

Artikel Penelitian

## Pengaruh *Pretreatment* Iradiasi *Microwave* pada Hidrolisis Kitosan dengan Enzim *Cellulase*

*The Effect of Microwave Irradiation Pretreatment on Chitosan Hydrolysis using Cellulase Enzyme*

Nur Rokhati<sup>1\*</sup>, Bambang Pramudono<sup>1</sup>, Mohammad Sulchan<sup>2</sup>, Anggara Eka Permana<sup>1</sup>, Suryo Tetuko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro, Semarang

<sup>2</sup>Jurusan Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang

\*Korespondensi dengan penulis ([nur.rokhati@gmail.com](mailto:nur.rokhati@gmail.com))

Artikel ini dikirim pada tanggal 20 Juni 2016 dan dinyatakan diterima tanggal 7 November 2016. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui [www.jatp.ift.or.id](http://www.jatp.ift.or.id). Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Diproduksi oleh Indonesian Food Technologists® ©2017

### Abstrak

Kitosan merupakan polimer alam yang diperoleh dari proses deasetilasi kitin yang terkandung di dalam cangkang binatang invertebrata terutama crustacea seperti udang dan rajungan. Karena sifatnya yang *biocompatible*, *biodegradable*, *bioaktivitas*, dan tidak beracun, kitosan telah digunakan secara luas dalam berbagai bidang seperti pangan, nutrisi, farmasi, medis, dan pertanian. Kitosan memiliki berat molekul yang tinggi, viskositas tinggi, dan kelarutan di dalam air yang rendah, sehingga akan menghambat aplikasinya. Salah satu metode yang umum dilakukan untuk menurunkan berat molekul kitosan adalah hidrolisis enzimatis. Kelemahan dari metode ini adalah laju reaksi yang lambat. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pretreatment iradiasi microwave pada hidrolisis enzimatis kitosan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pretreatment iradiasi microwave dapat meningkatkan laju penurunan berat molekul dan viskositas larutan kitosan. Hidrolisis kitosan dengan pretreatment iradiasi microwave pada power 120 watt selama 9 menit dapat meningkatkan kelarutan kitosan dalam air dari 0,02% menjadi 0,26% (berat/volume). Analisis FTIR menunjukkan bahwa struktur kimia produk hidrolisis mirip dengan kitosan awal.

Kata kunci : *pretreatment*; *microwave*; *kitosan*; *hidrolisis*; *cellulase*

### Abstract

*Chitosan is a natural polymer obtained from the deacetylation of chitin contained in shells of invertebrates, especially crustaceans such as shrimp and crab. Because it is biocompatible, biodegradable, bioactivity, and non-toxic, chitosan has been widely used in various fields such as food, nutritional, pharmaceutical, medical, and agriculture. Chitosan has a high molecular weight, high viscosity, and solubility in water is low, so it will hamper application. One common method to lower the molecular weight of chitosan is the enzymatic hydrolysis. The disadvantage of this method is the reaction rate is slow. This study aims to assess the microwave irradiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of chitosan. The results showed that pretreatment microwave irradiation can increase the rate of decrease in molecular weight and viscosity of chitosan solution. Pretreatment of chitosan hydrolysis with microwave irradiation at 120 watts power for 9 minutes can increase the solubility of chitosan in water from 0.02% to 0.26% (weight / volume). FTIR analysis showed that the hydrolysis products of the chemical structure is similar to the initial chitosan.*

Keywords: *pretreatment*; *microwave*; *chitosan*; *hydrolysis*; *cellulase*

### Pendahuluan

Kitosan merupakan polisakarida alami yang terdiri dari 2 jenis monomer dengan ikatan  $\beta$ -1,4 antara 2-amino-2-deoksi-D-glukopyranosa dan 2-acetamido-2-deoksi-D-glukopyranosa yang perbandingannya tergantung pada derajat deasetilasi. Kitosan merupakan produk turunan kitin yang terkandung di dalam cangkang binatang invertebrata terutama *crustacea* seperti udang dan rajungan yang telah mengalami proses deasetilasi. Kitosan telah digunakan secara luas dalam berbagai bidang aplikasi seperti dalam bidang nutrisi (suplemen dan sumber serat), bidang pangan (*nutraceutical*, *flavor*, pembentuk tekstur, *emulsifier*, penjernih minuman, *antimicrobial*), bidang medis (*contact-lens*, membran untuk dialisis darah, anti-tumor, penurun kolesterol, mencegah diabetes melitus), bidang lingkungan dan pertanian (*fertilizer* dan fungisida). Hal ini dikarenakan sifat dari kitosan yang

*biocompatible*, *biodegradable*, *bioaktivitas*, dan tidak beracun (Prasertsung *et al.* 2013).

