilized Yeast Cells on Spent Grains. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 96(6): 513-518.
- Cauto, S.R. (2008) Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation condition: Review. *Biotechnology Journal* **35**: 859 – 870
- Ceballos, R.M., Batchenkova, N.A., Chan, M.K., Duffing-Romero, A., Nelson, A.E. and Man, S. (2015). Bioethanol: Feedstock Alternatives, Pretreatments, Lignin Chemistry, and the Potential for Green Value-Added Lignin Co-Products. *J.Environmental Analytic Chemical*, 2(5): 1-25.
- Chan, S.Y and Choo, W.S. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry*, 141: 3752–3758.
- Chemat, F., Albert, M.V. and Cravotto. (2012). Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 8615-8627.
- Chen, H.Z. and Qiu, W.H. (2010). Key Technologies for Bioethanol Production from Lignocellulose. *Biotechnol. Adv.*, 28(5):556-562.
- Chen Wong Wai. (2009). *Pullulanase Type I-Assisted Modification of Sago (Metroxylon sago) Starch*. Doctor of Philosophy, Universiti Putra Malaysia.
- Constenla, D., Ponce, A.G. and Lozano, J.E. (2002). Effect of Pomace Drying on Apple Pectin. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 35(3): 216-221.
- Constenla, D. dan Lozano, J.E. (2003). Kinetic Model of Pectin Demethylation. *Latin American Applied Research*, 33: 91-96.
- Cristiane, R.A., Andrade, R.S., Barreto, K.A., Mara, C.F.S. and Cristina, L.L.A. (2012). Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus nige*. *Acta Scientiarum. Technology*, 34(3): 255-260.

- Cristina, L.V., Francisco, R.T. and Lúcia, C.O.P. (2011). Optimization of Nitric Acid-Mediated Extraction of Pectin from Cacao Pod Husks (*Theobroma cacao* L.) using Response Surface Methodology. *Carbohydrate Polymers*, 84:1230–1236.
- Dahiya, N., Rupinder, T., Ram Prakash, T. and Gurinder Singh, H. (2005). Chitinase Production in Solid-State Fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using Statistical Experimental design. *Current Microbiology*, 51: 222-228.
- Dartora, A.B., Bertolin, T.E., Bilibio, D., Silveira, M.M. and Costa, A.V. (2002). Evaluation of Filamentous Fungi and Inducers for the Production of Endo-Polygalacturonase by Solid State Fermentation. *Z. Naturforsch.* 57: 666-670.
- Da Silva, E.M., Simoes, R.R.L, Da Silva, R. And Gomes, E. (2013). Purification and Properties of Polygalacturonase Produced by Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on Solid-State Fermentation. *Enzyme Research*, 1-7.
- Da Silva, E.G., de Fatima, M.B., Medina, Hildrofs, R.P. and Freitas, R.S. (2005). Pectinolytic Enzymes Secreted by Yeast from Tropical Fruits. *FEMS Yeast Research*, 5: 859-865.
- Datta Rathin. (1981). Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-Acid Yield and Conversion of Components. *Biotechnol. Bioen.*, 23(61): 1- 4.
- Debing, J., Peijun, L., Stagnitti, F., Xianzhe, X. And Li, L. (2006). Pectinase Production by Solid Fermentation from *Aspergillus niger* by a New Prescription Experiment, Ecotoxicol. *Environ Safety*, 64: 244–250.
- Demir Handee. (2012). *Production Of Pectinase From Aspergillus Sojae By Solid-State Fermentation*. Doctor of Philosophy. İzmir Institute of Technology.
- Demir, H., Gogus, N., Tari, C., Heerd, D. and Fernadez, M.L. (2012). Optimization of the Process Parameters for the Utilization of Orange Peel to Produce Polygalacturonase by Solid-State Fermentation from an *Aspergillus sojae* Mutant Strain. *Turk J Biol*, 36: 394-404.
- Deshmukh, N., Talkal, R. Kaushik, J, Gaurav, P.S., and Chandra, D.P. . (2012). Production, Purification, Characterization and Comparison of Polygalacturonase from Various Strains of *Aspergillus*. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 1(9): 85-91.
- Devi, W.E., Shukla, R N Bala, K L., Kumar, , A. Mishra, A A. and Yadav, C. (2014). Extraction of Pectin from Citrus Fruit Peel and Its Utilization in

- Preparation of Jelly. *International Journal of Engineering Research and Technology* (IJERT), 3(5): 1925-1932.
- Diaz, G. G., Soriano, J. S., Augur, C., and Viniegra, G. G. (2001). Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26: 271-275.
- Dinu, D.; Nechifor, M.T.; Stoian, G.; Costache, M.; Dinischiotu, A. (2007). Enzymes with New Biochemical Properties in the Pectinolytic Complex Produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal Biotechnology*, 131, 128-137.
- Dors, G. (2006). Hidro'lise Enzima'tica e Biodigesta~o de Efluentes da Indu'stria de Produtos Avi'colas. Florianop'olis, SC. Brazil, Dissertation. University Federal of Santa Catarina.
- Durairajan, B and Siva Sankari, P. (2014). Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Pectinases by *Aspergillus niger*. *J. Pharm. BioSci.*, 2: 50-57.
- Dzogbefia, V.P. and Djokoto, D.K. (2006). Combined effects of enzyme dosage and Reaction time on papaya juice extraction with the aid of Pectic enzymes – a preliminary report. *Journal of Food Biochemistry*, 30:117–122.
- Eisenmenger, M.J. and Reyes-De-Corcuera, J.I. (2009). High Pressure Enhancement of Enzymes: A Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45: 331–347.
- El-Batal., A.I., Osman, E.M. and Ibrahim, A.M.S. (2013). Optimization and characterization of polygalacturonase enzyme produced by gamma irradiated *Penicillium citrinum*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(1): 336-347.
- Elena, M.R.C., Elena, M.S.P. Rojas, M.C. and Mora, R.E. (2014). Structural, Physicochemical and Functional Properties of Industrial Residues of Pineapple (*Ananas Comosus*). *Cellulose Chemistry and Technology*, 48 (7-8): 633-641.
- El-Enshasy, H., Abuoul-Enein, A., Helmy, S. and El Azaly, Y. (2008). Optimization Of The Industrial Production Of Alkaline Protease By *Bacillus licheniformis* In Different Production Scales. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3): 583-593.
- El-Nawawi, S. and Shehata, F.R. (1987). Extraction of Pectin from Egyptian Orange Peel. Factors Affecting the Extraction, *Biological Waste*, 20(4): 281-290.

