

Penentuan Proses *Pretreatment* untuk Pemanfaatan Limbah Kulit Singkong sebagai Bahan Baku Bioetanol melalui Hidrolisa Enzimatis menggunakan *Aspergillus spp.*

Dessy Ariyanti^{1*}, Aprilina Purbasari¹, Heny Kusumayanti², Noer Abyor Handayani¹

¹Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro

²Program Studi Teknik Kimia, Departemen Teknologi Industri, Sekolah Vokasi, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah 50275, Indonesia

Email: dessy.ariyanti@che.undip.ac.id

Abstrak

Ketergantungan terhadap bahan bakar fosil ini menjadi masalah besar yang sangat mendesak untuk segera diselesaikan. Salah satu langkah solusi yang bisa dilakukan adalah memanfaatkan bioetanol lignoselulosa dari limbah kulit singkong sebagai alternatif pengganti. Permasalahan utama yang menghambat penggunaan kulit singkong sebagai bahan baku utama pembuatan bioetanol adalah belum adanya proses pretreatment dan hidrolisa yang terbukti efektif secara teknis maupun ekonomis untuk mengkonversi lignoselulosa yang terkandung dalam kulit singkong menjadi bentuk gula sederhana. Penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui efektifitas proses pretreatment dan hidrolisa untuk mengkonversi lignoselulosa yang terkandung dalam kulit singkong menjadi bentuk gula sederhana. Metode pretreatment asam (H_2SO_4) dan organosolv (Etanol + CH_3COONa) terbukti dapat meningkatkan yield gula tereduksi hingga 50% dibandingkan dengan proses hidrolisa tanpa pretreatment. Yield hingga 78% dapat diperoleh pada proses pretreatment asam suhu $30^\circ C$, waktu 30 menit yang dilanjutkan dengan hidrolisa enzimatis dengan *Aspergillus niger* selama 48 jam. Peningkatan yield pada proses pretreatment organosolv (optimum 74% pada suhu $30^\circ C$, waktu 90 menit) masih dapat dilakukan dengan meningkatkan waktu operasi dan meningkatkan suhu operasi. Namun peningkatan suhu maupun penambahan waktu operasi berpengaruh terhadap analisa teknis dan ekonomis dari proses. Secara teknis, pretreatment organosolv lebih mudah dilakukan terutama pada proses dengan kondisi operasi atmosferik dibandingkan dengan pretreatment asam karena sifat bahan kimia yang digunakan dan penanganannya. Secara ekonomis, pretreatment asam lebih baik untuk diaplikasikan dibandingkan pretreatment organosolv, hal ini dikarenakan yield yang dihasilkan lebih tinggi pada kondisi proses atmosferik.

Kata kunci: H_2SO_4 , hidrolisa enzimatis, kulit singkong, organosolv, pre-treatment asam

Abstract

Determination of Pretreatment Process for Utilizing Cassava Skin Waste as Bioethanol Raw Material through Enzymatic Hydrolysis using Aspergillus spp.

Lignocellulose material derived from cassava peel can be utilized as raw material for bioethanol production. The utilization of this material can be part of solution in order to maintain Indonesia's energy security which still majority covered by the fossil fuel. The main problem of lignocellulose conversion into bioethanol is their crystalline structures those make them really difficult to be converted into monomeric sugar prior fermentation to produce ethanol. The objective of this research is to find out the effectiveness of pre-treatment process prior enzymatic hydrolysis of lignocellulose contained on cassava peel. The result shows pre-treatment methods both acid (H_2SO_4) and organosolv (Etanol + CH_3COONa) proved to be effective in order to increase the yield of total reducing sugar (TRS) until 50% after enzymatic hydrolysis compared to the sample without pre-treatment.

