

Available online at: <http://reactor.poltekattipdg.ac.id/>

**REACTOR**  
Journal of Research on Chemistry and Engineering

| ISSN Online 2746-0401 |



## Hidrolisis Limbah Kulit Pisang (*Musa acuminata*) Menggunakan Katalis Asam untuk Produksi Bioetanol

Zuhriyan Ash shiddieqy Bahlawan, Megawati, Bayu Triwibowo, Alfiansyah Aji Pratama, Zefanya Pradiza, Anggun Septiamurti

<sup>1</sup> Departmen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Negeri Semarang, Semarang 50299, Indonesia

### ARTICLE INFORMATION

Received: June 01, 2022

Revised: June 27, 2022

Available online: June 30, 2022

### KEYWORDS

Banana Peels, Bioethanol, Hydrolysis, Reducing Sugar

### CORRESPONDENCE

Name: Zuhriyan Ash Shiddieqy Bahlawan

E-mail: [zuhriyanb@mail.unnes.ac.id](mailto:zuhriyanb@mail.unnes.ac.id)

### A B S T R A C T

Banana is one of the fruits that can thrive in Indonesia. This plant is often found in tropical soils with slightly moist soil conditions. However, banana peels are underutilized and are only disposed of as agricultural waste. On the other hand, the carbohydrate content of banana peels is still quite high, reaching 12.2% so it can be used as raw material for making bioethanol. Carbohydrates in the substrate cannot be directly converted into bioethanol but need to be pretreated first to break down polysaccharides into monosaccharides. In this research, the pretreatment process of carbohydrate hydrolysis from banana peels into reducing sugars is studied. From the studies, the reducing sugar concentration was obtained with banana peels substrate concentration of 20 g/L, 5 M of sulfuric acid concentration, and an optimum hydrolysis time of 70 minutes with the obtained reducing sugar reach 16.82 g/L. Reducing sugar can be converted into bioethanol by fermentation process with *S. cerevisiae* yeast. It is hoped that these studies can provide an initial impact on the development of alternative energy based on biomass and utilization of banana peel waste.

## PENDAHULUAN

Saat ini sumber energi di dunia masih bergantung dengan energi dari bahan fosil. Tetapi, bahan bakar fosil memiliki dampak negatif yang cukup signifikan pada perubahan iklim pemanasan global dengan melepaskan karbon monoksida ke lingkungan yang cukup besar [1]. Kekhawatiran ini mendorong minat untuk mencari pengganti energi alternatif yang berkelanjutan [2]. Salah satu sumber energi alternatif berkelanjutan adalah energi biomassa dari bahan baku organik, salah satunya yaitu bioetanol [3]. Bioetanol ( $C_2H_6O$ ) merupakan *volatile liquid* dan salah satu bentuk energi terbarukan. Bioethanol dapat diproduksi dengan proses fermentasi dari substrat monosakarida, bahan berpati, dan selulosa [4]. Penggunaan bioetanol sebagai pengganti bahan bakar fosil mulai diteliti dan diimplementasikan di Amerika dan Brazil pada awal tahun 1970-an dan mulai dikembangkan di negara tersebut [5]. Selain itu,

penggunaan bioetanol sebagai pengganti bahan bakar fosil juga memiliki beberapa keuntungan diantaranya kandungan oksigen 35% lebih tinggi dibandingkan dengan bahan bakar fosil, 20-30% emisi yang dihasilkan lebih rendah daripada bahan bakar fosil [6].

Buah pisang merupakan salah tanaman terna dengan pohon memanjang dari suku *Musaceae* [7]. Tanaman ini banyak dijumpai pada tanah yang beriklim tropis dengan kondisi tanah yang sedikit lembab [8]. Selain itu, tanaman pisang juga mampu tumbuh pada tanah dengan kondisi marjinal [9] Tanaman pisang menghasilkan buah dengan nama yang sama. Buah ini tersusun dalam tandan yang berkelompok menjadi satu sisir [10]. Di Indonesia pisang merupakan salah satu buah yang paling banyak di konsumsi hingga 45%. Pemanfaatan tanaman pisang hanya dimanfaatkan buah dalamnya saja sebagai sektor pangan, sedangkan kulit pisang belum dimanfaatkan secara baik sehingga hanya menjadi limbah pertanian [11].