- El-Shishtawy, R.M., Mohamed, S.A., Asiri, A.M., Gomaa, A.M., Ibrahim, I.H. and Al-Talhi, H.A.. (2014). Solid Fermentation of Wheat Bran for Hydrolytic Enzymes Production and Saccharification Content by a Local Isolate *Bacillus megatherium*. *BMC Biotechnology*,14(29): 1-8.
- Essuman, E. K., Ankar-Brewoo, G. M., Barimah, J. and Ofosu, I. W. (2014). Functional Properties of Protein Isolate from Fern Fronds, *International Food Research Journal*, 21(5): 2085-2090.
- Fernandez, M. L. (2001). *Pectin. Composition, Chemistry, Physicochemical Properties, Food Applications, and Physiological Effects*. University of Connecticut, 1-19.
- Flcrinumlady. (2008). PlantFiles: Macho Fern, Giant Sword Fern. *Nephrolepis biserrata* Macho'.<http://davesgarden.com/guides/pf>
- Flores, T.C.F., Guitierrez, M.R., Revah, S. And Favela, E.T. (2011). Comparative Study For Oxygenases Produced By *Aspergillus Niger*, Atcc 9642, In Solid-State And Submerged Fermentation. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 10(2): 189-207.
- Fontana, R. C., and M. M. Silveira (2012). Influence of Pectin, Glucose, and Ph on the Production of Endo- and Exo-Polygalacturonase by *Aspergillus Oryzae* in Liquid Medium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(4): 683-690
- Fontana, R.C., Suzielle, E.S. and Moura, M. S. (2005). Influence of Pectin and Glucose on Growth and Polygalacturonase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Cultivation, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32: 371–377.
- Food Chemical Codex. 1996. *IV Monographs*. Washington DC: National Academy Press. pp 283.
- Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., Wathelet, B. and Paquot, M. (2007). Effect of Extraction Conditions on the Yield and Purity of Apple Pomace Pectin Precipitated but Not Washed by Alcohol. *Journal of Food Science*, 72(1): 1-9.
- Gautam A. K. and Bhadauria R. (2012). Characterization of *Aspergillus* species Associated with Commercially Stored Triphala Powder. *African Journal of Biotechnology*, 11(104): 16814-16823.
- Georgiev, Y., Ognyanov, M., Yanakieva, I., Kussovski, V. And Kratchanova, M. (2012). Isolation, Characterization and Modification of Citrus Pectins, *J. BioSci. Biotech.*, 1(3): 223-233.

- Gerard, A. M., Paca, J., Kosteekova, A. J., Stiborova, M. and Soccol, C. R. (2006), Simple Models for the Continuous Aerobic Biodegradation of Phenol in a Packed Bed Reactor. *Braz. Arch. Bioly. Technoly*, 49(4): 669-676.
- Ghoshal, G., Banerjee, U.C. and Shivhare, U.S. (2013). Optimization of Cellulase (E.C. 3.2.1: 4) Production Using *Penicillium citrinum* MTCC 9620 in Solid State Fermentation, *British Biotechnology Journal*, 3(4): 509-523
- Gogus Nihan. (2006). *Effect of The Morphology of Aspergillus Sojae On Pectinase Enzyme and The Optimization of Fermentation Conditions*. Degree of Master of Science in Food Engineering. Thesis. Izmir Institute of Technology.
- Gogus, N., Hakguder, B.T., Demir, H., Tari, C., Unluturk, S. and Fernandez, M.L. (2014). Evaluation of Orange Peel, an Industrial Waste, for the Production of *Aspergillus sojae* Polygalacturonase Considering both Morphology and Rheology Effects, *Turkish Journal Biology*, 38: 537-548.
- Gomes E., Guez M A U., Martin N., and Silva R. (2007). Thermostable enzymes: Sources, Production and Industrial Application. *New chemical*; 30 136-145.
- Goycoolea, F.M., and Cardenas, A. (2003). Pectins from *Opuntia* Spp. : A Short Review. *J.PACD*. 17: 29.
- Gummadi S. N. and Panda T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases: A review. *Process Biochem.*, 38:987-996.
- Gummadi S. N., Manoj N. and Kumar D. S.(2007). Structural and biochemical properties of pectinases. In. Polania, J. and MacCabe, A. P. (Eds.). *Industrial Enzymes*. Springer, pp.99-115.
- Guo, B., Zhang, Y., Ha, S.J., Jin, Y.S., Morgenroth, E. (2012). Combined Biomimetic and Inorganic Acids Hydrolysis of Hemicellulose in *Miscanthus* for Bioethanol Production. *Journal of Bioresource Technology*, 99: 6046-6053.
- Hamdy Hossam S. (2005). Purification and Characterization of the Pectin Lyase Produced by *Rhizopus oryzae* Grown on Orange Peels. *Annals of Microbiology*, 55(3): 205 -211.
- Hamdy Hossam S. (2013). Production of Mini-food by *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* using Orange Peels. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(1): 7929-7946.

- Hamid, S., Nawaz, H.B. and Abdul, U.Q. (2008). Enhanced Production of Exo-Polygalacturonase by *Fusarium solani* in Solid-State Fermentation. *Asian Journal of Chemistry*, 20(6): 4273-4281.
- Hannan, A., Bajwa, R. And Latif, Z. (2009). Status of *Aspergillus Niger* Strains For Pectinases Production Potential *Pak. J. Phytopathol.*, 21 (1): 77-82.
- Happi, T.E., Ronkart, S.N., Robert, C., Wathelet, B. and Paquot, M. (2007). Characterisation of Pectins Extracted from Banana Peels (Musa AAA) under Different Conditions using an Experimental Design. *Food Chemistry*, 108: 463–471.
- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L. And Bakker, R. (2010). Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. *Wageningen UR Food and Biobased Research*,
- Hafeez, J., Inam-ur-Rahman., Khuram, H.W.A., Shakel, A. and Arbab, H.S. (2014). Comparative Study of Pectin Extracted from Wastes of Guava and Grapefruit and Its Application in Strawberry Jam. *Global Advance Research Journal of Food and Technology*, 3(6): 161-169.
- Heerd, Doreen., Yegin, Sirma., Tari, Canan and Marcelo Fernandez-Lahore. (2012). Pectinase Enzyme-Complex Production by *Aspergillus spp.* in Solid-State Fermentation: A Comparative Study. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2): 102-110.
- Helene, M.G.C, Nogueira, A., Lúcia, C.O.P. and Wosiacki, G (2012). Characterization of Apple Pectin – A Chromatographic Approach. *InTech*.325-342.
- Helena, M.C.S., Cristina, H.R.F., Waszczyński and 2 Wosiacki, G. (2005). Extraction of Pectin From Apple Pomace. *Brazilian Archieve of Biology and Technology. An International Journal*. 48(2), 259-266.
- Helle, S., Murray, A., Lam, J., Cameron, D. and Duff, S. (2004). Xylose Fermentation by Genetically Modified *Saccharomyces cerevisiae* 259ST in Spent Sulfite Liquor. *Bioresour. Technol.*, 92(2): 163-171.
- Henrique, D.H., Montanari, Q., Malvessi, E. and Moura, M.D.S. (2011). Production and Characterization of Endo-Polygalacturonase from *Aspergillus niger* in Solid-State Fermentation in Double-Surface Bioreactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology* vol, 54(2): 253-258.