Highest yield 78% can be achieved by applying acid pre-treatment under temperature 30°C and 30 minutes of process prior enzymatic hydrolysis by Aspergillus niger under temperature 35°C for 48 hours. Further optimization in organosolv pre-treatment can be conducted by increasing the temperature and prolong the process into certain extent. It should be noted that the above action could influence the feasibility of the organosolv pre-treatment technically and economically. From technical point of view, organosolv pre-treatment can be more feasible compared to acid pre-treatment (under atmospheric condition) as the reagents are easy to handle in terms of safety consideration. However, from economic side acid pre-treatment is more preferable as higher yield of the process and lower volume of chemical can be used in order to achieve the same amount of product.

Keywords: H_2SO_4 , enzymatic hydrolysis, cassava peel, organosolv, acid pre-treatment

PENDAHULUAN

Kebutuhan energi Indonesia saat ini sebagian besar masih bertumpu pada bahan bakar fosil. Kebutuhan total energi nasional tahun 2016 berada pada kisaran 795 juta SBM (setara barrel minyak) (BPPT, 2018). Ketergantungan terhadap bahan bakar fosil ini menjadi masalah besar yang sangat mendesak untuk segera diselesaikan. Salah satu langkah solusi yang bisa dilakukan adalah memanfaatkan bioetanol lignoselulosa sebagai alternatif pengganti. Salah satu sumber biomassa lignoselulosa non pangan di Indonesia yang tersedia melimpah adalah limbah kulit singkong. Produksi singkong di Jawa Tengah sekitar 3,18 juta ton dengan luas lahan 120,895 hektar dan produktivitas lahan 259,64 ku/ha (BPS, 2018). Jumlah kulit singkong dari total berat singkong berkisar 20-35% (Olanbiwoninu & Odunfa, 2012), sehingga berdasarkan data tahun 2017 dapat diasumsikan bahwa Jawa Tengah menghasilkan 636 – 1,11 juta kulit singkong. Permasalahan utama yang menghambat penggunaan kulit singkong sebagai bahan baku utama pembuatan bioetanol adalah jenis polisakarida yang terkandung dalam kulit singkong tersebut yaitu selulosa dan hemiselulosa. Dalam proses pembuatan bioetanol, selulosa dan hemiselulosa harus dikonversi dalam bentuk gula sederhana yang nantinya difermentasi oleh mikroba untuk menghasilkan bioetanol. Polisakarida jenis selulosa dan hemiselulosa sangat sulit untuk dikonversi menjadi bentuk gula sederhana (glukosa) karena struktur polimernya yang sangat kuat. Penelitian-penelitian yang telah dilaksanakan (Murtianto & Chandra, 2008; Sathya Geetha & Krishnan, 2009; Hikmiyati & Yanie, 2010; Juwita &

Susilowati, 2011; Artiyani, 2011; Kongkiattikajorn & Sornvoraweat, 2011; Kongkiattikajorn, 2012) kurang berfokus pada proses konversi selulosa dan hemiselulosa menjadi bentuk gula sederhana. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini diarahkan untuk mendapatkan metode pretreatment yang efektif, efisien dan aplikatif serta ekonomis untuk menunjang proses hidrolisa dan dalam mengkonversi selulosa dan hemiselulosa serta polisakarida lain yang terkandung limbah kulit singkong menjadi bentuk gula sederhana yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan baku bioetanol.

METODOLOGI

Bahan baku utama dari penelitian ini adalah limbah kulit singkong dari PT. Indofood Fritolay Semarang. Kulit singkong ini dicuci, dikeringkan dengan sinar matahari kemudian ditepungkan, dikeringkan kembali dalam oven temperatur 55°C selama 12 jam untuk kemudian disimpan. Bahan baku lainnya adalah H_2SO_4 , Etanol, Sodium asetat (Merck) untuk proses pretreatment serta $CaCl_2 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4$, dan $(NH_4)_3PO_4$ (EM) untuk proses hidrolisa enzimatik.

Strain *Aspergillus spp* (*A. niger* dan *A. oryzae*) didapatkan dari koleksi Center of Biomass and Renewable Energy (C-BIORE), Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro. Strain ini disuplai dari Jurusan Pangan dan Nutrisi Universitas Gajah Mada, yang dipindahkan pada slant potato dextrose agar (PDA) dan disimpan pada suhu 4°C.

