

**PENYARINGAN DAN PENGOPTIMUMAN PENGHASILAN  
PROTEIN INTRASEL YIS DALAM MEDIUM SISA PERTANIAN  
UNTUK INDUSTRI MAKANAN**

**Oleh**

**LOO CHEE YEONG**

**Universiti Sains Malaysia**

**2009**

## PENGHARGAAN

Dalam usaha melaksanakan projek penyelidikan ini, pengarang ingin berterima kasih kepada Dr. Rosma Ahmad sebagai penyelia yang telah memberikan banyak bimbingan dan tunjuk ajar kepada pengarang sepanjang projek penyelidikan dijalankan. Tidak dilupa juga ialah Prof. Azemi, Pn. Wan Nadiah, Min Tze, Pak Din, Kak Aishah, Kak Ani, Kak Rafidah serta rakan seperjuangan lain yang sering memberi dorongan dan sokongan kepada pengarang.

Pengarang ingin melanjutkan penghargaan terhadap pihak University Sains Malaysia kerana menyediakan kemudahan-kemudahan yang memudahkan proses pencarian maklumat, kesemua pensyarah dari Pusat Pengajian Teknologi Industri kerana melatih dan berkongsi pengetahuan dengan pengarang sepanjang masa pengarang menjadi seorang pelajar dan menjadikan pengarang lebih bersedia semasa menghadapi rintangan dalam dunia pekerjaannya.

Pengarang juga ingin merakamkan setinggi penghargaan terhadap pengarah syarikat di mana pengarang sedang bekerja, Dr. Vimala Sreevinasan, kerana sifat timbang rasa dan motivasi yang diberikan semasa pengarang dalam proses penyiapan tesis. Akhir sekali, pengarang ingin berterima kasih kepada ahli keluarga kerana kesabaran serta sokongan yang mereka berikan kepada pengarang selama ini.

## ISI KANDUNGAN

## MUKA SURAT

<b>Penghargaan</b>	ii
<b>Isi Kandungan</b>	iii
<b>Senarai Jadual</b>	vii
<b>Senarai Rajah</b>	x
<b>Abstrak</b>	xiv
<b>Abstract</b>	xvi
<b>Bab 1 Pengenalan</b>	1
1.1 Objektif dan tujuan penyelidikan	7
<b>Bab 2 Tinjauan Literatur</b>	8
2.1 Sejarah yis	8
2.2 Ciri-ciri am yis	10
2.2.1 Ciri-ciri Morfologi yis	11
2.2.1.1 Saiz dan bentuk sel yis	11
2.2.1.2 Seni-bina struktur sel yis	12
2.2.2 Ciri-ciri fisiologi yis	17
2.3 Sisa pertanian tempatan sebagai sumber karbon	18
2.3.1 Efluen kilang minyak kelapa sawit (POME).	20
2.3.1.1 Pengekstrakan dan POME	20
2.3.1.2 Ciri-ciri fizikal dan kimia POME	24
2.3.1.3 Potensi penggunaan POME	28
2.3.2 Pelepah kelapa sawit (Oil Palm Frond,OPF)	32
2.3.2.1 Ciri-ciri fizikal dan kimia pelepah kelapa sawit	34
2.3.2.2 Potensi Penggunaan OPF	35
2.3.3 Sisa pertanian daripada industri nanas	36
2.3.3.1 Ciri-ciri fizikal sisa nanas	39
2.3.3.2 Komposisi-komposisi kimia dalam sisa nanas	40
2.3.3.3 Potensi sisa nanas untuk menghasilkan produk berguna	42
2.4 Bahan buangan lignoselulosik lain di Malaysia	44
2.5 Faktor-faktor kimia mempengaruhi pertumbuhan yis	44
2.5.1 Sumber karbon	45
2.5.2 Bekalan oksigen	48
2.5.3 Sumber nitrogen	49
2.5.4 Sumber garam mineral	52