Kitosan memiliki berat molekul dan viskositas tinggi, serta kelarutan yang rendah di dalam air atau larutan dengan pH relatif netral. Hal ini menghambat pengaplikasian kitosan. Kitosan dengan berat molekul rendah (LMWC/*low molecular weight chitosan*) tanpa mengubah struktur kimianya, menunjukkan tingkat kelarutan yang cukup tinggi di dalam air, meningkatkan sifat bioaktivitasnya seperti anti-tumor, anti mikroba, dan anti-radang (Xie *et al.* 2009; Prasertsung *et al.* 2013).

Salah satu metode yang umum dilakukan untuk menurunkan berat molekul adalah hidrolisis. Hidrolisis kitosan merupakan proses dekomposisi kimia dari kitosan yang terjadi karena adanya pemutusan ikatan glikoksida yang menghubungkan antar monomer dalam polimer kitosan melalui reaksi dengan air sehingga

membentuk bagian-bagian penyusun yang lebih sederhana dan memiliki berat molekul yang lebih rendah. Hidrolisis parsial kitosan menghasilkan oligomer berupa rantai oligoglukosamine sedangkan hidrolisis sempurna kitosan menghasilkan monomer glukosamine dan asetilglukosamine (Sun *et al.* 2013).

Hidrolisis kitosan dapat dilakukan dengan beberapa teknik, diantaranya hidrolisis kimia, hidrolisis enzimatis, hidrolisis iradiasi, dan hidrolisis oksidatif. Hidrolisis kimia seperti menggunakan larutan asam, memiliki masalah dalam limbah kimia yang dihasilkan seperti kontaminasi lingkungan dan menyebabkan korosi pada alat proses. Hidrolisis oksidatif seperti menggunakan hidrogen peroksida memiliki kelebihan dalam proses yang sederhana dan relatif ramah lingkungan, namun kekurangannya yaitu beberapa reaksi samping dapat terjadi selama hidrolisis dan dapat mengubah struktur kimia dari kitosan. Hidrolisis enzimatis memiliki kelebihan yaitu dalam menghasilkan produk hidrolisis yang spesifik dan proses dilakukan pada kondisi kamar. Sedangkan hidrolisis iradiasi memiliki keunggulan dalam hal yield produk yang tinggi (Li *et al.* 2012; Prasertsung *et al.* 2013).

Hidrolisis enzimatis kitosan merupakan proses hidrolisis dengan bantuan enzim. Jenis enzim spesifik yang dapat digunakan dalam hidrolisis kitosan adalah chitosanase dan  $\beta$ -D-glucosaminidase (Sun *et al.* 2013). Namun saat ini enzim tersebut masih mahal dan ketersediaannya terbatas. Maka muncul penelitian-penelitian hidrolisis kitosan dengan menggunakan enzim lain, diantaranya enzim lipase, selulase,  $\alpha$ -amilase, pektinase, pepsin, protease netral, dan papain. (Oviedo *et al.* 2007; Su *et al.* 2013; Wasikiewicz & Yeates 2013).

Untuk meningkatkan yield pada konsentrasi kitosan yang sama maka dilakukan suatu tahap *pretreatment* dengan tujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim pada proses hidrolisis. Peningkatan aktivitas enzim pada proses hidrolisis disebabkan melemahnya ikatan glikoksida antar monomer pada polimer kitosan. Salah satu jenis *pretreatment* yaitu iradiasi *microwave* (Ha *et al.* 2011; Tsubaki & Azuma 2013). Teknologi iradiasi *microwave* sudah diakui sebagai alat yang sangat membantu dalam proses sintesis organik dan proses yang melibatkan polimer (Ha *et al.* 2011). Pada penelitian ini dikaji pengaruh *pretreatment* dengan menggunakan iradiasi *microwave* pada proses hidrolisis kitosan dengan enzim *cellulase*.