- Hernandez, M.C., Carlos, J.C., Lima, N., Texeira, J. And Aguilar, C. (2009). Production of *Aspergillus niger* using Solid State Fermentation. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 3(1): 21-26.
- Hoang, B.T. and Hung, P.V. (2013). Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. *International Food Research Journal*, 20(6): 3269-3274.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. And Beg, QK. (2002). Microbial Alkaline Pectinases and Their Industrial Applications: A Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 409-418.
- Holker, U. and Lenz, J. (2005). Solid-State Fermentation — Are There any Biotechnological Advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8: 301-306.
- Hossein, A. A. (2008). *Pectin and Galacturonic Acid from Citrus Wastes*. Master of Science. University of Borås.
- Howard R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg E.L. and Howard S. (2003). Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12): 602-619
- Ibrahim, D., Hawani, N.S., Sheh, L.H., Ahmad, R. and Welosamy, H. (2013). Pomelo Peels as Alternative Substrate for Extracellular Pectinase Production by *Aspergillus niger* HFM-8. *Malaysian Journal of Microbiology*, 9(4):308-316.
- Isik, F.U., Tari, C. and Gogus. (2007). Solid-State Production of Polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235, *Journal of Biotechnology* 127: 322–334.
- Islam, S., Feroza, B., Alam, A.K.M.R. and Begum, S. (2013). Pectinase production by *Aspergillus niger* isolated from decomposed apple skin. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 48(1): 25-32.
- Ismail, N.S.M., Ramli, N., Hani, N.M. and Meon, Z. (2012). Extraction and Characterization of Pectin from Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) using Various Extraction Conditions. *Sains Malaysiana*, 41(1): 41–45.
- Jacquet, N., Maniet, G., Vanderghem, C., Delvigne, F and Richel, A. (2015). Application of Steam Explosion as Pretreatment on Lignocellulosic Material: A Review. *Industrial and Engineering Chemistry. Research*, 54: 2593–2598
- Jayani, S.R. *et al.* (2005). Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review. *Process Biochemistry*, 40 : 2931–2944.

- Johnson, A.A., Ayodele, S.O., Olanbiwonninu, A. and Christiana, M.O. (2012). Production of Cellulase and Pectinase from Orange Peels by Fungi. *Nature and Science*, 10(5): 107-112.
- Joshi, V.K., Parmar, M. And Rana, N. (2011). Purification and Characteriation of Pectinase Produced from Apple Pomace and Evaluation of Its Efficacy in Juice Extraction and Clarification. *Indian Journal of Natural Product and Resources*, 2(2): 189-197.
- Kapilan Ranganathan. (2015). Solid State Fermentation for Microbial Products : A Review. *Archives of Applied Science Research*, 7 (8):21-25.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R. (2001). Applications of Pectinase in the Commercial Sector: A Review, *Biores.Technol.*,77:215-227
- Kaur, G., Kumar, S and Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresource Technology*, 94: 239–243.
- Kavitha, R. and Umesh-Kumar, S. (2000). Genetic Improvement of *Aspergillus carbonarius* for Pectinase Overproduction During Solid State Growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1): 121-125.
- Kaya, M., Sousa, A.G., Jeanne, M.C., Sorensen, S.O. and Christine, M.R. (2014). Characterization of Citrus Pectin Samples Extracted under Different Conditions: influence of Acid Type and pH Extraction. *Annal of Botany*, 114(6): 1319-1326.
- Kavya, V. and Padmavathi, T. (2009). Optimization of Growth for Xylanase Production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *Polish Journal of Microbiology*, 58(2): 125:130.
- Khan, A. A., Butt, M. S., Randhawa, M. A., Karim, R., Sultan, M. T. and Ahmed, W. (2014). Extraction and Characterization of Pectin from Grapefruit (*Duncan cultivar*) and Its Utilization as Gelling Agent. *International Food Research Journal* 21(6): 2195-2199
- Khan, A., Sahay, S. And Rai, N. (2012). Production and Optimization of Pectinase Enzyme using *Aspergillus niger* Strains in Solid State Fermentation. *Research in Biotechnology*. 3(3):19-25.
- Keera, A., Mouafi, F.E. and Karam, E.A. (2016). Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences Exopolygalacturonase Production from Jojoba mill Solid Waste by *Aspergillus oryzae* FK-923 under Solid State Fermentation.

Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 7(1): 447 – 454.

- Khan, A. A., Butt, M. S., Randhawa, M. A., Karim, R., Sultan, M. T. and Ahmed, W. (2014). Extraction and Characterization of Pectin from Grapefruit (Duncan cultivar) and Its Utilization as Gelling Agent. *International Food Research Journal* 21(6): 2195-2199.
- Khan, M., Nakkeeran, E. and Umesh-Kumar, S. (2013). Potential Application of Pectinase in Developing Functional Foods. *Food Sci. Technol.*, 4:21–34.
- Khuri, A. and Mukhopadhyay. (2010). *Response Surface Methodology*. John Wiley and Sons, Inc. Inc. *WIREs Comp Stat*, 2: 128-149.
- Kliemann, E., Nunes, K.S., Edna, R. Amante, Schwinde., Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C. and Renata D. M. C. Amboni, R.D.M.. (2009). Optimisation of Pectin Acid Extraction from Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using Response Surface Methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 476–483.
- Koh, P.C., Leong, C.M. and Noranizan, M.A. (2014). Microwave-assisted Extraction of Pectin from Jackfruit Rinds using Different Power Levels. *International Food Research Journal*, 21(5): 2091-2097.
- Kong, Q., Chen, F., Wang, X., Li, J., Guan, B. and Lou, X (2011). Optimization of Conditions for Enzymatic Production of ACE Inhibitory Peptides from Collagen. *Food Bioprocess Technology*, 4: 1205-1211.
- Krishna, C. (2005). Solid-state Fermentation Systems-An Overview. *Crit. Rev. Biotechnol*, 25: 1-30.
- Kulkarni, S.G. and Vijayanand, P. (2010). Effect of Extraction Conditions on the Quality Characteristics of Pectin from Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 43: 1026–1031.
- Kumar, V.G., Maheswari, N. And Gupta, A. (2015). Isolation and Screening of Fungal Isolates for Multienzyme Production Through Submerged and Solid State Fermentations. *Journal Bioprocess Biotech*, 5(8): 1-7.
- Kumar, D.P., Thangabalan, B., Rao, P.V. and Yugandhar, N.M. (2010). Production of Pectinase Enzyme by *Aspergillus niger* using *Ficus religiosa* Leaves in Solid-State Fermentation. *IJPT.*, 3(1): 1351-1359.
- Kumar, M.D.J., Saranya, G.M., Suresh, K., Priyadharshini, A.D., Rajakumar and Kalaiichelvan. P.T. (2012). Production and Optimization of Pectinase from