2.5.4.1	Sumber Fosforus	53
2.5.4.2	Sumber Sulfur	54
2.5.4.3	Magnesium dan kalsium	55
2.5.5	Sumber vitamin	56
2.5.5.1	Asid pantotenik	57
2.5.5.2	Biotin	57
2.5.5.3	Inositol, Thiamin, Asid nikotinik dan Piridoksin	58
2.6	Peranan yis dalam industri makanan	59
2.6.1	Protein sel tunggal (SCP)	59
2.6.2	Ekstrak yis serta sumbangannya terhadap perisa	62
2.6.3	Sumbangan-sumbangan lain yis dalam industri makanan	64
<b>Bab 3</b>	<b>Bahan dan Kaedah</b>	<b>68</b>
3.1	Sumber mikroorganisma	68
3.2	Penyediaan kultur	68
3.2.1	Penyediaan kultur stok	68
3.2.2	Penyediaan medium agar YEPG	69
3.2.3	Penyediaan inokulum/sel benih	70
3.3	Penyediaan medium pengkulturan	70
3.3.1	Penyediaan medium benih	70
3.3.2	Penyediaan medium kultur YEPG	71
3.3.3	Penyediaan medium pengkulturan daripada efluen kilang minyak kelapa sawit (POME)	71
3.3.4	Penyediaan medium pengkulturan daripada sisa nanas	73
3.3.5	Penyediaan medium pengkulturan daripada pelepah kelapa sawit (Oil Palm Frond, OPF)	74
3.4	Pensterilan dan pengeraman medium pengkulturan	76
3.5	Kaedah-kaedah Analisis	78
3.5.1	Penentuan gula penurun dalam medium pengkulturan	78
3.5.2	Penentuan kandungan gula total	80
3.5.3	Penentuan elemen-elemen mineral dalam medium dengan alat Spektrofotometer Serapan Atom	80
3.5.3.1	Kaedah penyediaan sampel	81
3.5.3.2	Penentuan unsur-unsur mineral dalam medium pengkulturan	81
3.5.4	Penentuan kandungan fosfat dalam medium pengkulturan	82
3.5.5	Penentuan kandungan sulfat dalam medium pengkulturan	83
3.5.6	Penentuan kandungan furfural dalam medium pengkulturan	84
3.5.7	Penentuan profil pertumbuhan sel yis	85
3.5.8	Penentuan berat kering biojisim	86
3.5.9	Penentuan protein intrasel terlarutkan total	88
3.5.10	Penentuan aktiviti protease intrasel secara <i>In Situ</i>	89
3.5.11	Pengekstrakan enzim protease dengan kaedah sonikasi	93

3.5.12	Penentuan kandungan asid amino	93
3.5.12.1	Peralatan dan reagen	93
3.5.12.2	Penyediaan sampel	94
3.5.12.3	Penyediaan piawai asid amino	95
3.5.12.4	Kalibrasi Alat HPLC	95
3.6	Pengoptimuman kandungan protein intrasel bagi <i>Candida utilis</i>	96
3.6.1	Penentuan julat optimum parameter dengan menggunakan kaedah konvensional	96
3.6.2	Kajian pengoptimuman kandungan protein intrasel yis melalui Kaedah <i>Central Composite Design</i> (CCD)	97
<b>Bab 4</b>	<b>Keputusan dan Perbincangan</b>	<b>99</b>
4.1	Komposisi kimia dalam medium sisa pertanian berlainan	99
4.2	Pengaruh medium sisa pertanian berlainan terhadap <i>S. cerevisiae</i>	105
4.2.1	Penentuan profil pertumbuhan <i>S. Cerevisiae</i> dalam medium berlainan	105
4.2.2	Penentuan kandungan gula penurun dalam medium berlainan sepanjang masa pengkulturan <i>S. cerevisiae</i>	110
4.2.3	Perubahan nilai pH dalam medium sepanjang masa pengkulturan bagi yis <i>S. cerevisiae</i> .	114
4.2.4	Penentuan kandungan protein intrasel terlarutkan total <i>S. cerevisiae</i> dalam medium berlainan.	117
4.2.5	Penentuan kandungan asid amino dalam ekstrak yis kasar <i>S. cerevisiae</i> dalam medium berlainan	120
4.2.6	Penentuan aktiviti protease intrasel <i>S. cerevisiae</i> dalam medium berlainan	125
4.3	Pengaruh medium sisa pertanian berlainan terhadap <i>C. utilis</i>	132
4.3.1	Penentuan profil pertumbuhan <i>C. utilis</i> dalam medium berlainan	132
4.3.2	Penentuan kandungan gula penurun dalam media berlainan sepanjang masa pengkulturan yis <i>C. utilis</i> .	136
4.3.3	Perubahan nilai pH dalam media berlainan sepanjang masa pengkulturan yis <i>C. utilis</i>	140
4.3.4	Penentuan kandungan protein intrasel terlarutkan total <i>C. utilis</i> dalam media berlainan	142
4.3.5	Penentuan kandungan asid amino dalam ekstrak yis kasar <i>C. utilis</i> dalam medium berlainan	144
4.3.6	Penentuan aktiviti protease intrasel <i>C. utilis</i> dalam media berlainan	147
4.4	Kajian pengoptimuman kandungan protein intrasel terlarutkan total dalam yis <i>C. utilis</i>	152
4.4.1	Kajian pengoptimuman kandungan protein intrasel <i>C. utilis</i> dengan kaedah konvensional	153
4.4.1.1	Kesan saiz inokulum	153

4.4.1.2	Kesan kepekatan pepejal terlarutkan total medium sisa nanas	157
4.4.1.3	Kesan penambahan sulfat ke dalam medium sisa nanas	160
4.4.1.4	Kesan penambahan sumber nitrogen	164
4.4.2	Kajian pengoptimuman dengan kaedah sambutan permukaan	168
4.4.2.1	Sambutan permukaan kandungan protein	168
4.4.2.2	Kandungan serta profil perisa asid amino dalam ekstrak yis kasar <i>C. utilis</i>	182
<b>Bab 5 Kesimpulan dan Cadangan Ujikaji Masa Depan</b>		<b>185</b>
<b>Rujukan</b>		<b>186</b>