## Materi dan Metode

### Materi

Bahan yang digunakan yaitu kitosan produksi PT. Biotech Surindo, Cirebon, Indonesia (DD  $\approx$  80,4%), asam asetat glasial, natrium asetat, NaOH (99%). Enzim *cellulase*,  $K_3[Fe(CN)_6]$ , dan glukosamine dari Sigma Aldrich. Alat yang digunakan yaitu Sharp Microwave Oven R-222Y(W), *Shaker* merk Wisecube, *UV-Vis Spectronic-20*, *FTIR Perkin Elmer Spectrofotometer*, magnetic stirer, termometer, dan alat gelas.

### Metode

Penelitian berlangsung selama periode September 2015 – Maret 2016. Penelitian ini meliputi proses hidrolisis kitosan, uji gula pereduksi, uji viskositas, penentuan nilai berat molekul, uji FTIR, dan uji kelarutan.

### Hidrolisis Kitosan

Kitosan dilarutkan ke dalam larutan buffer asetat pH 5 dengan konsentrasi 1% w/v larutan. Larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian diiradiasi dengan *microwave* pada variabel power (40, 120) watt dan waktu (3,6, dan 9) menit. Setelah diiradiasi, larutan ditambahkan enzim *cellulase* dengan perbandingan enzim:substrat (1:100) w/w. Larutan dihidrolisis selama 24 jam pada kondisi operasi 50°C, pH 5. Larutan yang sudah terhidrolisis direndam dalam air mendidih selama 10 menit untuk menonaktifkan enzim. Kemudian larutan dibagi dua bagian yaitu pertama untuk uji gula pereduksi dan uji viskositas, sedangkan yang kedua larutan diendapkan dengan menambahkan larutan NaOH lalu endapan dikeringkan untuk uji FTIR dan uji kelarutan.

### Uji Gula Pereduksi

Uji gula pereduksi dilakukan untuk mengetahui banyaknya pemotongan rantai polimer kitosan. Pemotongan rantai polimer akan menghasilkan gugus aldehid yang memiliki sifat pereduksi. Penentuan jumlah gula pereduksi dilakukan dengan menggunakan metode *Schales* (Imoto & Yagishita, 1971). 3 ml sampel larutan kitosan ditambahkan 4 ml larutan *Schales* (0,5 gram potasium ferisianida dalam 1 liter sodium karbonat 0,5 M). Kemudian larutan dididihkan selama 15 menit. Larutan didinginkan dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Larutan standar yang digunakan adalah glukosamine HCl.

### Uji viskositas

Penentuan viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskosimeter ostwald. Aquadest dimasukkan ke dalam viskosimeter kemudian diukur waktu laju alirnya. Setelah itu sampel larutan kitosan yang telah dihidrolisis dimasukkan ke dalam viskosimeter dan diukur waktu laju alirnya. Nilai viskosimeter ditentukan dengan persamaan :

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Keterangan :

- $\eta_{sp}$  = viskositas spesifik
- t = waktu laju alir sampel
- $t_0$  = waktu laju alir aquadest

### Penentuan Nilai Berat Molekul

Viskositas intrinsik dapat ditentukan dengan mengukur viskositas spesifik pada beberapa konsentrasi dan mengekstrapolasi grafik  $\eta_{sp}/c$  versus c pada konsentrasi sama dengan nol.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k'[\eta]^2 c$$

Setelah mengetahui viskositas instrinsik, maka BM kitosan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan Mark Houwink.

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Keterangan :

$[\eta]$  = viskositas intrinsik  
K =  $3,5 \times 10^{-4}$  ml/g  
M = BM  
 $\alpha$  = 0,76

#### Uji FTIR

Pengamatan terhadap gugus fungsional menggunakan uji *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR). Pada uji ini diamati panjang gelombang untuk mengetahui keberadaan gugus fungsional yang terkandung dalam kitosan. Pada kitosan akan diamati spektrum dari gugus OH dan NH<sub>2</sub>.