Proses diawali dengan pretreatment asam yaitu dengan mensuspensikan 5 gr tepung kulit singkong dalam 45 ml H_2SO_4 , kemudian

dipanaskan hingga temperatur sesuai variabel selama 30 menit (variabel waktu). Setelah itu, suspensi disaring, residunya dicuci dengan menggunakan NaOH untuk menetralkan pHnya. Pretreatment organosolv dilakukan dengan cara yang hampir sama yaitu mensuspensikan 5 gr tepung kulit singkong dalam 45 ml etanol yang sebelumnya telah ditambah CH_3COONa 0,05M. Suspensi kemudian dipanaskan hingga temperatur sesuai variabel selama 30 menit. Setelah itu, suspensi disaring, residunya dicuci dengan menggunakan aquades. Hidrolisa enzimatis dilakukan dengan menambahkan 1.5%w/v kulit singkong hasil pretreatment ke dalam 100 ml medium yang terdiri dari 1g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/l MgSO_4 , 2g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and 0.5g/l KH_2PO_4 . Kemudian medium disterilisasi dan diinokulasi dengan *Aspergillus spp.* Campuran kemudian diinkubasi selama 48 jam pada temperatur 35°C. Hasil fermentasi kemudian disentrifugasi untuk diambil supernatannya dan dianalisa.

Hasil penelitian dianalisis supernatannya untuk mengetahui gula tereduksi. Konsentrasi gula tereduksi diestimasi dengan menggunakan metode penentuan gula tereduksi DNS (Andersen, 2007). Analisa teknis dilakukan dengan mencatat fenomena yang terjadi selama proses penelitian berlangsung, terutama mengenai kendala-kendala yang di temui serta membandingkan keuntungan dan kelemahan proses pretreatment asam dan organosolv. Analisa ekonomi dilakukan dengan mengestimasi dari data hasil penelitian yaitu kondisi operasi proses pretreatment dan hidrolisa

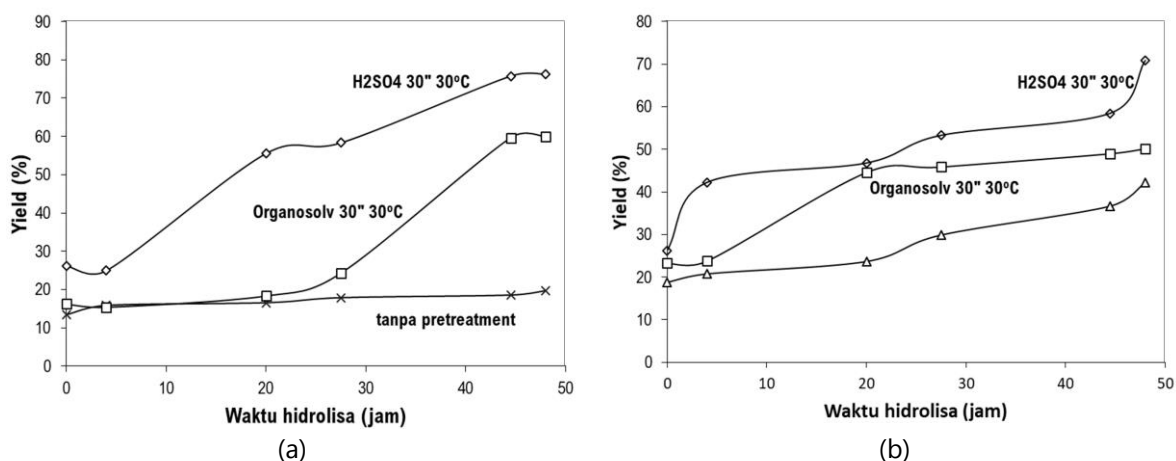
enzimatis, bahan kimia yang digunakan serta harga dan berapa kuantitas penggunaannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh proses pretreatment terhadap yield gula tereduksi