## SENARAI JADUAL

		<b>Muka surat</b>
Jadual 2.1	Total sisa daripada perindustrian minyak kelapa sawit (Kirkaldy & Sutanto, 1976).	19
Jadual 2.2	Komposisi nutrien bagi POME.	26
Jadual 2.3	Profil asid amino serta kebolehdapatannya dalam POME (Yeong 1987).	27
Jadual 2.4	Jangkaan tahunan ke atas kebolehdapatan pelepah kelapa sawit (tan berat kering) akibat daripada aktiviti penanaman semula pokok kelapa sawit di seluruh Malaysia dari tahun 1985 sehingga 2000 (Husin <i>et.al.</i> , 1986).	33
Jadual 2.5	Komposisi-komposisi kimia dalam pelepah kelapa sawit (Tajudin <i>et. al.</i> , 1985).	35
Jadual 2.6	Komposisi sisa nanas dan amaun jus nanas yang dipulihkan daripada sisa nanas (Kassim <i>et al.</i> , 1974).	40
Jadual 2.7	Komposisi-komposisi kimia jus sisa nanas.	41
Jadual 2.8	Anggaran penghasilan bahan buangan lignoselulosik di Malaysia (Rahim <i>et.al.</i> , 1982).	44
Jadual 2.9	Genera yis yang didapati mampu memetabolismekan kedua-dua nitrat dan nitrit (Siverio, 2002).	49
Jadual 2.10	Komposisi asid-asid amino dalam pelbagai spesis yis kormersil.	62
Jadual 3.1	Aliran gradien bagi analisis HPLC asid amino.	94
Jadual 4.1	Kepekatan gula penurun hasil hidrolisis holoselulosa dalam kuantiti yang berlainan.	101
Jadual 4.2	Komposisi kimia dalam medium sisa pertanian berlainan.	102
Jadual 4.3	Kepekatan optimum unsur-unsur elemen bagi pertumbuhan biojisim yis sebanyak 10 g/L (Rodney,1986).	104

Jadual 4.4	Korelasi di antara gula penurun dengan pertumbuhan biojisim bagi <i>S. cerevisiae</i> dalam medium sisa nanas, POME dan YEPG.	112
Jadual 4.5	Kandungan protein intrasel terlarutkan <i>S.cerevisiae</i> dalam medium tertakrif YEPG, nanas dan POME.	116
Jadual 4.6	Kandungan protein intrasel total <i>Saccharomyces sp.</i> dalam medium sisa pertanian berlainan.	118
Jadual 4.7	Nisbah karbon kepada nitrogen dalam media pengkulturan.	119
Jadual 4.8	Profil kandungan asid amino <i>S. cerevisiae</i> dalam medium pengkulturan yang berlainan serta perbandingan dengan piawaian asid amino perlu yang ditetapkan oleh FAO.	121
Jadual 4.9	Bentuk perisa bagi setiap jenis asid amino yang wujud dalam ekstrak yis (Yang <i>et. al.</i> , 2001).	123
Jadual 4.10	Jadual komposisi setiap jenis perisa dalam bentuk peratusan dari ekstrak yis kasar <i>S. cerevisiae</i> dalam medium pengkulturan berlainan.	124
Jadual 4.11	Bacaan Spektroskopi Ultraungu-nampak (UV-Vis Spectroscopy yang mewakili nilai aktiviti protease intrasel yang diperolehi melalui kaedah sonikasi dan kejutan osmotik.	126
Jadual4.12	Korelasi di antara gula penurun dengan pertumbuhan biojisim bagi <i>C. utilis</i> dalam medium sisa nanas, POME dan YEPG.	136
Jadual 4.13	Kandungan protein terlarutkan <i>C. utilis</i> dalam medium YEPG, nanas dan POME.	141
Jadual 4.14	Kandungan protein intrasel total <i>Candida sp.</i> dalam medium sisa pertanian berlainan.	142
Jadual 4.15	Profil kandungan asid amino <i>C. utilis</i> dalam medium pengkulturan yang berlainan serta perbandingan dengan piawaian asid amino perlu yang ditetapkan oleh FAO.	144
Jadual 4.16	Jadual komposisi setiap jenis perisa dalam bentuk peratusan dari ekstrak yis kasar <i>C. utilis</i> dalam medium pengkulturan berlainan.	146



Jadual 4.17	Rekabentuk ujikaji dengan faktor pecahan bagi pembolehubah bersandar dan tak bersandar.	168
Jadual 4.18	Analisis Anova model kuadratik sambutan permukaan bagi pembolehubah bersandar kandungan protein intrasel <i>C. utilis</i> .	170
Jadual 4.19	Profil asid amino dalam ekstrak kasar <i>Candida utilis</i> dalam medium sisa nanas sebelum dan selepas pengoptimuman.	182
Jadual 4.20	Jadual komposisi setiap jenis perisa dalam bentuk peratusan dari ekstrak kasar <i>C. utilis</i> dalam medium pengkulturan berlainan.	183

## SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 2.1	Prosedur pengekstrakan minyak kelapa sawit serta penghasilan POME (Tan, 1978).	21
Rajah 4.1	Profil pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> dalam medium YEPG dan sisa pertanian POME, OPF serta nanas.	108
Rajah 4.2	Pertumbuhan biojisim <i>S. cerevisiae</i> dalam medium YEPG dan sisa pertanian POME, OPF serta nanas.	109
Rajah 4.3	Perubahan kepekatan gula penurun (g/L) di dalam medium sisa nanas, medium sisa pertanian POME, medium OPF serta dalam medium tertakrif YEPG oleh pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> .	111
Rajah 4.4	Perubahan nilai pH dalam medium YEPG, nanas, POME dan OPF sepanjang masa pengkulturan.	116
Rajah 4.5	Penghasilan aktiviti protease intrasel <i>S. Cerevisiae</i> yang ditumbuhkan dalam medium pengkulturan yang berlainan.	130
Rajah 4.6	Hubungan antara nilai pH dan aktiviti protease intrasel dalam medium sisa nanas.	130
Rajah 4.7	Hubungan antara nilai pH dan aktiviti protease intrasel dalam medium POME.	131
Rajah 4.8	Profil pertumbuhan <i>C. utilis</i> dalam medium YEPG dan sisa pertanian POME, OPF serta nanas.	134
Rajah 4.9	Pertumbuhan biojisim <i>C. utilis</i> dalam medium YEPG dan sisa pertanian POME, OPF serta nanas.	135
Rajah 4.10	Perubahan kepekatan gula penurun (gL <sup>-1</sup> ) di dalam medium sisa nanas, medium sisa pertanian POME, medium OPF serta dalam medium YEPG YEPG oleh pertumbuhan <i>C. utilis</i> .	139
Rajah 4.11	Perubahan nilai pH dalam medium YEPG, nanas,	141

POME dan OPF sepanjang masa pengkulturan.

Rajah 4.12	Penghasilan aktiviti protease intrasel yis <i>C. utilis</i> yang ditumbuhkan dalam medium pengkulturan yang berlainan.	150
Rajah 4.13	Hubungan antara nilai pH dan aktiviti protease intrasel dalam medium YEPG.	151
Rajah 4.14	Hubungan antara nilai pH dan aktiviti protease intrasel dalam medium sisa nanas.	151
Rajah 4.15	Hubungan antara nilai pH dan aktiviti protease intrasel dalam medium POME.	152
Rajah 4.16	Kesan saiz inokulum kultur <i>C. utilis</i> dalam medium sisa nanas ke atas kandungan protein intrasel sepanjang masa pengkulturan.	155
Rajah 4.17	Kesan saiz inokulum kultur <i>C. utilis</i> yang ditumbuh dalam medium sisa nanas ke atas pertumbuhan biojisim sepanjang masa pengkulturan.	155
Rajah 4.18	Kesan saiz inokulum kultur <i>C. utilis</i> ke atas penyerapan sumber karbon dalam medium sisa nanas.	156
Rajah 4.19	Kesan saiz inokulum kultur <i>C. utilis</i> ke atas penyerapan sumber nitrogen dalam medium sisa nanas.	156
Rajah 4.20	Kesan nilai pepejal terlarut total medium sisa nanas yang berbeza ke atas kandungan protein intrasel <i>C. utilis</i> .	158
Rajah 4.21	Kesan nilai pepejal terlarut total medium sisa nanas yang berbeza ke atas pertumbuhan biojisim <i>C. utilis</i> .	159
Rajah 4.22	Kesan kepekatan sulfat tambahan yang berbeza dalam medium sisa nanas ke atas kandungan protein intrasel <i>C. utilis</i> .	161
Rajah 4.23	Kesan kepekatan sulfat tambahan yang berbeza dalam medium sisa nanas ke atas pertumbuhan biojisim <i>C. utilis</i> .	162
Rajah 4.24	Kesan kepekatan sulfat tambahan yang berbeza ke atas penyerapan sumber karbon dalam medium sisa nanas.	163

Rajah 4.25	Kesan kepekatan sumber nitrogen ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) yang berbeza dalam medium sisa nanas ke atas kandungan protein intrasel <i>C. utilis</i> .	166
Rajah 4.26	Kesan kepekatan sumber nitrogen ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) yang berbeza dalam medium sisa nanas ke atas pertumbuhan biojisim <i>C. utilis</i> .	167
Rajah 4.27	Plot kebarangkalian normal melawan Studentized Residuals.	173
Rajah 4.28	Plot Studentized Residuals lawan nilai ramalan sambutan.	174
Rajah 4.29	Plot Outlier T melawan bilangan eksperimen.	174
Rajah 4.30	Plot ralat piawai bagi dua parameter yang paling berpengaruh terhadap kandungan protein intrasel <i>C. utilis</i> .	175
Rajah 4.31	Plot kontur sambutan permukaan untuk pembolehubah bersandar kandungan protein yis (% berat kering yis) di bawah pengaruh kepekatan pepejal terlarutkan ( <sup>0</sup> Brix) dan masa pengkulturan (j).	178
Rajah 4.32	Plot kontur sambutan permukaan untuk pembolehubah bersandar kandungan protein yis (% berat kering yis) di bawah pengaruh kepekatan pepejal terlarutkan ( <sup>0</sup> Brix) dan saiz inokulum (% i/i).	178
Rajah 4.33	Plot kontur sambutan permukaan untuk pembolehubah bersandar kandungan protein yis (% berat kering yis) di bawah pengaruh masa pengkulturan (j) dan saiz inokulum (% i/i).	179
Rajah 4.34	Plot kontur sambutan permukaan untuk pembolehubah bersandar kandungan protein yis (% berat kering yis) di bawah pengaruh kandungan (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (% b/i) dan kepekatan pepejal terlarutkan ( <sup>0</sup> Brix).	179
Rajah 4.35	Plot kontur sambutan permukaan untuk pembolehubah bersandar kandungan protein yis (% berat kering yis) di bawah pengaruh kandungan (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (% b/i) dan masa pengkulturan (j).	180