#### Uji Kelarutan

Padatan kitosan sebanyak 1 gram dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest. Diaduk menggunakan magnetic stirrer selama 24 jam. Setelah itu larutan disaring, lalu padatan dikeringkan. Padatan ditimbang sampai diperoleh berat kosntan. Selisih antara berat kertas saring awal dan berat padatan dengan kertas saring adalah hasil dari kelarutan kitosan dalam aquadest.

#### Hasil dan Pembahasan

Pengaruh power dan waktu iradiasi *microwave* terhadap hasil akhir proses hidrolisis berupa jumlah gula pereduksi dan nilai viskositas larutan ditunjukkan Gambar 1, 2, 3, dan 4. Iradiasi *microwave* mentransfer sejumlah energi secara langsung dan cepat ke dalam larutan kitosan berdasarkan pada power dan waktu operasi yang digunakan (Tsubaki & Azuma 2013). Pada penelitian ini digunakan power *microwave* sebesar 40 dan 120 watt dengan waktu iradiasi 3, 6, dan 9 menit. Pemilihan waktu dan power operasi iradiasi *microwave* didasarkan pada temperatur akhir larutan yang dihasilkan setelah melalui tahap *pretreatment*. Larutan kitosan dengan *pretreatment* power iradiasi 40 watt dan 120 watt dengan waktu iradiasi 9 menit menghasilkan temperatur akhir larutan sebesar 35°C dan 71°C. Jika digunakan waktu iradiasi yang lebih lama dan power yang lebih tinggi diperkirakan akan terjadi penguapan pada larutan kitosan yang mengakibatkan kurang akuratnya nilai viskositas larutan yang dihasilkan.

Peningkatan temperatur pada larutan kitosan disebabkan adanya vibrasi molekul pada larutan kitosan yang dipengaruhi gerakan osilasi gelombang mikro (*microwave*). Vibrasi ini menimbulkan singgungan antar molekul yang menghasilkan panas sehingga temperatur larutan menjadi meningkat (Wasikiewicz & Yeates, 2013).

Perbedaan nilai viskositas dan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan pada 40 watt dan 120 watt disebabkan adanya perbedaan jumlah energi yang ditransfer ke dalam larutan kitosan. Pada power 40 watt dengan waktu iradiasi 9 menit, energi yang ditransfer sebesar 21,6 kJ, sedangkan pada power 120 watt untuk waktu iradiasi yang sama, energi yang ditransfer sebesar 64,8 kJ. Energi ini yang menyebabkan terjadinya perenggangan ikatan glikoksida pada kitosan (Ha *et al.* 2011). Semakin besar energi yang ditransfer maka semakin banyak ikatan glikoksida yang melemah sehingga pada proses hidrolisis enzimatis, jumlah ikatan glikoksida yang terputus semakin banyak. Semakin banyaknya ikatan glikoksida yang terputus pada saat hidrolisis enzimatis menyebabkan semakin menurunnya nilai viskositas larutan dan meningkatnya jumlah gula pereduksi. Hal inilah yang menyebabkan peningkatan jumlah gula pereduksi dan penurunan nilai viskositas pada power 120 watt lebih besar dibandingkan dengan power 40 watt (Ha *et al.* 2011).

Perbedaan energi yang ditransfer akan menghasilkan perbedaan temperatur akhir larutan kitosan setelah melalui tahap *pretreatment*. Pada power 40 watt dengan waktu iradiasi 3 menit didapatkan temperatur akhir larutan T = 27°C; waktu iradiasi 6 menit T = 31°C; dan waktu iradiasi 9 menit T = 35°C. Jumlah energi yang ditransfer untuk power 40 watt dengan waktu iradiasi (3, 6, dan 9) menit sebesar (21,6; 43,2; dan 64,8) kJ. Energi yang ditransfer menyebabkan vibrasi pada molekul kitosan yang dipengaruhi oleh gerakan osilasi gelombang mikro (*microwave*). Vibrasi ini menimbulkan gesekan yang menghasilkan panas sehingga temperatur larutan menjadi meningkat (Wasikiewicz & Yeates 2013). Dengan demikian, semakin besar energi yang ditransfer maka temperatur akhir larutan kitosan akan semakin meningkat.