Penelitian ini membandingkan dua jenis metode pretreatment yaitu pretreatment asam (H_2SO_4) dan pretreatment organosolv (etanol+ CH_3COONa) yang dilakukan sebelum proses hidrolisa enzimatis. Setelah proses hidrolisa enzimatis menggunakan dua jenis mikroorganisme yaitu *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae*, efektifitas dari kedua proses pretreatment dalam mengkonversi komponen lignoselulosa menjadi gula sederhana dapat dibandingkan.. Gambar 1a menunjukkan pretreatment asam dengan H_2SO_4 0,1 M selama 30 menit pada suhu 30°C yang dilanjutkan dengan hidrolisa enzimatis dengan *Aspergillus niger* selama 48 jam, dapat menghasilkan yield yang lebih tinggi (76%) dibandingkan dengan pretreatment organosolv (Etanol+ CH_3COONa 0,05M) pada kondisi yang sama (60%).

Proses pretreatment baik asam maupun organosolv dapat meningkatkan yield gula tereduksi yang dihasilkan (min 40%) dibandingkan dengan proses hidrolisa enzimatis tepung kulit singkong tanpa pretreatment. Kecenderungan yang sama dapat dilihat pada gambar 1b dimana hidrolisa enzimatis memanfaatkan enzim dari mikroorganisme *Aspergillus oryzae*. Namun



Gambar 1 Perbandingan hasil gula tereduksi dari berbagai proses pretreatment setelah proses hidrolisa enzimatis dengan *Aspergillus niger* (a) dan *Aspergillus oryzae* (b) selama 48 jam

apabila dibandingkan dengan yield yang dihasilkan dari proses hidrolisa enzimatis tepung kulit singkong tanpa pretreatment, penambahan proses pretreatment baik asam maupun organosolv hanya dapat meningkatkan yield gula tereduksi 10-30% saja. Parameter utama dari hidrolisa enzimatis adalah terjadinya kontak fisik antara enzim dan ikatan molekul yang akan dihidrolisa. Kontak fisik lebih diterjemahkan pada luas permukaan kontak, kristalinitas substrat, ukuran partikel dan porositas substrat (Andersen, 2007). Pretreatment kimia seperti metode pretreatment asam (H_2SO_4) berfungsi untuk memutuskan ikatan kristalin dari struktur lignoselulosa. Berkurangnya struktur kristalin memberikan kesempatan kepada enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* dan *oryzae* untuk masuk kedalam substrat dan menjadi mediator reaksi hidrolisa. Hal ini terlihat dari adanya perbedaan yang cukup tinggi antara hasil hidrolisa sampel tanpa dan dengan pretreatment. Tren yang sama dikemukakan oleh Zhang *et al.* (2006) yang menginvestigasi pengaruh metode pretreatment asam (H_3PO_4) terhadap proses hidrolisa. Terdapat perbedaan hasil hidrolisa yang cukup signifikan antara sampel selulosa tanpa pretreatment dibandingkan dengan sampel selulosa dengan pretreatment asam (H_3PO_4). Hal ini terjadi karena pretreatment asam dapat merusak struktur kristalin pada substrat dan menyediakan luas permukaan yang lebih luas untuk enzim dalam mengkatalisasi proses hidrolisa (Zhang, *et.al* 2006). Sementara itu, pretreatment organosolv (Etanol + CH_3COONa) berfungsi untuk melarutkan lignin yang merupakan bagian dari material lignoselulosa (15-28%) dan berikatan silang dengan hemiselulosa. Seperti halnya dengan pretreatment asam, terlarutnya lignin dapat menyediakan luas permukaan yang cukup besar kepada enzim dalam mengkatalisasi proses hidrolisa. Selain itu substrat utama yaitu selulosa dan hemiselulosa lebih mudah diakses saat komponen lignin terlarut dalam solven organik dalam hal ini etanol (Zhao, *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016).