Rajah 4.36	Kesan saiz inokulum dan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (% b/i) terhadap pembolehubah bersandar kandungan protein yis (% berat kering yis) di bawah kepekatan pepejal terlarutkan ( $^{\circ}$ Brix) dan masa pengkulturan (j) yang dominan.	180
Rajah 4.37	Plot kontur sambutan permukaan untuk pembolehubah bersandar kandungan protein yis (% berat kering yis) di bawah pengaruh pembolehubah tak bersandar yang optimum.	181

# PENYARINGAN DAN PENGOPTIMUMAN PENGHASILAN PROTEIN INTRASEL YIS DALAM MEDIUM SISA PERTANIAN UNTUK INDUSTRI MAKANAN

## ABSTRAK

Tiga jenis sisa industri pertanian tempatan telah digunakan sebagai medium pengkulturan bagi pertumbuhan yis *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida utilis*. Sisa-sisa pertanian yang digunakan ialah sisa cecair industri kelapa sawit (POME, Palm Oil Mill Effluent), pelapah kelapa sawit (OPF, Oil Palm Frond) dan sisa nanas. Kesemua sisa pertanian tersebut telah dirawat sebelum dijadikan sebagai medium pengkulturan. Pengkulturan dilakukan dalam kelalang Erlenmeyer berisipadu 250 ml pada suhu 30 °C, kadar goncangan pada 100 psm selama 72 jam. Sel yis yang diperolehi dikaji dari segi pertumbuhan serta analisa kandungan ekstrak yis kasar untuk kandungan protein intrasel terlarutkan, profil asid-asid amino dan profil perisanya. Kedua-dua jenis yis menunjukkan pertumbuhan biojisim yang baik dalam medium sisa nanas dibanding dengan POME dan OPF. *Candida utilis* menghasilkan kandungan protein intrasel terlarutkan tertinggi (30.65 %b/b) dalam medium sisa nanas dibandingkan *Saccharomyces cerevisiae*. Kandungan protein *C. utilis* dalam medium sisa nanas dioptimumkan dengan menggunakan kaedah Konvensional atau *One at a time* dan *Central Composite Design* (CCD). Faktor-faktor yang dipilih dalam kaedah Konvensional ialah saiz inokulum, kepekatan pepejal terlarutkan (° Brix), MgSO<sub>4</sub> dan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Julat-julat yang diperolehi ialah: saiz inokulum (2 %

hingga 6 % (i/i)); kepekatan pepejal terlarutkan ( $4^{\circ}$  hingga  $8^{\circ}$  Brix);  $\text{MgSO}_4$  (0.06 % hingga 0.10 % (b/i)) dan  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0.8 % hingga 1.2 % (b/i)). Analisis dilanjutkan dengan ujian *Central Composite Design*. Kandungan optimum protein intrasel terlarutkan *C. utilis* ialah 30.65% b/b dengan kondisi optimum: saiz inokulum (2.74 % i/i); kepekatan pepejal terlarutkan ( $6.80^{\circ}$  Brix);  $\text{MgSO}_4$  (0.08 % b/i) dan  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0.80 % b/i) pada masa pengkulturan 22 jam dibanding 18.80 % b/b sebelum pengoptimuman. Peningkatan adalah sebanyak 63.03 %. Faktor-faktor paling dominan yang mempengaruhi sintesis protein dalam sel ialah kepekatan pepejal terlarutkan serta masa pengkulturan. Saiz inokulasi serta sumber nitrogen didapati memberikan rangsangan terhadap protein sel apabila berinteraksi dengan faktor kepekatan pepejal total serta masa pengkulturan dalam keadaan dominan. Kandungan asid amino ditentukan dengan menggunakan kaedah HPLC. Kehadiran threonin dan metionina dikesan selepas proses pengoptimuman. Perubahan dalam profil asid amino dikaitkan dengan perubahan profil perisa dalam ekstrak yis kasar *Candida utilis*. Perisa mirip MSG dan manis telah didapati meningkat selepas pengoptimuman dilakukan.