Sejumlah energi yang ditransfer mengakibatkan terjadinya pemanasan secara internal pada larutan kitosan sehingga ikatan glikoksida pada rantai polimer menjadi lebih renggang/melemah (Ha *et al.* 2011). Dengan melemahnya ikatan glikoksida ini, ikatan tersebut menjadi lebih mudah untuk diputus pada proses hidrolisis enzimatis menggunakan enzim *cellulase*. Semakin banyak ikatan glikoksida yang terputus maka semakin besar penurunan nilai viskositas larutan dikarenakan berat molekul (BM) kitosan menjadi lebih kecil dan semakin banyak jumlah gula pereduksi yang dihasilkan (Su *et al.* 2013).

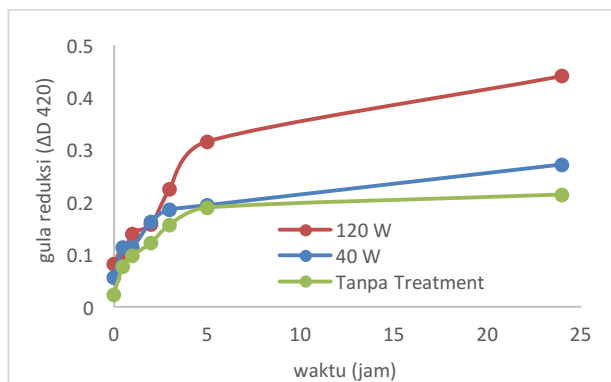
Tabel 1 menunjukkan adanya pengaruh *pretreatment* iradiasi *microwave* terhadap hasil proses hidrolisis enzimatis menggunakan enzim *cellulase*. *Pretreatment* iradiasi *microwave* memberikan pengaruh berupa perenggangan ikatan glikoksida pada rantai polimer kitosan sehingga ikatan tersebut menjadi lemah

Tabel 1. Perbandingan karakteristik kitosan

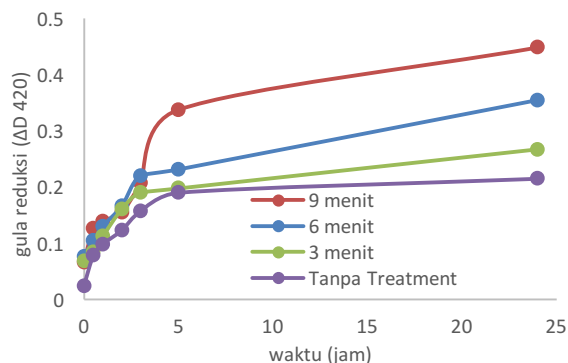
Karakteristik	Gula Pereduksi (g /g kitosan)	Viskositas (cp)	BM (kD)	Kelarutan (%)
Sebelum Hidrolisis	0,007	49,3	126,9	0,02
Hidrolisis Dengan <i>Pretreatment</i>	0,101	3,24	46,44	0,26

dan lebih mudah untuk diputus pada saat proses hidrolisis (Ha *et al.* 2011). Pengaruh ini dapat dibuktikan dari perbedaan nilai gula pereduksi dan viskositas larutan yang dihasilkan setelah proses hidrolisis. Jumlah gula pereduksi dan penurunan viskositas larutan kitosan dengan *pretreatment microwave* lebih tinggi dibandingkan dengan larutan tanpa *pretreatment microwave*.

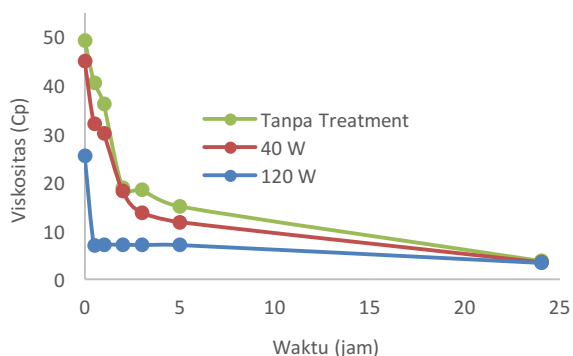
dengan menurunnya nilai viskositas larutan (Oviedo *et al.* 2007). Selain itu, pemutusan ikatan glikoksida juga mempengaruhi jumlah gula pereduksi yang ada karena setiap pemutusan ikatan glikoksida menghasilkan gugus aldehid pada ujung rantai yang bersifat pereduksi (Su *et al.* 2013). Dengan menurunnya berat molekul (BM) kitosan maka kelarutannya dalam aquadest menjadi semakin tinggi. Hal ini dikarenakan gugus aldehid yang terbentuk akibat pemutusan ikatan glikoksida bersifat polar. Sifat polar ini yang menjadikan kitosan lebih mudah berinteraksi dengan air sehingga kitosan lebih mudah larut (Rochima, 2007).