Kulit pisang merupakan limbah lignoselulosa dengan kandungan berat kering 12.2% karbohidrat, 5.7% protein dan 4.03% lipids [12]. Karbohidrat dalam kulit pisang dapat dimanfaatkan menjadi bioethanol [13]. Proses konversi karbohidrat menjadi bioethanol melalui dengan dua tahap yaitu hidrolisis dan fermentasi [14]. Proses hidrolisis merupakan proses memecah molekul menjadi glukosa dengan bantuan air dan katalis kemikal maupun enzim [15]. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa hidrolisis menggunakan katalis asam sulfat 0.5% dapat memecah karbohidrat dari limbah makanan hingga 40 g/L pada suhu 100 °C [16], dan dengan asam klorida mencapai yield hingga 70-84% pada substrat kulit kayu [17]. Pada hidrolisis karbohidrat menggunakan katalis enzim alpha amylase dan glukamilase didapat yield mencapai 89 % pada substrat karbohidrat dari mikroalga [18]. dan 79% pada substrat campuran biji buah [19]. Selain itu, hidrolisis karbohidrat menggunakan katalis enzim dilaporkan memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan katalis asam [20].

Glukosa hasil hidrolisis karbohidrat dilanjutkan dengan proses fermentasi untuk mendapatkan bioethanol. Fermentasi etanol merupakan fermentasi dengan substrat glukosa yang dikonversi secara anaerob dengan bantuan yeast [21]. Proses Fermentasi pada umumnya menggunakan yeast dari strain *Saccharomyces cerevisiae*, [22] Fermentasi glukosa menjadi bioethanol dengan pengoprasian batch menawarkan pengoprasian dan kontrol yang lebih mudah dengan nilai investasi yang lebih rendah dan konversi bioetanol yang tinggi [23]. Faktor utama yang berpengaruh pada fermentasi bioethanol glukosa adalah waktu, suhu operasi, dan pH [24]. Produksi bioetanol melalui fermentasi glukosa dengan konsentrasi glukosa awal 63,83 g/L pada suhu 32° C dan pH 4,8 selama 92 jam menggunakan yeast *S. cerevisiae* bahwa konsentrasi etanol tertinggi yang diperoleh hingga 29,76 g/L [25], dan 9.04 g/L pada fermentasi dengan substrat Lemnaceae selama 48 jam [26].

Proses pretreatment pada produksi bioethanol sudah banyak dipelajari dengan berbagai metode. Pada penelitian ini akan difokuskan mempelajari pretreatment dengan metode hidrolisis dengan katalis asam sulfat pada substrat limbah kulit pisang. Selanjutnya gula pereduksi yang diperoleh dapat digunakan sebagai substrat pada produksi bioetanol.

## METODOLOGI

### Material

Bahan baku limbah kulit pisang yang digunakan sebagai substrat utama diperoleh dari pedagang di sekitar Semarang, Indonesia, Katalis kemikal dibeli dari Merck,

Darmstadt, Germany, dan yeast *S. cerevisiae* diperoleh dari *dry yeast* Lalvin 71B, France's National Agricultural Research Institute France.

### Penyiapan Substrat Kulit Pisang

Limbah kulit pisang yang didapat dicuci bersih menggunakan aquades dengan cara direndam selama kurang lebih 40 menit. Kulit pisang yang sudah dibersihkan dimasukkan ke dalam oven selama 5 jam dengan suhu 60 °C atau hingga berat kering konstan. Setelah kulit pisang kering dilakukan penepungan dengan cara diblender atau digiling hingga halus dan di ayak dengan ukuran mesh 80 untuk mendapatkan ukuran tepung yang merata dan disimpan pada tempat tertutup untuk selanjutnya digunakan sebagai substrat.