# SCREENING AND OPTIMIZATION OF YEAST INTRACELLULAR PROTEIN PRODUCTION IN AGRO-WASTES MEDIA FOR FOOD INDUSTRY

## ABSTRACT

Three different types of agricultural wastes were used as cultivation media for culturing both *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. They were palm oil mill effluent (POME), oil palm frond (OPF) and pineapple waste. These raw materials were treated before being used as cultivation medium. Cultivation was carried out in an 250 ml Erlenmeyer flask at 30 °C, rotation speed at 100 rpm for 72 hours. Studies on biomass growth, intracellular soluble protein, amino acids content and flavor profile from amino acids were done on the yeast cells from the different media. Both *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* showed better growth in the cultivation medium from pineapple waste compared to in POME and OPF. Low carbon content in both POME and OPF medium as well as high furfural concentration in OPF medium (> 3 %w/v) were found to inhibit the growth of both yeasts. *Candida utilis* generated higher soluble intracellular protein compared to *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple waste medium. Protein content of *Candida utilis* grown in pineapple waste was optimized using conventional method or *One at a Time* and *Central Composite Design* (CCD). Few parameters chosen in the conventional method were inoculum size, total soluble solid, magnesium sulphate (MgSO<sub>4</sub>) and ammonium hydrogen phosphate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Each parameter was tested in order to obtain the optimum range



toward high protein yield. The values obtained were 2 % to 6 % (v/v) inoculum size, 4<sup>0</sup> to 8<sup>0</sup> Brix, 0.06% to 0.10 % w/v MgSO<sub>4</sub> and 0.8 % to 1.2 % w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Experiments were continued using CCD method. Intracellular soluble protein of *C. utilis* obtained from CCD method was 30.65 % w/w. Optimized conditions were as follow: 2.74 % v/v in inoculum size, 6.80<sup>0</sup> Brix, 0.08 % w/v in MgSO<sub>4</sub> and 0.80 % w/v in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at the 22<sup>nd</sup> hours of incubation time. Protein value before optimization was 18.80 % w/w. An increase of 63 % was observed. Total soluble solid and cultivation time were found to be the most dominant parameters affecting protein content in *C. utilis*. Amino acids content were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Total amino acids was found to increased after optimization. Presence of threonine and methionine were observed after optimization. Changes in amino acids profile is related to the flavor profile of *C. utilis* crude extract. MSG-like flavor and sweetness were found to have increased after optimization.

## **BAB 1      PENGENALAN**

Yis merupakan mikroorganisma yang biasa digunakan dalam industri makanan terutamanya dalam pembuatan roti, bir, cuka dan keju. Walau bagaimanapun, yis juga mungkin boleh membawakan bahaya kepada makanan. Yis perosak makanan sering didapati dalam jus buah-buahan, sirap, madu, jeli, daging dan sebagainya (Frazier & Westhoff, 1978).

Yis telah digunakan dengan meluas dalam formulasi produk makanan. Ia sering ditambahkan sebagai tujuan untuk meningkatkan kandungan protein serta memperbaiki profil perisa bagi makanan. Protein sel tunggal (SCP) merupakan salah satu produk yang dihasilkan daripada fermentasi yis dalam suatu medium. Ia merupakan biojisim daripada sumber mikrob atau komponen sel yang digunakan sebagai makanan atau bahan tambah di dalam makanan haiwan (Ibrahim, 1994). Sel jenis ini mempunyai kandungan protein yang tinggi dan boleh dihasilkan dengan mudah tanpa bergantung kepada iklim, musim dan tempat. Selain itu, yis juga mudah tumbuh dengan baik menggunakan substrat yang murah dan bermutu rendah. Kos pengeluaran biojisim yis daripada substrat murah adalah lebih murah dibandingkan dengan kaedah penghasilan protein secara kaedah pertanian.

Perisa *cheesy*, *meaty*, dan *savory* merupakan perisa yang tipikal yang dihasilkan oleh komponen autolisis dan ekstrak yis. Kandungan autolisis dan

ekstrak yis merupakan produk penghadaman sendiri (*self-digestion*) dalam badan yis semasa pertumbuhannya dalam suatu medium. Semasa proses autolisis berlaku, protein dalam yis akan dihidrolisiskan oleh protease kepada peptida-peptida dan asid-asid amino. Selain itu, gula ringkas serta komponen sel tidak terlarutkan seperti dinding sel juga turut hadir. Hasil yang diperolehi ini dikenali sebagai autolisat. Sekiranya komponen tidak terlarutkan sel dan komponen yang berperisa pahit telah diasingkan daripada autolisat, dan bakinya dipekatkan, ia akan menjadi pasta berwarna coklat pekat yang memberikan perisa daging, dan dikenali sebagai ekstrak yis (Shay *et al.*, 1985).

Parameter autolisis yang berlainan akan menghasilkan profil perisa yang berbeza. Dengan erti kata lain, kandungan ekstrak yis adalah berbeza bergantung kepada pengolahannya. Ekstrak yis mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan ekstrak daripada sumber tumbuh-tumbuhan serta haiwan yang juga turut digunakan sebagai perangsang perisa dalam makanan. Ekstrak yis mempunyai kandungan garam yang rendah, tetapi sebaliknya mempunyai kandungan vitamin serta karbohidrat kompleks yang lebih tinggi (Shay *et al.*, 1985). Menurut Akta Makanan Malaysia, 1983 (Akta 281) & Peraturan-peraturan Makanan, 1985, ekstrak yis ialah bahan penambah perisa yang mengandungi tidak lebih daripada 0.04 mg per g asid folik total dan diperolehi sepenuhnya daripada *Saccharomyces cerevisiae* atau *Saccharomyces fragilis* atau *Candida utilis* atau gabungan yis-yis tersebut (Anon, 1990).