- Bacillus sp.* MFW7 using Cassava Waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2 (3):369-375.
- Kumar, S., Sharma, H.K. and Sarkar, C. (2011). Effect of Substrate and Fermentation Condition of Pectinase and Cellulase Production by *Aspergillus niger* Ncim 548 in Submerged (Smf) and Solid State Fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology*, 20(5):1289-1298.
- Kumar, P. and Suneetha V. (2014). A Cocktail Enzyme – Pectinase from Fruit Industrial Dump Sites: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2): 152 -158.
- Kumar, P.,Barrett, D.M., Delwiche M.J. and Stroeve, P.(2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, pp. 3713–3729.
- Kumar, P.R., Saritha N , Subramanian, P.(2008). Production of Pectin Lyase by Solid State Fermentation of Sugarcane Bagasse using *Aspergillus niger*. *Advanced Biotechnology*, 30-33.
- Kumar, R.S., Nayagi, Y.A.P.P. and Afandi, A. (2013). Optimized Extraction Condition and Characterization of Pectin from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*).*Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, 1(2): 1-11.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lang, C. and Dornenburg, H. (2000). Perspectives in the Biological Function and Technological Application of Polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotchnology*, 53:366-375.
- Lerotholi, L., Carsky, M. And Ikhu Omoregbe, D.I.O. (2012). A Study of the Extraction of Pectin from Dried Lemon Peels. *Advanced Materials Research*, 367:311-318.
- Li, J., Gellerstedt, G. and Toven, K. (2009). Steam Explosion Lignins; Their Extraction, Structure and Potential as Feedstock for Biodiesel and Chemicals. *Bioresour. Technol.*,100(9):2556-256.1
- Lim, J., Yoo, J., Ko, S and Lee, S. (2012). Extraction and Characterization of Pectin from Yuza (*Citrus junos*) Pomace:A Comparison of Conventional-Chemical and Combined PhysicaleEnzymatic Extractions. *Food Hydrocolloids*, 29:160-165

- Liu, M.D., Guan, R.F., Dai, X.J., Bai, L.F. and Pan, L. (2012). Optimization of Solid State Fermentation for Acidophilic Pectinase by *Aspergillus niger* JL-15 using RSM and Oligogalacturonate Preparation. *American Journal of Food Technology*, 7(11):656-667.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265—275.
- Lucia Amanda Perruzza (2010). Exploring Pretreatment Methods and Enzymatic Hydrolysis of Oat Hulls.. Master of Scien. Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry University of Toronto.
- Maciel M, Ottoni C, Santos C, Lima N, Moreira K and Souza-Motta C. (2013). Production of Polygalacturonases by *Aspergillus* Section Nigri Strains in Fixed Bed Reactor. *Molecules* 18:1660 – 1671.
- Maciel, M. H. C., Herculano, P. N., Porto, T.S., Teixeira, M. F. S., Moreira, K. A. and Souza, C. M. (2011). Production and Partial Characterization of Pectinases from Forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. *African Journal of Biotechnology*, 10(13):2469-2475.
- Madhanasundareswari, K and Jeyachitra, K. (2015). Production and Optimization of growth Conditions For Invertase Enzyme By *Aspergillus* In Solid State Fermentation (SSF) using Carrot Peel as Substrate. *Scrutiny International Research Journal of Agriculture, Plant Biotechnology and Bio Products*, 2(1): 16-22.
- Maghsoodi, V. and Yaghmaei, S. (2010). Comparison of Solid Substrate and Submerged Fermentation for Chitosan Production by *Aspergillus niger*. *Transaction C. Chemistry and Chemical Engineering*, 17 : 153-157.
- Mahesh, N., Vivek, R., Arunkumar, M. And Balakumar, S. (2014). Statistical Designing of Enriched Pectin Extract Medium for The Enhanced Production of Pectinase by *Aspergillus Niger*. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 6(1): 666-672.
- Malan, D.F. and Neuba, D.F.R. (2011). Traditional Practices and Medicinal Plants Use during Pregnancy by Anyi-Ndenye Women (Eastern Côte d'Ivoire). *African Journal of Reproductive Health*, 15(1):85-93.
- Maller, A., da Silva, T.M., Damasion, A. R. L., Reis, V. R. A., Jorge, M. L. T. And Polizeli, M. (2012). Production of Pectin Lyase by *Aspergillus niveus* under Submerged and Solid State Fermentations Using Agro-Industrial Residues as

- Carbon Sources. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)*. 3(1): 029-035.
- Malvesi, E. and Moura, M.S. (2004). Influence of Medium Composition and pH on the Production of Polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian archives of Biology and technology*, 47(5): 693-702.
- Malviya, R., Srivasta, P, Bansal, M. And Kumar, P. S. (2010). Mango Peel Pectin as a Superdisintegrating Agent. *Journal os Scientific and Industrial Research*, 69: 688-690.
- Mamma, D., Kourtoglou, E. And Christokopoulos, P. (2007). Fungal Multienzyme Production on Industrial By-Products of the Citrus-Processing Industry, *Bioresource Technology* 99: 2373–2383.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, U.C. (2005). Review Article: Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*: 1(2): 1-9.
- Marcon, M. V., Vriesmann, L. C., Wosiacki, G., Beleski-Carneiro, E. and Petkowicz, C.L. (2005). Pectins from Apple Pomace. *Polímeros* 15:127-129.
- Martin, N., Regina, S.S, Silva, R. and Gomes, E. (2004). Pectinase Production by Fungal Strains in Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(5):813-819.
- Marry, M., McCann, M.C., Kolpak, F., White, A.R., Stacey, N.J. and Roberts, K. (2000). Extraction of pectic polysaccharides from sugars-beet cell wals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:17 – 28.
- Merali, Z., Collins, S.R.A., Elliston, A., Wilson, D.R., Käsper, A. and Waldron, K.W. (2015). Characterization of Cell Wall Components of Wheat Bran following Hydrothermal Pretreatment and Fractionation. *Biotechnology for Biofuels*, 8(23): 2-13.
- Miceli-Garcia, L.G. (2014). *Pectin from Apple Pomace: Extraction, Characterization, and Utilization in Encapsulating Alpha-Tocopherol Acetate*. Master of Science. University of Nebraska.
- Mitchell, D.A., de Lima Luz, L.F. and Krieger, N. (2011) *Bioreactors for solid-state fermentation*. **In:** Comprehensive Biotechnology, Second ed. Edited by: Moo-Yong, M. Elsevier, **2**: 347 – 360
- Mitchell, D.A., Krieger, N. and Berovi, M. (Eds). (2006). *Solid State Fermentation. Bioreactor*. Springer-Verlag, Berlin.

- Miller., G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chemical*, 1: 426-428.
- Mohnen, D. (2008). Pectin Structure and Biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:266–277.
- Mohsen, S.M., Bazaraa, W.A. and Doukani, K. (2009). Purification and Characterization of *Aspergillus niger* U-86 Polygalacturonase and Its use in Clarification of Pomegranate and Grape Juices. *4th Conference on Recent Technologies in Agriculture*, 805 – 817.
- Mojeed Oyewale Oladapo. (2013). Optimization of Growth and Amylase Production by *Aspergillus flavus* Grown on Some Agricultural Raw Materials in Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(5): 427-432
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*. 5th Edition, John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Morris G.A., Jose´ Garcia, J.T., Ortegab, A., Castile, J. Alan Smith, A. and Harding, S.E. (2008). Molecular Flexibility of Citrus Pectins by Combined Sedimentation and Viscosity Analysis. *Food Hydrocolloids*, 22: 1435–1442.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. And Ladisch, M. (2005). Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 96: 673–686.
- Motwani, D.R., Meshram ,V.G. and Jambhulkar, V.S. (2013). Partial Characterization of Pectinase Produced by *Aspergillus niger* Grown on Wheat Bran. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(12): 34-365.5
- Moyoa, S., Gashea, B.A., E.K. Collisona, E.K. and Mpuchane, S. (2003). Optimising Growth Conditions for the Pectinolytic Activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using Response Surface Methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 87– 100.
- Mrudula, S. and Anithraraj, R. (2011). Pectinase Production in Solid-State Fermentation by *Aspergillus niger* Using Orange Peel as Substrate. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(2):64-71.
- Mussato, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., and Teixeira, J.A. (2012). Use of Agro-Industrial Wastes in Solid State Fermentation Processes. In: Kuan-Yeow Show and Xinxin Guo. *Industrial Waste*. InTech., 121-140. Croatia. (Ed).126-140.