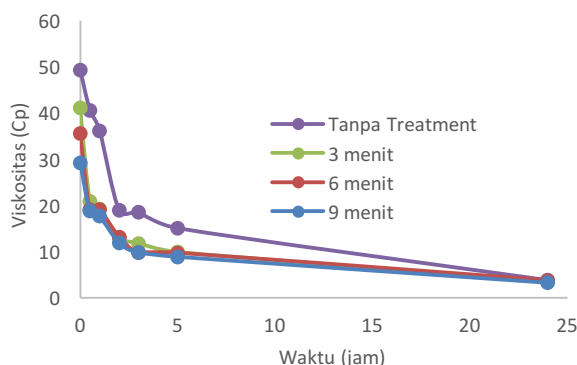
Gambar 1. Pengaruh power iradiasi terhadap jumlah gula pereduksi



Gambar 3. Pengaruh waktu iradiasi terhadap jumlah gula pereduksi

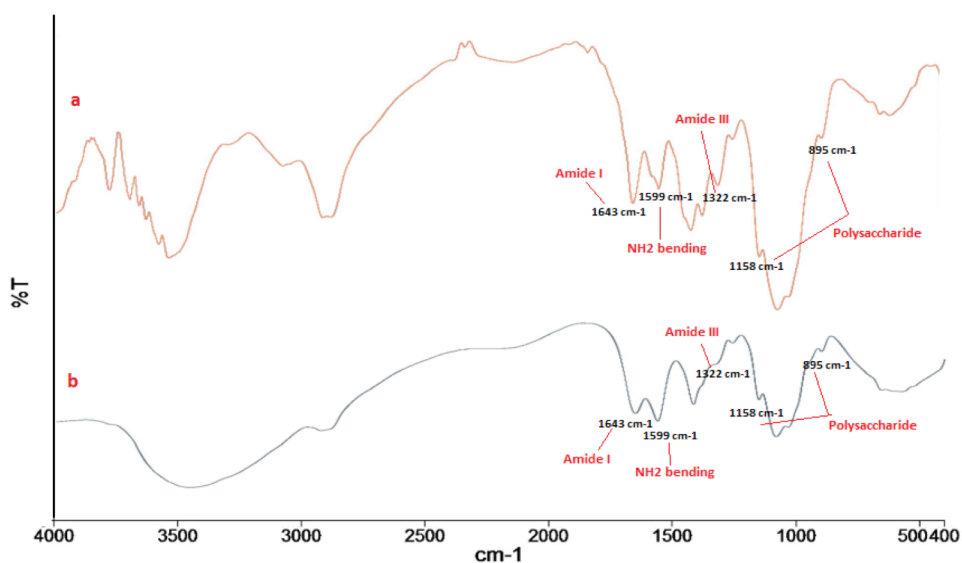


Gambar 2. Pengaruh power iradiasi terhadap nilai akhir viskositas larutan



Gambar 4. Pengaruh waktu iradiasi terhadap nilai akhir viskositas larutan

Pemutusan ikatan glikoksida pada saat hidrolisis menyebabkan turunnya berat molekul (BM) kitosan sehingga larutan kitosan lebih encer yang ditandai



Gambar 5. Hasil analisis FTIR (a) Kitosan awal; (b). Kitosan dengan iradiasi *microwave*