Dua jenis spesies yis yang digunakan dalam kajian ini ialah *S. cerevisiae* dan *C. utilis*. Kedua-dua jenis yis ini lebih mendapat perhatian disebabkan keupayaan menghasilkan kandungan protein sehingga 50 % daripada berat kering (Lee & Kim, 2001). *S. cerevisiae* merupakan spesies yang paling kerap digunakan dalam industri untuk penghasilan alkohol, pembekuan roti, arak serta untuk tujuan penghasilan vaksin untuk penyakit tertentu seperti hepatitis B. *C. utilis* secara relatif mengandungi jenis amino asid perlu dalam kepekatan yang tinggi (Lawford *et al.*, 1979) serta mempunyai kebolehan untuk memetabolismekan banyak jenis gula sakarida (Shay & Wegner, 1985).

Dalam kajian ini, tiga jenis bahan sisa pertanian telah dipilih untuk dijadikan sebagai medium fermentasi bagi yis *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida utilis*. Bahan sisa yang dikaji ialah batang kelapa sawit, efluen minyak kelapa sawit dan kulit nanas. Malaysia kini merupakan negara pengeluar dan pengeksport minyak kelapa sawit yang utama dengan jumlah luas ladang kira-kira 1.465 million hektar serta mampu menghasilkan 4.11 million tan minyak kelapa sawit setiap tahun (Husin *et al.*, 1986). Oleh kerana pokok kelapa sawit yang ditanam pada sekitar tahun 60 dan 70an perlu ditanam semula dalam skala yang sangat besar, maka bahan sisa yang dihasilkan juga dijangkakan dalam suatu amaun yang besar (Husin *et al.*, 1986).

Kerja pengendalian sisa kelapa sawit terutamanya batang kelapa sawit adalah sukar. Ini adalah kerana batang kelapa sawit mempunyai kandungan

lembapan yang tinggi dan menyebabkannya sukar untuk dibakar. Jika ditinggalkan dalam ladang akan mengganggu proses penanaman semula dan menjadi tempat pembiakan bagi haiwan perosak. Selain itu, proses reputan bagi satu batang akan mengambil masa selama 6 tahun dan kerja menimbusnya pula akan melibatkan kos yang tinggi memandangkan berat batang yang tinggi (Husin *et al.*, 1987). Oleh yang demikian, penyelidikan perlu dilakukan untuk menjadikan bahan sisa ini kepada suatu bahan yang berguna dari segi komersil.

Satu lagi bahan sisa yang dipilih dalam penyelidikan ini ialah efluen minyak kelapa sawit (POME). Pemprosesan buah kelapa sawit dalam alat permilan menghasilkan banyak sisa buangan berbentuk cecair. Bahan buangan ini dicampurkan dalam kolam primer untuk rawatan lanjut. POME menunjukkan nilai BOD (Biological Oxygen Demand) yang tinggi iaitu 25,000 mg/L, suatu nilai yang merbahaya terhadap alam sekitar (Abu Hassan *et al.*, 2000). POME dalam keadaan segar merupakan sluri yang berwarna coklat, berminyak dan mengandungi baki selulosa daripada buah. Ia adalah panas dan berasid (pH 4-5). Kos untuk alat pemisahan bahan pepejal serta pengeringan POME adalah amat mahal dan jumlah kilang permilan yang dilengkapi dengan kemudahan ini hanyalah 12-14 buah sahaja di seluruh Malaysia (Yeong, 1985). Oleh itu, jumlah berat kering bagi POME dijangkakan akan meningkat pada masa akan datang. Setakat ini, POME telah dijual sebagai makanan haiwan ternakan dan sebagai baja dalam pasaran tempatan.

Dari segi kandungan nutrien, POME menunjukkan kandungan abu yang tinggi disebabkan kehadiran pasir dalamnya (Yeong, 1985). Ini telah menjejaskan nilai nutrisinya serta mengganggu kebolehadamannya setelah dimakan oleh haiwan. Selain itu, POME juga mempunyai kandungan ekstrak eter yang tinggi. Kehadiran bahan ini dapat meningkatkan paras tenaga dalam POME, tetapi juga menimbulkan masalah pereputan semasa penstoran (Yeong, 1985). Walaubagaimanapun, POME mempunyai potensi sebagai substrat pengkulturan yis kerana bahan terampai dalam POME adalah kebanyakannya terdiri daripada bahan selulosa bagi buah kelapa sawit. POME juga tidak bertoksik kerana tiada bahan kimia yang ditambahkan ke dalamnya semasa proses pengestrakan minyak dilakukan. Ia juga mengandungi elemen seperti N, P, K, Mg dan Ca dalam amaun yang banyak yang diperlukan untuk pertumbuhan tumbuh-tumbuhan.