- Myers, R. H., Montgomery, D. C. and Anderson-Cook, C. M. (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments*. 3rd edn. John Wiley and Sons, Inc., New Jersey.
- Myoung, J.L., Shi, J., Venditi, R.A. and Jameel, H. (2008). Autohydrolysis Pretreatment of Coastal Bermuda Grass for Increased Enzyme Hydrolysis. *BioResources Tecnology*, 100(24): 6434-6441.
- Nigam, P.S. and Pandey, A. (2009) *Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues*. **In:** Biotechnology for agro-industrial residues utilisation, Edited by: Nigam, P.S. and Pandey, A. Springer Science + Business Media B.V, 197 – 221
- Nikolic M. V., Mojovic L. (2007). Hydrolysis of Apple Pectin by the Coordinated Activity of Pectic Enzymes. *Food Chemistry*, 101(1): 1-9.
- Nikzad, M., Movagharnejad, K., Najafpour, G.D. and Talebnia, F. (2013). Comparative Studies on the Effect of Pretreatment of Rice Husk on Enzymatic Digestibility and Bioethanol Production. *IJE TRANSACTIONS B: Applications*, 26(5): 455-464
- Nirmaladevi, D., Anilkumar, M. and C. Sriniva, C.S. (2014). Production and Characterization of Exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(1): 666-675.
- Niture, S. K. and Pant, A. (2004). Purification and Biochemical Characterization of Polygalacturonase II Produced in Semi-Solid Medium by a Strain of *Fusarium moniliforme*, *Microbiological Research*, 159: 305–314.
- Norsyabilah, R., Sabiha, S.H., Nor Suhaila, M. H., Noraishah, A. and Siti, A.A.K. (2013). Subcritical Water Extraction Of Monosaccharides From Oil Palm Fronds Hemicelluloses). *The Malaysian Journal Of Analytical Sciences*, 17(2): 272 – 275.
- Nurdin, S.U., Zuidar, A.Z. and Suharyono. (2005). Dried Extract from Green Cincau Leaves as Potential Fibre Sources for Foodenrichment. *African Crop Science Conference Proceedings*, 7:655-658.
- Okafor, U.A., Okochi, V.I., Nwodo, S.C., Ebuehi, T. And Onygame, B.M.O. (2010). Pectinolytic Activity of Wild-Type Filamentous Fungi Fermented on agro-wastes. *African Journal of Microbiology Research*, 4(24): 2729-2734.

- Okpokwasili, G.C. and Nweke, C.O. (2005). Microbial Growth and Substrate Utilization Kinetics. *African Journal of Biotechnology*, 5(4): 305-317.
- Olsson, L., Christensen, T.M.I.E., Hansen, K.P. and Palmqvist, E.A. (2003). Influence of The Carbon Source on Production of Cellulases, Hemicellulases and Pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 612–619.
- Omojola A. B., Uzoho U. and Fagbuaro S. S. (2012). Nutritive Value and Potential of Aquatic Plant (*Nephrolepis Biserrata*-Schott) as Feed Resource for Small Ruminant. *J Anim Sci Adv*, 2(9): 749-754.
- Padma, P.N., Anuradha, K., Nagaraju, B., Kumar, V.S. and Reddy, G. (2012). Use of Pectin Rich Fruit Wastes for Polygalacturonase Production by *Aspergillus awamori* MTCC 9166 in Solid State Fermentation. *J Bioprocess Biotechniq*, 2:116
- Pal, A. and Khanum, F. (2010). Production and Extraction Optimization of Xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through Solid-state Fermentation. *Bioresour. Technol.*, 101: 7563-7569.
- Palaniyappan, M., Vijayagopal, V., Viswanathan, R. and Viruthagiri, T. (2009). Screening of Natural Substrate and Optimization of Operating Variables on Production *Aspergillus niger* MTCC281. *African Journal of Biotechnology*, 8(4): 682-686.
- Panda, T. and Naidu, G. S. N. (2000). Rotating Simplex Method of Optimization of Physical Parameters for Higher Production of Extracellular Pectinases in Bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 23: 47-49.
- Panda, T., Nair, S. R. and Kumar, M. P. (2004). Regulation of Synthesis of the Pectolytic Enzymes of *Aspergillus niger*, *Enzyme Microb. Technol.* 34: 466–473.
- Pandey A. (2011). Recent Progress Developments in Solid State Fermentation Process. *Biochem.*, 27, 109-117.
- Pandey, A., Ricardo, C.S. and Christian Larroche, C. (2008). *Current Developments in Solid-state Fermentation*. New Delhi. Asiatech Publishers, Inc.
- Pandey, A. (2003). Solid-State Fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13(2-3): 81-84.
- Panouille M, Thibault JF, Bonnin E. (2006). Cellulase and Protease Preparations can Extract Pectins from Various Plants Byproducts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 8926–8935.

- Patil, R.C., Murugkar, T.P. and Shaikh, S. A. (2012). Extraction of Pectin from Pectinolytic Bacteria Isolated from Carrot Waste. *International Journal of Pharma and Biosciences*. 3(1):B(261-266).
- Patil, N.P. and Chaudhari, B.L.. (2010). Production and Purification of Pectinase by Soil Isolate *penicillium* sp and Search For better Agro-Residue for Its SSF. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7): 36-42.
- Patil, S. R and Dayanand, A. (2006). Production of Pectinase from Deseeded Sunflower Head by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid-State Condition. *Bioresource Technology*, 97:2054-2058.
- Pedersen, M., Johansen, K.S. and Meyer, A.S. (2011). Low Temperature Lignocellulose Pretreatment: Effects and Interactions of Pretreatment pH are Critical for Maximizing Enzymatic Monosaccharide Yields from Wheat Straw. *Biotechnology for Biofuels*, 4(11): 2-10.
- Pedrolli D.B., Monteiro A. C., Gomes E. And Carmonal E. C. (2009). Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3: 9-18.
- Peng, X.W and Chen, H.Z. (2012). Hemicellulose Sugar Recovery from SteamExploded Wheat Straw for Microbial Oil Production. *Process Biochem*,. 47(2):209-215.
- Pereira, J. F., de Queiroz, M. V., Gomes, E. A., Muro-Abad, J.I. and de araujo, E. F. (2002). Molecular Characterization and Evaluation of Pectinase and Cellulose Production of *Penicillium* spp., *Biotechnol. Lett.* 24: 831–838.
- Percival, Y. Z., Ding, S., Mielenz, J. R., Cui, J., Elander, R. T., Laser, M., Himmel, M. E., McMillan, J. R. and Lynd, L. R. (2007). Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(2): 214 – 223.
- Phutela, U., Vikram Dhuna, V., Shobhna Sandhu, S. and B.S. Chadha, B.S. (2005). Pectinase and Polygalacturonase Production by a Thermophilic *Aspergillus fumigatus* Isolated from Decomposting Orange Peels. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 63-69
- Pinheiro, E.S.; Silva, I.M.; Gonzaga, L.V.; Amante, E.R.; Teófilo, R.F.; Ferreira, M.M.; Amboni, R.D.(2008). Optimization of Extraction of High-Ester Pectin from Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with Citric Acid by using Response Surface Methodology. *Bioresour. Technol.*, 99: 5561-5566.