Data pada gambar 1 juga memperlihatkan pretreatment asam menghasilkan yield gula tereduksi yang lebih tinggi dibandingkan dengan pretreatment organosolv. Hal yang sama didapatkan oleh Olanbiwoninu dan Odunfa (2012)

yang menggunakan asam sulfat sebagai bagian dari pretreatment asam sebelum proses hidrolisa enzimatis dengan *Pseudomonas fluorescens* dan *Aspergillus terreus*. Asam sulfat dan beberapa jenis asam lainnya menyediakan ion hidrogen tambahan untuk membentuk asam konjugasi, yang membentuk celah pada ikatan glikosidik. Hal ini dapat mendesktruksi ikatan kristalin pada substrat. Molekul air pada sistem juga dapat membantu proses desktruksi ini. Sehingga luas permukaan dan akses yang dibentuk dalam substrat semakin banyak dibandingkan dengan pretreatment organosolv yang hanya mampu melarutkan lignin (Wyman, 2006; Sun, *et al.*, 2016).

Optimasi proses pretreatment

Dua proses pretreatment yaitu pretreatment asam dan organosolv yang dilakukan sebelum proses hidrolisa enzimatis terbukti dapat meningkatkan yield gula tereduksi (10-50%) untuk nantinya dapat diproses lebih lanjut hingga menghasilkan etanol. Secara umum terdapat dua parameter utama yang mempengaruhi gula tereduksi yang dihasilkan setelah proses pretreatment yaitu suhu dan lama proses tersebut berlangsung (Gambar 2).

Gambar 2a menunjukkan pengaruh waktu pretreatment terhadap gula tereduksi yang dihasilkan sebelum dan setelah proses hidrolisa enzimatis dengan *Aspergillus niger* selama 48 jam. Kecenderungan antara pretreatment asam dan organosolv berbeda pada variasi waktu proses. Yield dari bahan baku tepung kulit singkong yang dipretreatment dengan organosolv cenderung meningkat seiring dengan penambahan waktu operasi, sebaliknya yield dari bahan baku tepung kulit singkong yang dipretreatment dengan asam cenderung menurun. Tren yang sama ditemukan pada proses hidrolisa enzimatis dengan *Aspergillus oryzae* (Gambar 2c).

Parameter lain yang mempengaruhi yield gula tereduksi adalah suhu proses pretreatment. Proses pretreatment asam menggunakan variasi suhu proses 30-90°C, sementara proses pretreatment organosolv menggunakan variasi suhu 30-60°C, dikarenakan proses pretreatment organosolv melibatkan etanol yang memiliki titik didih 60°C. Gambar 2b dan d memperlihatkan pengaruh suhu terhadap gula tereduksi yang dihasilkan sebelum dan setelah proses hidrolisa