### Proses Hidrolisis

Tepung kulit pisang yang sudah dikeringkan dilarutkan dalam aquades dengan konsentrasi substrat (5 g/L–20 g/L). selanjutnya media dipanaskan hingga suhu mencapai 90°C dan dihidrolisis dengan katalis asam sulfat. Setiap 10 menit dilakukan sampling untuk dianalisa gula pereduksi yang diperoleh.

### Analisa Gula Pereduksi

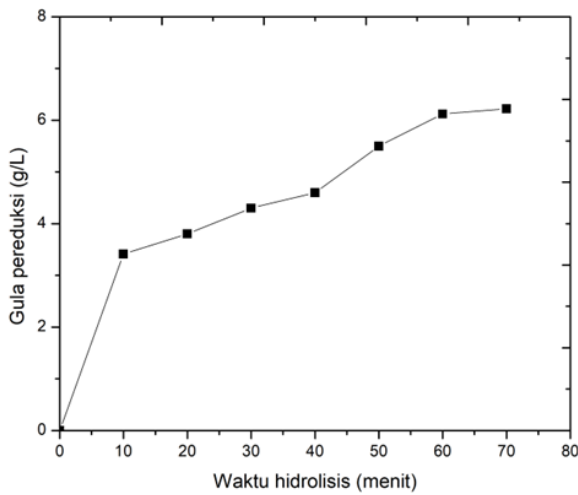
Pada penelitian ini, sampel yang diperoleh dianalisa kandungan gula pereduksi menggunakan metode Nelson-Syomogi mengacu pada [22]. Reagen Nelson diperoleh dengan cara mencampurkan larutan Nelson A dan Nelson B dengan perbandingan 25:1. Konsentrasi gula pereduksi pada sampel diuji dengan cara 1 mL sampel hasil hidrolisis ditambahkan dengan 1 mL reagen Nelson dalam tabung reaksi dan ditutup rapat. Larutan campuran lalu dipanaskan dalam water bath dengan suhu 90°C 10 menit hingga terjadi perubahan warna pada sampel. Setelah proses pemanasan, larutan lalu didinginkan menggunakan pendingin air hingga mencapai suhu ruang. Larutan arsenomolybdat 1 mL ditambahkan pada sampel dan diaduk hingga merata untuk menghilangkan endapan yang terbentuk. Larutan kemudian dianalisa Spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 570 λ. Arsobansi kemudian dibaca dan dikonversi menjadi konsentrasi menggunakan kurva standar yang dibuat sebelumnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh waktu hidrolisis terhadap konsentrasi glukosa

Pada tahap ini, pengaruh waktu dipelajari untuk mendapatkan gula pereduksi dari karbohidrat limbah kulit pisang. Proses hidrolisis dilakukan pada konsentrasi substrat 10 g/L, suhu 90 °C, dan katalis asam sulfat 5M selama 70 menit dengan waktu sampling 10 menit untuk mendapatkan waktu yang optimum. Pengaruh waktu

hidrolisis terhadap gula pereduksi disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh waktu hidrolisis terhadap konsentrasi gula pereduksi