- Prasad, Y.P., Lin, C., Shen, Z. and Qin, W. (2015). Characterization of pectin depolymerising exo polygalacturonase by *Bacillus* sp. HD2 isolated from the gut of *Apis mellifera* L. *Microbiology Discovery*, 3(2): 1- 8.
- Purnawati, Turnip, M. And Irwan Lovadi1, I. (2014). Eksplorasi Paku-Pakuan (*Pteridophyta*) Di Kawasan Cagar Alam Mandor Kabupaten Landak Utin. *Jurnal Protobiont*, 3 (2): 155 – 165.
- Rahardjo. (2005). *Fungal Mats in Solid-State Fermentation*. Doctor of Philosophy, Wageningen University, Wageningen. Netherlands.
- Ralet, M. C., Dronnet, V., Christian, H. B. And Francois, J. T. (2001). Enzymatically and Chemically De-Esterified Lime Pectins: Characterisation, Polyelectrolyte Behaviour and Calcium Binding Properties. *Carbohydrate Research*, 336(2): 117-125.
- Ramachandran, S., Roopesh, K., Nampoothiri, K. M., Szakacs, G. and Pandey, A. (2005). Mixed Substrate Fermentation for the Production Of Phytase by *Rhizopus* spp. using Oilcakes as Substrates. *Proress Biorllem.*, 40(5): 1749-1754.
- Ramachandran, S. and Kurup, G. (2013). Screening and Isolation of Pectinase from Fruit and Vegetable Wastes and the Use of Orange Waste as a Substrate for Pectinase Production. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(9): 34- 39.
- Ramli, N. and Asmawati (2011). Effect of Ammonium Oxalate and Acetic Acid at Several Extraction Time and pH on Some Physicochemical properties of Pectin from Cocoa Husks (*Theobroma cacao*). *African Journal of Food Science*, 5(15): 790-798,
- Rascon-Chu, A., Martinez-Lopez, A. L., Carvajal-Millan, E., de Leon-Renova, N. E. P., Marquez-Escalante, J. A. and Romo-Chacon, A. (2009). Pectin from Low Quality 'Golden Delicious' Apples: Composition and Gelling Capability. *Food Chemistry*, 116(1):101-103.
- Rasheedha, A B., Kalpana, M. D., Gnanaprabhal., G. R., Pradeep, B. V and Palaniswamy, M., (2010). Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(4):377-381.
- Rashmi, R., Murthy, S.K., Sneha, S., Syama, A. And Radhika, V.S. (2008). Partial Purification and Biochemical Characterization of Extracellular Pectinase from

- Aspergillus niger* Isolated from Groundnut Seeds. *Journal of Applied Biosciences*, 9(1): 378 – 384.
- Rehman, Z. and Salariya, A.M. (2005). Comparative aspects of pectin extraction from peels of different varieties of citrus fruit PAK J FOOD SCI 2005, 15(1-2): 21-23.
- Rehman, Z.U., Salariya, A.M., Habib, F., and Shah, W.H. (2004). Utilization of Mango Peels as a Source of Pectin, *Jour. Chem. Soc. Pak*, 26(1): 73-76.
- Rezazadeh, M .B., Alizadeh, M and Farbh F. (2010). Optimizing Endopectinase Production from Date Pomace by *Aspergillus niger* PC5 using Response Surface Methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 8(1): 67–72.
- Rekha, V.P.B., Ghosh, M., Adapa, V., 2 Sung-Jong Oh., Pulicherla, K.K. and Sambasiva, K.R.S.R.(2013). Optimization of Polygalacturonase Production from a Newly Isolated *Thalassospira frigidiphilosprofundus* to Use in Pectin Hydrolysis: Statistical Approach. *BioMed Research International*, 1-13.
- Rigon, M.S., Alberto, L. J. L., Lorenci, A.W. and Ricardo, C.S. (2009). A Simplified Model For *A. Niger* Fs3 Growth During Phytase Formation In Solid State Fermentation. *Brazilian Archives Of Biology And Echnology*, 52: 151-158
- Rivas-Cantu, R.C., Jones, K.D. and Mills, P.L.(2013). A Citrus Waste-Based Biorefinery as a Source of Renewable Energy: Technical Advances and Analysis of Engineering Challenges. *Waste Management and Research*, 31(4) 413–420.
- Rocha, G.J.M., Gonçalves, A.R., Oliveira, B.R., Olivares, E.G. and Rossell, C.E.V. (2012). Steam Explosion Pretreatment Reproduction and Alkaline Delignification Reactions Performed on a Pilot Scale with Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. *Industrial Crops Products*, 35(1): 274-279
- Rodriguez-Leon, J.A., Soccol, C.R., Pandey, A. and Roddiguez, D.E. (2008). Factors Affecting Solid-state Fermentation. In *Current Developments in Solid-state Fermentation*; Pandey, A., Larroche, C., Soccol C.R., Eds.; Springer: Delhi: 230-252.
- Roosdiana, A., Prasetyawan, S., Mahdi, C. and Sutrisno. (2013). Production and Characterization of *Bacillus firmus* Pectinase. *J. Pure App. Chem. Res.*, 2(1): 35 -41.