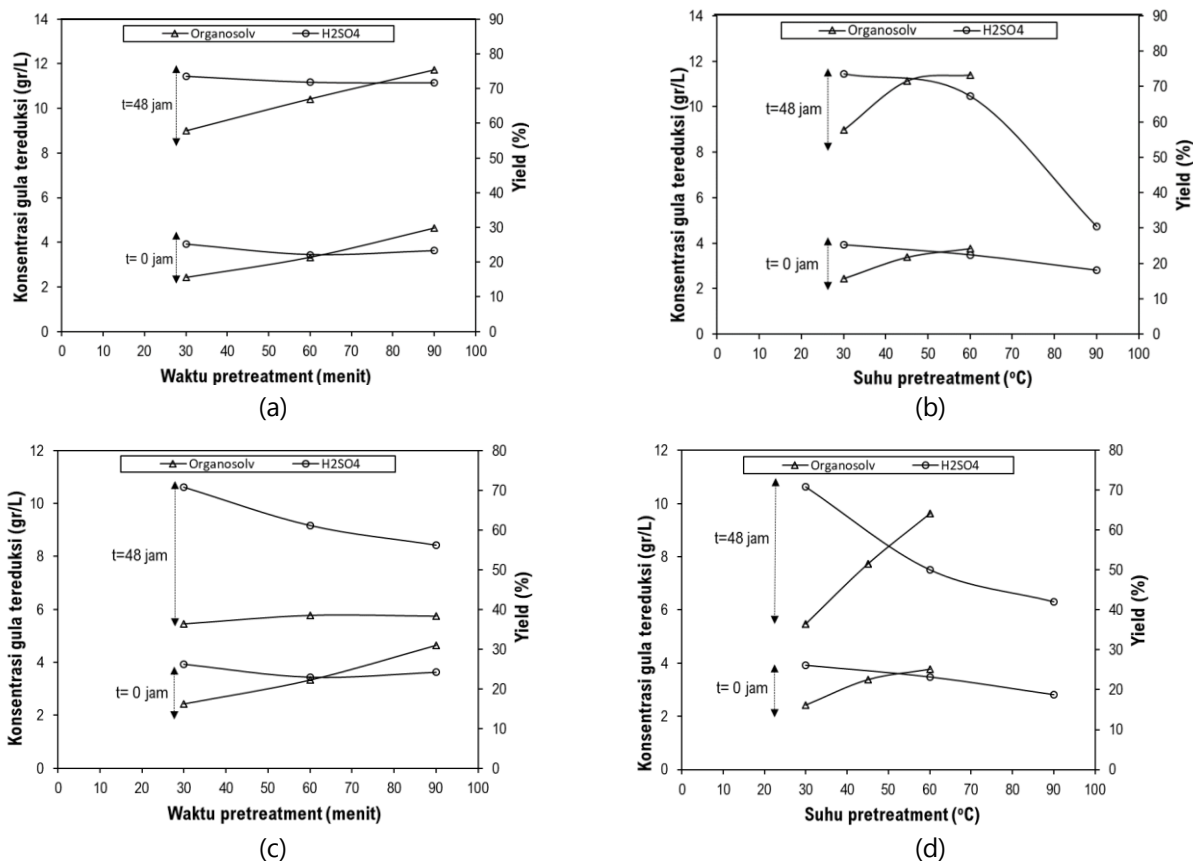
enzimatik dengan *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae* selama 48 jam. Tren yang sama diperoleh dari hasil penelitian dengan kedua jenis mikroorganisme tersebut. Peningkatan suhu proses berpengaruh terhadap peningkatan yield gula tereduksi pada bahan baku yang ditreatment menggunakan organosolv, sedangkan yield gula tereduksi pada bahan baku yang ditreatment menggunakan asam cenderung menurun seiring dengan peningkatan suhu.

Mekanisme pretreatment organosolv dengan etanol dan CH_3COONa lebih dititik beratkan pada proses pelarutan lignin pada etanol. Proses pelarutan lignin sangat dipengaruhi oleh suhu dan waktu operasi, sehingga semakin tinggi suhu dan waktu operasi, yield gula tereduksi yang dihasilkan juga semakin tinggi (Quesada *et al.*, 2010). Sedangkan, mekanisme yang ditekankan pada proses pretreatment asam menggunakan H_2SO_4 adalah mekanisme destruksi struktur kristalin dari komponen lignoselulosa. Waktu dan suhu proses secara umum dapat

meningkatkan proses destruksi kristalin material lignoselulosa (Wyman, 2006; Xu *et al.*, 2015). Namun pada penelitian ini tren yang diamati terbalik, hal ini dimungkinkan akibat proses destruksi ini menghasilkan komponen lain selain monomer gula yang mempengaruhi proses hidrolisa enzimatik. Penelitian lebih lanjut mengenai komponen-komponen yang dihasilkan setelah proses pretreatment diperlukan untuk menjelaskan fenomena ini.