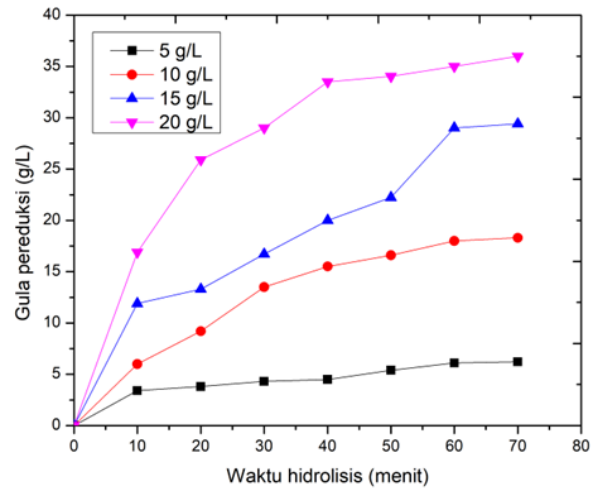
Dari gambar 1. dapat dilihat bahwa semakin lama proses hidrolisis gula rduksi yang diperoleh akan semakin besar. Peningkatan gula pereduksi secara signifikan terjadi pada 10 menit pertama mencapai 3.41 g/L dan dilanjutkan hingga waktu ke 60 menit. Pada proses hidrolisis di waktu 60 ke 70 menit, peningkatan glukosa cenderung konstan dan hanya mencapai 6.22 g/L. Hal ini mungkin terjadi pada 10 menit pertama permukaan granule dari tepung kulit pisang akan terhidrolisis dari polisakarida menjadi monosakarida. Pada kondisi nilai pH asam pada suhu sedang dan tinggi akan terjadi reaksi multifase antara substrat dengan medium dan dapat mepereduksi reaksi Maillard sehingga dapat meningkatkan hidrolisis karbohidrat menjadi gula pepereduksi [27]. Medium dengan kondisi asam dan suhu tinggi, itu akan menghasilkan konsentrasi ion H<sup>+</sup> yang rendah sehingga mendorong terjadinya interaksi antara asam amino dengan gugus karbonil sehingga akan terjadi dekomposisi polimer menjadi monomer yang konsentrasinya lebih tinggi [2].

#### **Pengaruh Substrat Terhadap gula pereduksi**

Setelah didapatkan waktu hidrolisis terbaik pada tahap sebelumnya, pengaruh konsentrasi substrat pada tahap ini dipelajari pada konsentrasi 5-20 g/L. Proses hidrolisis dilakukan menggunakan katalis asam sulfat 5M pada suhu 90 dan waktu 70 menit. Pengaruh substrat tepung limbah kulit pisang disajikan pada gambar 2.

Dapat dilihat dari gambar 2. bahwa semakin banyak substrat yang di tambahkan pada proses hidrolisis akan semakin besar pula konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh. Hal ini drikarenakan semakin banyak substrat yang ditambahkan akan semakin banyak pula

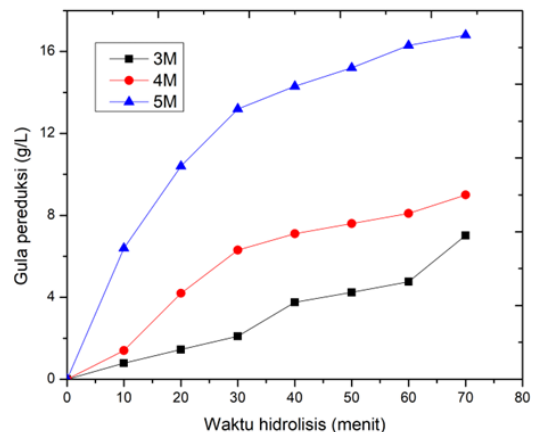
polisakarida yang akan dihidrolisis menjadi monosakarida. Konsentrasi tertinggi diperoleh pada penambahan substrat 20 g/L tepung didapat sebesar 16.82 g/L gula pereduksi. Semakin tinggi konsentrasi substrat, semakin besar karbohidrat yang perlu dihidrolisis. Namun demikian, dengan substrat yang lebih tinggi akan mengurangi hasil konversi glukosa [28]. Diatas konsntrasi karbohidrat 20 g/L proses hidrolisis tidak berjalan efektif dikarenakan terjadi proses swelling dan pepadatan pada substrat [29]. sehingga proses pengadukan tidak dapat terjadi secara optimal.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi limbah kulit pisang terhadap hasil gula pereduksi