- Saithi, Sukanya, Nopharatana, M. And Tongta, A. (2013). Phytase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Fermentation using a Rotating Drum Bioreactor. *Journal Of Applied Sciences Research*, 9(12): 6150-6155.
- Salam M. A., Jahan N., Islam M. A. and Hoque M. M. (2012). Extraction of Pectin from Lemon Peel: Technology Development. *Journal of Chemical Engineering*, 27(2):25-31.
- Salariato, D., Diorio, L.A., Mouso, N. and Forchiassin, F. (2010). Extraction and Characterization of *Fomes sclerodermeus* Produced by Solid-State Fermentation. *Revista Argentina de Microbiología*, 42: 57-62.
- Sanchez, R.O., Balderas, P.H., Roa, G.M., Urena, F.N., Orosco, J.V., Lugo, V.L., Flores, R., Eduardo, C.B.D. and Cajero, P.V. (2014). Characterization of Lignocellulosic Fruit Waste as an Alternative Feedstock for Bioethanol Production. *BioResources*, ((2): 1873-1885.
- Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem*, 40:2689-2694.
- Schepers, J. and Van Mechelen, I. (2011). A Two-Mode Clustering Method to Capture the Nature of the Dominant Interaction Pattern in Large Profile Data Matrices. *Psychological Methods*, 16(3): 361–371.
- Scopes, R.K. (2002). Enzyme Activity and Assay. *Encyclopedia of Live Science*, 1-6. Nature Publishing Group. Macmillan
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., and van Dijck, P.W.M. (2002). On The Safety of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59:426-435.
- Seenuvasan, M., Sathish, K.K., Anil, M.K., Iyyappan, J. and Rini, J.G.S. (2014). Response Surface Estimation and Canonical Quantification for the Pectin Degrading Fe₃O₄-SiO₂-Nanobiocatalyst Fabrication. *International Journal of ChemTech Research*, 6(7): 3618-3627.
- Seifollah, F. and Khodaverdi, G. (2013). Pectin Esterase Production by *Aspergillus Niger*: Optimization of Fermentation Condition. *J. Basic. Appl. Sci. Res.*, 3(2): 896-910.
- Semenova, M.V., Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Okunev, O.N. and Sinitsyn, A.P. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry*, 68(5): 559 – 569.

- Sharma, P.C., Gupta, A. and Kaushal, P. (2014). Optimization of Method for Extraction of Pectin from Apple Pomace. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 5(2): 184-189.
- Sharma, R. (2012). Pathogenicity of *Aspergillus niger* in Plants. *Cibtech Journal of Microbiology*, 1 (1): 47-51.
- Shingh, A., Kuila, A., Yadaf, G. And Banerjee, R. (2011). Process Optimization for the Extraction of Polyphenols from Okara. *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (3): 322–328.
- Shuler M. L., Kargi F. (2002). *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., USA,
- Singh, S and Mandal, S.K. (2012). Optimization of Processing Parameters for Production of Pectinolytic Enzymes from Fermented Pineapple Residue of Mixed *Aspergillus* species. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 5(4): 307-314.
- Singh S. A. and Rao A. G. A. (2002). A Simple Fractionation Protocol for, and a Comprehensive Study of the Molecular Properties of Two Major Endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35:115-123.
- Singh, S.D., Kaur, R.G., Gill , Singh, S.G. And Singh, M. (2004). Studies on The Utilization of Citrus Peel for Pectinase Production using Fungus *Aspergillus Niger*. *International Journal Of Environmental Studies*, 61(2): 199-210.
- Sieiro, C., Garcia, B. F., Lopez, J. S., Da Silva, A. F. And Villa, T. G. (2012). Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry, *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*, Dr. Benjamin Valdez (Ed.), 201-218
- Silva, D., K. Tokuioshi, E.S. Martins, R.D. Silva and E. Gomes (2005). Production of Pectinase by Solid-State Fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochem.* 40:2885–2889.
- Soroor, M.AM., -El-Hady, A.M.G., El-Sayed, M.S. Mahdy, El-Badery, M.O., Shousha, W.G. and El-Khonezy, M.I. (2013). Purification and Characterization of Polygalacturonases Produced by *Trichoderma reesei* F418 using Lemon Peels and Rice Straw under Solid-State Fermentation. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(4): 3184-3198.

- Srivastava P. and Malviya R. (2011). Source of Pectin and Its Applications in Pharmaceutical Industry. *Indian Journal of Natural Products and Resource*, 2(1):10-18.
- Subramaniam, R. and Vimala, R. (2012). Solid State And Submerged Fermentation For The Production Of Bioactive Substances: A Comparative Study. *I.J.S.N.*, 3(3) : 480-486.
- Sukumaran, R.,K., Singhanian, R.,K. and Pandey, A. (2005). Microbial Cellulases – production, application, and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64: 832-844.
- Sundar, A.A. R., Rubila, S. Jayabalan, R. And Ranganathan, T.V. (2012). A Review on Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses, *Open Access Scientific Reports* 1(12): 1-12.
- Suphamityotin, P. (2011). Optimizing Enzymatic Extraction of Cereal Milk using Response Surface Methodology Porrarath. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 33(4): 389-395.
- Suresh, B. and Viruthagiri, T. (2011). Optimization and Kinetics of Solid-State Fermentative Production of Pectinase by *Aspergillus awamori*. *International Journal of ChemTech Research*, 3(4): 1758-1764.
- Suresh, B. and Viruthagiri, T. (2010). Optimization and Kinetics of Pectinase Enzyme using *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(8).
- Suresh, B., Viruthagiri, T. and Sasikumar, E. (2009). Optimization and of Process Variables using Response Surface Methodology (RSM) in the Solid-State Fermentative Production of Pectinase by *Aspergillus awamori*. *As. J. Food Ag-Ind*, 2(03), 302-314.
- Susana, R.C. (2008). Exploitation of Biological Wastes for the Production of Value Added Products under Solid-State Fermentation Conditions. *Biotechnology Journal*, 3: 859-870.
- Swain, M.R., Kar, S. An Ray, R.C. (2009). Exo-polygalacturonase Production by *Bacillus subtilis* CM5 in Solid State Fermentation using Cassava Bagase. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:636-648.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 1621-1651

- Tanhatan, A. N. (2010). *Application and Comparison of Commercial Pectins and Iranian Keylime Pectin Stabilizers in "Doogh" (Drinkable Yogurt) Making and the Study of Intra and Intermolecular Properties of the Best Pectin Type Stabilizer*. Doctor of Philosophy. Nakhorn Ratchasima Rajabhat University. Thailand.
- Tao, L., Aden, A., Elander, R.T., Pallapolu, V.R., Lee, Y.Y., Garlock, R.J., Balan, V., Dale, B.E., Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Falls, M., Holtzapple, M.T., Sierra, R., Shi, J., Ebrik, M.A., Redmond, T., Yang, B., Wyman, C.E., Hames, B., Thomas, S., and Warner, R.E., (2011). Process and Technoeconomic Analysis of Leading Pretreatment Technologies for Lignocellulosic Ethanol Production using Switchgrass. *Bioresour. Technol.*, 102: 11105–11114.
- Tapre, A. R. and Jain, R. K. . (2014). Pectinases: Enzymes for Fruit Processing Industry. *International Food Research Journal*, 21(2): 447-453.
- Tariq, A.L. and Reyaz, A.L. (2012). The Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Pectinase Productivity of *Penicillium chrysogenum* in Solid State Fermentation. *International Research Journal of Microbiology*, 3(5): 202-207.
- Thakur, A., Pahwa, R., Singh, S. and Gupta, R. (2010). Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme Research*, 1-7.
- Thangaratham, T. and Manimegalai, G. (2014). Optimization and Production of Pectinase Using Agro Waste by Solid State and Submerged Fermentation. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(9): 357-365.
- Tutt, M., Kikas, T. and Olt, J. (2012). Influence of different pretreatment methods on bioethanol production from wheat straw. *Agronomy Research*, Biosystem Engineering Special Issue, 1: 269-276.
- Upadhyay, A., Prava, J.L. and Tawata, S.. (2010). Utilization Of Pineapple Waste: A Review. *J. Food sci. Technol. Nepal*, 6: 10-18.
- Urias-urona, V., Rascon-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millan, E., Gardea, A.A. and Ramirez-Wong, B. (2010). A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties, *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 3686-3695.