Analisis struktur kimia kitosan dengan FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*) sebelum dan sesudah hidrolisis ditunjukkan pada Gambar 5. Hasil analisis FTIR pada puncak absorbansi  $3540,26\text{ cm}^{-1}$ ;  $3439,97\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya N-H dan O-H *stretch* pada kitosan awal dan kitosan hasil *pretreatment* iradiasi *microwave*. Absorbansi  $2915,92\text{ cm}^{-1}$ ;  $2920,19\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan adanya C-H *stretch* pada kitosan awal dan kitosan hasil *pretreatment* iradiasi *microwave*. Adanya N-H *bend* ditunjukkan oleh absorbansi  $1662,93\text{ cm}^{-1}$  pada kitosan awal dan  $1650,54\text{ cm}^{-1}$  pada kitosan hasil *pretreatment* iradiasi *microwave*. Absorbansi  $1559,07\text{ cm}^{-1}$ ;  $625,38\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan adanya  $\text{NH}_2$  *bend* pada kitosan awal dan  $1560,31\text{ cm}^{-1}$ ;  $655,42\text{ cm}^{-1}$  pada kitosan hasil *pretreatment* iradiasi *microwave* (Chen *et al.* 2012). Adanya C-N ditunjukkan oleh absorbansi  $1319,71\text{ cm}^{-1}$  pada kitosan awal dan  $1258,04\text{ cm}^{-1}$  pada kitosan hasil *pretreatment* iradiasi *microwave* (Lizardi-Mendoza *et al.* 2016).

### Kesimpulan

Hidrolisis kitosan dengan *pretreatment* iradiasi *microwave* pada power 120 watt selama 9 menit dapat meningkatkan kelarutan kitosan dalam air dari 0,02% menjadi 0,26% (berat/volume). Analisis FTIR menunjukkan bahwa struktur kimia produk hidrolisis mirip dengan kitosan awal.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia atas bantuan dana penelitian unggulan Perguruan Tinggi tahun anggaran 2016.

### Daftar Pustaka

- Chen, Q. *et al.*, 2012. Hydrolysis of chitosan under microwave irradiation in ionic liquids promoted by sulfonic acid-functionalized ionic liquids. , 97.
- Ha, S.H. *et al.*, 2011. Microwave-assisted pretreatment of cellulose in ionic liquid for accelerated enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 102(2), pp.1214–9.
- Imoto & Yagishita, 1971. Activity Measurement of Lysozyme. , 35(7).
- Li, K. *et al.*, 2012. International Journal of Biological Macromolecules Microwave-assisted degradation of chitosan for a possible use in inhibiting crop pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), pp.767–773.
- Lizardi-Mendoza, J., Argüelles-Monal, W.M. & Goycoolea, F.M., 2016. *Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan*, Elsevier Inc.
- Mello, P.A., 2014. *Microwave Heating*, Elsevier. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59420-4.00002-7>.
- Oviedo, A. *et al.*, 2007. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. , 342, pp.2750–2756.
- Pan, S. & Wu, S., 2011. Preparation of water-soluble chitosan by hydrolysis with commercial glucoamylase containing chitosanase activity. *European Food Research and Technology*, 233(3), pp.325–329.
- Prasertung, I., Damrongsakkul, S. & Saito, N., 2013. Degradation of  $\beta$ -chitosan by solution plasma process ( SPP ). *Polymer Degradation and Stability*, 98(10), pp.2089–2093.
- Rochima, E., 2007. Karakterisasi kitin dan kitosan asal limbah rajungan Cirebon Jawa Barat. , X, pp.9–22.
- Su, P. *et al.*, 2013. Application of cellulase-polyamidoamine dendrimer-modified silica for microwave-assisted chitosan enzymolysis. *Process Biochemistry*, 48(4), pp.614–619.
- Sun, Y. *et al.*, 2013. International Journal of Biological Macromolecules Preparation of D-glucosamine by hydrolysis of chitosan with chitosanase and  $\alpha$ -D-glucosaminidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, pp.160–163.
- Tsubaki, S. & Azuma, J., 2013. Bioresource Technology Total fractionation of green tea residue by microwave-assisted alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 131, pp.485–491.
- Wasikiewicz, J.M. & Yeates, S.G., 2013. “ Green ” molecular weight degradation of chitosan using microwave irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, 98(4), pp.863–867.
- Xia, Z., Wu, S. & Chen, J., 2013. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, pp.242–245.
- Xie, Y. *et al.*, 2009. Preparation of chito oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 94(10), pp.1895–1899.
- Xing, R. *et al.*, 2005. Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. *Carbohydr Res.*, 340, pp.2150–2153.