#### **Pengaruh Katalis Asam Sulfat Pada Konsentrasi Gula Pereduksi**

Pada tahap ini, hidrolisis menggunakan katalis asam sulfat diteliti dengan substrat 20 g/L, konsentrasi asam sulfat 3-5M selama 70 menit pada suhu 90 °C hasil gula pereduksi disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi asam sulfat terhadap hasil gula pereduksi

Dari gambar 3 dapat dilihat konsentrasi katalis 5M menghasilkan gula pereduksi sebesar 16.82 g/L pada

waktu 70 menit dan konsentrasi gula pereduksi terendah dengan menggunakan katalis asam sulfat 3M diperoleh gula pereduksi sebanyak 5.12 g/L. Semakin besar konsentrasi asam sulfat akan menghasilkan konsentrasi gula pereduksi yang semakin besar. Hal ini disebabkan karena semakin besar konsentrasi asam sulfat ion H<sup>+</sup> yang dilepaskan juga semakin banyak, sehingga polisakarida terdegradasi menjadi gula pereduksi semakin cepat [30]. Selain itu, konsentrasi katalis yang tidak seimbang terhadap substrat yang akan dihidrolisis akan menyebabkan semakin lama proses sehingga hidrolisis menjadi tidak efektif [31].

## KESIMPULAN

Limbah kulit pisang memiliki potensi yang baik sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Hasil hidrolisis kulit pisang menjadi gula pereduksi dengan katalis asam sulfat menunjukkan hasil yang baik. Dari percobaan yang dilakukan hasil konsentrasi gula pereduksi diperoleh dengan konsentrasi substrat kulit pisang sebanyak 20 g/L, konsentrasi asam sulfat 5 M, dan waktu hidrolisis optimum selama 70 menit dengan hasil gula pereduksi mencapai 16.82 g/L. Hidrolisis menggunakan asam sulfat merupakan metode pretreatment polisakarida menjadi gula pereduksi yang selanjutnya dapat dilanjutkan dengan proses fermentasi menjadi bioetanol dengan yeast *S. cerevisiae*. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan dampak awal proses pretreatment polisakarida dari limbah kulit pisang dalam pengembangan energi alternatif berbasis biomassa.

## ACKNOWLEDGEMENT

Ucapan terima kasih terutama ditujukan kepada Fakultas Teknik Universitas Negeri Semarang atas fasilitas yang diberikan dan dana dari DIPA FT UNNES TAHUN 2022 Nomor: 79.13.4/UN37/PPK.4.5/2022.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] H. Yanto, A. Rofiah, and Z. A. S. Bahlawan, "Environmental Performance and Carbon Emission Disclosures: A case of Indonesian Manufacturing Companies," in *Journal of Physics: Conference Series*, Dec. 2019, vol. 1387, no. 1, p. 12005. doi: 10.1088/1742-6596/1387/1/012005.
- [2] M. Megawati, Zuhriyan Ash Shiddieqy Bahlawan, A. Damayanti, R. D. A. Putri, B. Triwibowo, and H. Prasetyawan, "Comparative study on the various hydrolysis and fermentation methods of *Chlorella vulgaris* biomass for the production of bioethanol," *Int. J. Renew. Energy Dev.*, vol. 0, no. 0, Dec. 2021, doi: 10.14710/IJRED.2022.41696.
- [3] A. C. Kumoro, A. Damayanti, Z. A. S. Bahlawan, M. Melina, and H. Puspawati, "Bioethanol

production from oil palm empty fruit bunches using *saccharomyces cerevisiae* immobilized on sodium alginate beads," *Period. Polytech. Chem. Eng.*, vol. 65, no. 4, pp. 493–504, 2021, doi: 10.3311/PPCh.16775.