Analisis teknis dan ekonomis proses pretreatment

Dua metode pretreatment yang telah diteliti masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan yang dianalisa selama proses penelitian. Proses pretreatment asam, melibatkan bahan kimia asam sulfat yang sangat berbahaya sedangkan proses pretreatment organosolv melibatkan bahan kimia yaitu etanol yang cukup mahal. Tinjauan teknis dan ekonomis dari kedua proses dapat dilihat pada Table 1 dan 2.



Gambar 2. Pengaruh waktu (a,c) dan suhu (b,d) pretreatment terhadap gula tereduksi yang dihasilkan sebelum dan setelah proses hidrolisa enzimatik dengan *Aspergillus niger* (a,b) dan *oryzae* (c,d) selama 48 jam

Tabel 1. Kajian teknis berbagai metode pretreatment

Pretreatment	Kajian Teknis		
	Penanganan bahan kimia	Penanganan saat Pretreatment	Pencucian
Organosolv (Etanol + H_3COONa)	Cukup mudah dalam penyimpanan, etanol tetap dalam keadaan layak dipakai walaupun disimpan dalam waktu yang lama, dan disarankan untuk menyimpan ditempat yang rapat dan dijauhkan dari benda yang mudah terbakar karena etanol mudah untuk menguap. Sedangkan CH_3COONa , yang berbentuk padatan, cukup dengan dihindarkan kontak dengan air dan udara	Perlu pengawasan yang teliti karena titik didih metanol berada pada suhu 60°C	Lebih mudah untuk dinetralkan, tidak memerlukan air dalam jumlah banyak dalam proses pencucian untuk menetralkan pH.
H_2SO_4	Memerlukan teknik khusus dalam penyimpanan, tidak dianjurkan untuk menyimpannya dalam waktu lama karena berpengaruh terhadap kualitasnya.	Titik didih tinggi, yaitu 290°C , namun larutan asam dapat mengalami penguraian apabila terkena panas dan mengeluarkan gas SO_2 .	Memerlukan volume air yang cukup banyak untuk menetralkan pH setelah proses.

Tabel 2. Kajian ekonomi berbagai metode pretreatment

Parameter	Pretreatment asam (H_2SO_4)	Pretreatment organosolv (Etanol + CH_3COONa)
Yield yang dihasilkan (optimum)	78%	74%
Waktu proses	30 menit	90 menit
Kebutuhan air (proses pencucian)	180 mL/gr bahan baku	60 mL/gr bahan baku
Kebutuhan reagen	0.05mL/gr bahan baku	9mL/gr bahan baku

KESIMPULAN

Penelitian untuk mengetahui efektifitas proses pretreatment dan hidrolisa untuk mengkonversi lignoselulosa yang terkandung dalam kulit singkong menjadi bentuk gula sederhana yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan baku bioetanol telah dilaksanakan. Metode pretreatment asam (H_2SO_4) dan organosolv (Etanol + CH_3COONa) terbukti dapat meningkatkan yield gula tereduksi hingga 50% dibandingkan dengan proses hidrolisa tanpa pretreatment. Yield hingga 78% dapat diperoleh

pada proses pretreatment asam (H_2SO_4) suhu 30°C , waktu 30 menit yang dilanjutkan dengan hidrolisa enzimatis dengan *Aspergillus niger* selama 48 jam. Peningkatan yield pada proses pretreatment organosolv (optimum 74% pada suhu 30°C , waktu 90 menit) masih dapat dilakukan dengan meningkatkan waktu operasi dan meningkatkan suhu operasi. Namun peningkatan suhu maupun penambahan waktu operasi berpengaruh terhadap analisa teknis dan ekonomis dari proses. Secara teknis, pretreatment organosolv lebih mudah dilakukan terutama pada proses dengan kondisi operasi atmosferik

dibandingkan dengan pretreatment asam karena sifat bahan kimia yang digunakan dan penanganannya. Secara ekonomis, pretreatment asam lebih baik untuk diaplikasikan dibandingkan pretreatment organosolv, hal ini dikarenakan bahan kimia yang digunakan lebih sedikit secara kuantitas dan lebih murah. Selain itu, yield proses pretreatment asam lebih tinggi apabila dibandingkan pada waktu proses yang sama.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Dinas Pendidikan, Pemerintah Provinsi Jawa Tengah atas pendanaan riset ini melalui Program Penelitian Dosen Muda (PPDM).