- Van Le Truong. (2006). *Characterization of the pectinolytic enzymes of the marine psychrophilic bacterium Pseudoalteromonas haloplanktis strain ANT/505*. Doctor of Philosophy. University Greifswald. German.
- Van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuypers, M., Luttik, M., Wisselink, H., Scheffers, W., van Dijken, J. and Pronk, J. (2006). Alcoholic Fermentation of Carbon Sources in Biomass Hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current Status. *Int. J. G.*, 90: 391-418.
- Vashanti and Meenakshisundaran. (2012). Optimization Of Pectinase Enzyme Production by Using Sour Orange peel as Substrate In Solid-State Fermentation. *Asian Journal Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2(1): 16-26.
- Vaughan, A., O'Sullivan, T. and Van Sinderen, D. (2005). Enhancing the microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 3(4): 355 – 371.
- Verma, N., Bansal, M. C. And Kumar, V. (2011). Scanning Electron Microscopic Analysis of *Aspergillus niger* Pellets and Biofilms under Various Process Conditions. *International Journal of Microbiological Research* 2(1): 08-11, 2011.
- Vibha, B. and Neelam, G. (2010). Exploitation of Microorganism for Isolation and Screening of Pectinase from Environment. *Globelics 8th International Conference.*, 1st-3rd Nopember. University of Malaya. 1-16.
- Vibha, B. and Neelam, G. (2011). The Utilization of Citrus Peel for Pectinase Production. *Journal of Suistainable and Enviromental Protection*, 1(3):60-66.
- Viniegra, G.G., Favela, E.T., Aguilar, C.N., de Jesus, S.R.G., Diaz, G.G. and Augur, C. (2003). Advantages of Fungal Enzyme Production in Solid State Over Liquid Fermentation Systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13:157–167.
- Vriesmann, L. C., Teofilo, R. F. and Petkowicz, C. L. D. (2012). Extraction and Characterization of Pectin from Cacao Pod Husks (*Theobroma cacao L.*) with Citric Acid. *Lwt-Food Science and Technology*, 49:108-116.
- Warend. (2004). Microbial Growth and The Control of Microbial Growth (Chapter 6 and 7). In: Tortora, G.J. *Microbiology An Introduction 8th, ed.* San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

- Weihong, Z. and Peilin, CEN. (2005). Pectinase Production by *Aspergillus niger* P-6021 On Citrus Changsan-Huyou Peel in Slurry-State Fermentation. *Chinese J. Chem. Eng.*, 13(4):510-515.
- Willats, W. G. Knox, J. P. and Mikkelsen, J. D. (2006) *Trends in Food Science and Technology*, 17: 97–104.
- Weng, W.W., Alkharkhi, A.F.M. and Easa, A. (2009). Optimization of Pectin Extraction from Durian Rind (*Durio zibethinus*) using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 74(8): 637-641.
- Woo, K.K., Chang, Y.Y., Li Hong, S.K. and Tang, P.Y. (2010). Pectin Extraction and Characterization from Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*): A Preliminary Study. *Journal of Biological Science*, 10(7): 631-636.
- Worl Enzymes. (2015). Industry Study with Forecasts for 2015 and 2020. www.freedoniagroup.com/brochure/28x/2824smwe.pdf.
- Yadav, S., Yadav, P., Yadav D. and Yadav, K.D.S. (2009). Pectin Lyase: A Review. *Process Biochemistry*, 44:1-10.
- Yang, B., Ziyu Dai , Shi-You, D and Wyman, C.E. (2011). Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. *Biofuels*, 2(4): 421–450.
- Yang, B. and Wyman, C.E. (2009). Dilute Acid and Autohydrolysis Pretreatment. *Methods in Molecular Biology*, 581: 103-114.
- Yano, K. S. and Poulos, T. L. (2003). New Understandings of Thermostable, Peizostable Enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 360-365.
- Yapo, B.M. and Koffi, K.L. (2014). Extraction and Characterization of Highly Gelling Low Methoxy Pectin from Cashew Apple Pomace. *Foods*, 3: 1-12
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B. and Paquot, M. (2007). Effect of Extraction Conditions on the Yield, Purity and Surface Properties of Sugar Beet Pulp Pectin Extracts. *Food Chemistry*, 100:1356-1364.
- Yassine, M. S., Chabir, R., Nadia , E., Rodiel, Y. K., Quazzani, F. C. Touzani, H. Errahcidi, F. (2014). Comparative Study on Pectin Yield According To the State of the Orange Peels and Acids Used. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(8):15658 – 15665.
- Yee, H.L. and Yan, Y.L. (2011). Evaluation of Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts of Selected Ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development*, 2(6): 442-447.

- Yoon, L.W., Cheng, G.N. and Seak, A.M.C. (2012). Simultaneous Production of Cellulase and Reducing Sugar from Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse via Solid State Fermentation. *BioResources*, 7(4): 5319-5332.
- Yuan, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Bai, Y., Yang, P. and Yao, B. (2014). A protease-resistant exo-polygalacturonase from *Klebsiella* sp. Y1 with good activity and stability over a wide pH range in the digestive tract. *Bioresource Technology*, 123: 171- 176.
- Yunqiao Pu, Fan Hu. and Fang Huang² and Ragauskas, A.J. (2015). Lignin Structural Alterations in Thermochemical Pretreatments with Limited Delignification. *Bioenerg. Res.*: 8:992–1003.
- Zhang, Y.Z. and Chen, H.Z. (2012). Multiscale Modeling of Biomass Pretreatment for Optimization of Steam Explosion Conditions. *Chem. Eng. Sci.*, 75:177-182.
- Zhang, Y., Qiang LI, Zhang, Y., Wang, D. and , Xing, J..(2012). Optimization of Succinic Acid Fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by Response Surface Methodology (RSM). *Biomedicine and Biotechnology*, 13(2):103-110.
- Zhao-hui, X., Xin, Z., Zhi-jun, Z., Jian-hua, L, Yi-fan, W., Dong-xul. And Li-sheng, L. (2011). Optimization of Pectin Extraction from Citrus Peel by Response Surface Methodology. *Journal of Food Science Technology*, 32(18): 128 – 132.
- Ziari, H., Zokaee, F.A. and Mohtshamy. (2010). Comparing The Effectiveness Of Processing Parameters In Pectin Extraction From Apple Pomace. *Afinidad LXVII*, 549: 374-379.
- Zimbardi, F., Viola, E., Nanna, F., Cardinale, G., Villone, A., Valerio, V. And Braccio, G. (2009). Lignocellulosic Biomass as Carbon Source by Steam Explosion Pretreatment. *New Biotechnol.*, 25: S275.