- [4] Z. A. S. Bahlawan *et al.*, "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Seed Fiber for Bioethanol Production," *ASEAN J. Chem. Eng.*, vol. 22, no. 1, pp. 156–167, Jun. 2022, doi: 10.22146/AJCHE.69781.
- [5] Z. Luo, L. Wang, and A. Shahbazi, "Optimization of ethanol production from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) juice using response surface methodology," *Biomass and Bioenergy*, vol. 67, pp. 53–59, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.biombioe.2014.04.003.
- [6] F. M. Gírio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, and R. Bogel-Lukasik, "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 13, Elsevier, pp. 4775–4800, Jul. 01, 2010. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- [7] L. F. Li, M. Häkkinen, Y. M. Yuan, G. Hao, and X. J. Ge, "Molecular phylogeny and systematics of the banana family (Musaceae) inferred from multiple nuclear and chloroplast DNA fragments, with a special reference to the genus *Musa*," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–10, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.ympev.2010.06.021.
- [8] P. M. Waghmare, P. G. Bedmutha, and S. B. Sollapur, "Investigation of effect of hybridization and layering patterns on mechanical properties of banana and kenaf fibers reinforced epoxy biocomposite," *Mater. Today Proc.*, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2020.11.194.
- [9] J. A. Fortescue and D. W. Turner, "Growth and development of ovules of banana, plantain and enset (Musaceae)," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 104, no. 4, pp. 463–478, May 2005, doi: 10.1016/j.scienta.2005.01.007.
- [10] M. Leonel, A. C. B. Bolfarini, M. J. Rodrigues da Silva, J. M. A. Souza, and S. Leonel, "Banana fruits with high content of resistant starch: Effect of genotypes and phosphorus fertilization," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 150, pp. 1020–1026, May 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.217.
- [11] A. H. Hashem, E. Saied, and M. S. Hasanin, "Green and ecofriendly bio-removal of methylene blue dye from aqueous solution using biologically activated banana peel waste," *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 18, p. 100333, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.scp.2020.100333.
- [12] M. E. de Matos, A. Bianchi Pedroni Medeiros, G. V. de Melo Pereira, V. T. Soccol, and C. R. Soccol, "Production and characterization of a distilled alcoholic beverage obtained by fermentation of banana waste (*Musa cavendishii*) from selected yeast," *Fermentation*, vol. 3, no. 4,