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, N. 2007. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Experimental and Modeling Studies., Ph.D. Thesis BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark.
- Artiyani, A. 2011. Bioetanol dari limbah kulit singkong melalui proses hidrolisis dan fermentasi dengan *saccharomyces cerevisiae*. Tesis. Program Magister Jurusan Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi [BPPT]. 2018. Outlook Energi Indonesia 2018. Pusat Pengkajian Industri Proses dan Energi (PPIPE). Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT). ISBN 978-602-1328-05-7
- Badan Pusat Statistik [BPS]. 2018. Provinsi Jawa Tengah dalam Angka 2018. www.bps.go.id.
- Hikmiyati, N., & Yanie, N.S. 2010. Pembuatan bioetanol dari limbah kulit singkong melalui proses hidrolisa asam dan enzimatis. Skripsi. Jurusan Teknik Kimia, Fak. Teknik, Universitas Diponegoro.
- Juwita, A.A., & Susilowati, C. 2011. Bioetanol dari ampas dan kulit singkong. Skripsi. Jurusan Teknik Kimia, Fak. Teknik, Universitas Diponegoro.
- Kongkiattikajorn, J., 2012., Ethanol Production from Dilute-Acid Pretreated Cassava Peel by Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation., *International Journal of the Computer, the Internet and Management*, 20 (2): 22-27
- Kongkiattikajorn, J. & Sornvoraweat, B., 2011., Comparative Study of Bioethanol Production from Cassava Peels by Monoculture and Co-Culture of Yeast. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*, 45:268-274
- Murtianto, B.W. & Aria Chandra, B. 2008. Production of bioethanol from cassava peel waste (cpw) by using sweet corn enzyme powder. Semesta Bilingual Boarding School.
- Olanbiwoninu, A.A, & Odunfa, S.A., 2012, Enhancing the Production of Reducing Sugars from Cassava Peels by Pretreatment Methods., *International Journal of Science and Technology*, 2(9):650-657.
- Quesada-Medina, J., López-Cremades, F.J. & Olivares-Carrillo, P., 2010. Organosolv extraction of lignin from hydrolyzed almond shells and application of the δ -value theory. *Bioresource technology*, 101(21), pp.8252-8260.
- Geetha, G.S., & Krishnan, A.N.G. 2009. Diluted acid hydrolysis and steam explosion of Manihot esculenta peeling waste for bio ethanol production. Centre for Environmental Studies, Anna University.
- Sun, F.F., Tang, S., Liu, R., Tang, Y., Wang, R., Zhang, Z., Gao, Z., Li, H., Li, C & Xiao, Z. 2016. Biorefining fractionation of the *Camellia oleifera* Abel. hull into diverse bioproducts with a two-stage organosolv extraction. *Industrial Crops and Products*. 94:790-799.
- Wyman, C.E., Decker, S.R., Himmel, M.E., Brady, J.W., Skopec, C.E., & Viikari, L., 2006., Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. Chapter book.
- Xu, G., Wang, A., Pang, J., Zheng, M., Yin, J., & Zhang, T. 2015. Remarkable effect of extremely dilute H₂SO₄ on the cellulose conversion to ethylene glycol. *Applied Catalyst A: General*. 502: 65-70.
- Zhao, X., Cheng, K. & Liu, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis., *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82:815-827
- Zhang, Y.H.P., Cui J., Lynd, L.R. & Kuang, L.R. 2006. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*. 7: 644-648.

Zhang, Z., Harrison, M.D., Rackemann, D.W.,
Doherty, W.O.S & O'Hara, I.A. 2016.
Organosolv pretreatment of plant biomass for

enhanced enzymatic saccharification. *Green
Chemistry*. 18(2):360-381