- 2017, doi: 10.3390/fermentation3040062.
- [13] D. Deb, N. Mallick, and P. B. S. Bhadoria, "Engineering culture medium for enhanced carbohydrate accumulation in *Anabaena variabilis* to stimulate production of bioethanol and other high-value co-products under cyanobacterial refinery approach," *Renew. Energy*, vol. 163, pp. 1786–1801, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.renene.2020.10.086.
- [14] Megawati, A. Damayanti, R. D. A. Putri, Z. A. S. Bahlawan, A. A. D. Mastuti, and R. A. Tamimi, "Hydrolysis of *S. platensis* Using Sulfuric Acid for Ethanol Production," *Mater. Sci. Forum*, vol. 1048 MSF, no. 2, pp. 451–458, 2022, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.1048.451.
- [15] Z. A. S. Bahlawan, A. Damayanti, N. Arif Majid, A. Herstyawan, and R. A. Hapsari, "Gembili (*Dioscorea esculenta*) tube modification via hydrogen peroxide oxidation," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1444, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1742-6596/1444/1/012007.
- [16] H. S. Hafid, A. R. Nor 'Aini, M. N. Mokhtar, A. T. Talib, A. S. Baharuddin, and M. S. Umi Kalsom, "Over production of fermentable sugar for bioethanol production from carbohydrate-rich Malaysian food waste via sequential acid-enzymatic hydrolysis pretreatment," *Waste Manag.*, vol. 67, pp. 95–105, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2017.05.017.
- [17] T. Ohra-aho, F. J. B. Gomes, J. L. Colodette, and T. Tamminen, "Carbohydrate composition in Eucalyptus wood and pulps – Comparison between Py-GC/MS and acid hydrolysis," *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 129, pp. 215–220, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jaap.2017.11.010.
- [18] I. Kim, Y. H. Seo, G. Y. Kim, and J. I. Han, "Co-production of bioethanol and biodiesel from corn stover pretreated with nitric acid," *Fuel*, vol. 143, pp. 285–289, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.fuel.2014.11.031.
- [19] M. U. Ude, I. Oluka, and P. C. Eze, "Optimization and kinetics of glucose production via enzymatic hydrolysis of mixed peels," *J. Bioresour. Bioprod.*, vol. 5, no. 4, pp. 283–290, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.jobab.2020.10.007.
- [20] H. Shokrkar, S. Ebrahimi, and M. Zamani, "Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture," *Fuel*, vol. 200, pp. 380–386, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.fuel.2017.03.090.
- [21] J. Hou, X. Zhang, S. Zhang, K. Wang, and Q. Zhang, "Enhancement of bioethanol production by a waste biomass-based adsorbent from enzymatic hydrolysis," *J. Clean. Prod.*, vol. 291, p. 125933, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2021.125933.
- [22] Megawati *et al.*, "Bioethanol production from glucose obtained from enzymatic hydrolysis of *Chlorella* microalgae," *Mater. Today Proc.*, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.MATPR.2022.03.551.
- [23] K. H. Lee, I. S. Choi, Y. G. Kim, D. J. Yang, and H. J. Bae, "Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 17, pp. 8191–8198, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2011.06.063.
- [24] B. Ortiz-Muñiz, O. Carvajal-Zarrabal, B. Torrestiana-Sanchez, and M. G. Aguilar-Uscanga, "Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 10, pp. 1361–1367, Oct. 2010, doi: 10.1002/jctb.2441.
- [25] J. Waluyo, D. Burhani, N. Hikmah, and Y. Sudiyani, "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* using Ca-alginate for bioethanol production from empty fruit bunch of oil palm," in *AIP Conference Proceedings*, Jan. 2017, vol. 1803, no. 1, p. 020016. doi: 10.1063/1.4973143.
- [26] A. Faizal, A. A. Sembada, and N. Priharto, "Production of bioethanol from four species of duckweeds (*Landoltia punctata*, *Lemna aquinoctialis*, *Spirodela polyrrhiza*, and *Wolffia arrhiza*) through optimization of saccharification process and fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 294–301, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.002.
- [27] Q. Yu *et al.*, "Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes," *Bioresour. Technol.*, vol. 129, pp. 592–598, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.11.099.
- [28] L. Mezule, I. Berzina, and M. Strods, "The Impact of Substrate–Enzyme Proportion for Efficient Hydrolysis of Hay," *Energies 2019, Vol. 12, Page 3526*, vol. 12, no. 18, p. 3526, Sep. 2019, doi: 10.3390/EN12183526.
- [29] R. F. Tester and M. D. Sommerville, "Swelling and Enzymatic Hydrolysis of Starch in Low Water Systems," *J. Cereal Sci.*, vol. 33, no. 2, pp. 193–203, Mar. 2001, doi: 10.1006/JCRS.2000.0350.
- [30] J. H. Northrop and H. S. Simms, "The Effect Of The Hydrogen Ion Concentration On The Rate Of Hydrolysis Of Glycyl Glycine, Glycyl Leucine, Glycyl Alanine, Glycyl Asparagine, Glycyl Aspartic Acid, And Biuret Base By Erepsin," *J. Gen. Physiol.*, vol. 12, no. 2, p. 313, Nov. 1928, doi: 10.1085/JGP.12.2.313.
- [31] P. K. Robinson, "Enzymes: principles and biotechnological applications," *Essays Biochem.*, vol. 59, p. 1, Nov. 2015, doi: 10.1042/BSE0590001.