Satu lagi jenis bahan sisa pertanian yang dipilih untuk dijadikan sebagai medium pengkulturan yis ialah kulit nanas. Lebih kurang 200,000 tan sisa nanas dihasilkan setiap tahun daripada industri pengalengan nanas di negeri Johor (Kassim *et al.*, 1974). Kebanyakan nanas dimakan dalam bentuk segar atau dalam bentuk terproses. Dalam pemprosesan nanas, hanya buah yang berkualiti tinggi sahaja yang diproses manakala buah yang kurang berkualiti pula ditinggalkan dalam ladang disebabkan pasaran yang tidak menggalakkan (Tanaka *et al.*, 1999). Selain itu, sisa yang terhasil turut dibiarkan mereput di sepanjang jalan ataupun dibuang ke dalam sungai. Satu-satunya langkah pemulihan yang telah dilakukan ialah pengestrakan semula jus daripada sisa nanas. Walau

bagaimanapun, ia hanya menyumbang kepada peratusan yang rendah dibandingkan dengan total sisa nanas yang dihasilkan (Kassim *et al.*, 1974).

Sisa yang terhasil daripada pemprosesan nanas ialah kulit nanas, pulp, tangkai dan sebagainya. Analisis kimia ke atas jus kulit nanas menunjukkan bahawa masih terdapat tiga jenis gula yang terkandung di dalamnya. Iaitu sukrosa, glukosa dan fruktosa dengan kepekatan 40.1 g/L, 23.6 g/L dan 14.0 g/L (Noparatnaraporn *et al.*, 1986). Manakala dekstran, rafinosa dan galaktosa pula dalam kuantiti yang sedikit. Kandungan nitrogen (0.17 g/L), protein terlarutkan (0.94 g/L) serta elemen-elemen seperti Fe, Ca, Mn, Mg dan Co yang diperlukan untuk pengkulturan mikroorganisma turut hadir dalam kepekatan yang mencukupi (Noparatnaraporn *et al.*, 1986). Selain daripada itu, nanas bukan merupakan buah bermusim jadi bekalannya adalah sentiasa mencukupi.

## 1.1 Objektif dan tujuan penyelidikan

Objektif-objektif kajian untuk projek penyelidikan ini adalah seperti berikut:

- i) Memilih sisa-sisa pertanian (POME, OPF dan sisa nanas) bagi pengkulturan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida utilis*.
- ii) Menentukan jenis sisa pertanian paling berpotensi serta membandingkan kualiti dan kuantiti protein intrasel *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida utilis* yang dikulturkan di dalamnya.
- iii) Pengoptimuman kuantiti serta kualiti protein intrasel yis terpilih melalui pengkayaan medium sisa pertanian yang ditentukan dari objektif ii.



## **BAB 2      TINJAUAN LITERATUR**

### **2.1    Sejarah yis**

Perkataan 'yis' telah digunakan dalam banyak bahasa untuk menerangkan secara kasar mengenai fenomenon yang berkaitan dengan proses fermentasi. Perkataan 'yeast' dalam bahasa Inggeris serta perkataan 'gist' dalam bahasa Belanda adalah dipercayai datang dari perkataan 'zestos' dalam bahasa Yunani. Maksudnya ialah mendidih, iaitu suatu fenomenon pembuihan yang sering berlaku semasa proses fermentasi disebabkan oleh pembebasan gas karbon dioksida. Begitu juga dengan perkataan 'levure' (yis) dalam bahasa Perancis serta 'Hefe' dalam bahasa Jerman yang membawa maksud sebagai 'menaik'.

Yis boleh dikatakan sebagai mikroorganisma yang paling lama wujud semenjak kehadiran peradaban manusia. Bukti-bukti menunjukkan penggunaan yis telah tercatat dalam batu-batu nisan, batu serta alat mainan kayu tinggalan Mesir kuno (Davenport *et al.*, 1980). Produk-produk seperti bir dan roti telah mula dihidangkan sebagai makanan bagi kalangan kerabat diraja di zaman Mesir kuno sejak 6000 tahun yang dahulu (Davenport *et al.*, 1980).

Manusia mula menggunakan yis bagi tujuan membek dan membru. Penggunaan yis sebagai agen pembaikpulih perisa di dalam sup telah digunakan di Babylonia sejak sebelum masihi lagi (Kocková-Kratochvílová, 1990). Bukti kewujudan alam mikroorganisma telah disumbangkan oleh seorang penca nai kanta berbangsa Belanda yang bernama Antony Leeuwenhoek (1632-1723).

Beliau menyifatkan yis sebagai mikroorganisma yang berbadan globul, bujur dan kadang kala berbentuk sfera.

Pada tahun 1836 sehingga 1838, yis telah diperhatikan di bawah mikroskop dan dikenalpasti sebagai fungus yang menjadi punca utama berlakunya proses fermentasi oleh Cagniard-Latour. Beliau juga menunjukkan bahawa yis terdiri daripada badan berbentuk sfera dan berupaya untuk membiak dengan baik. Walaubagaimanapun, fungsi yis dalam proses fermentasi beralkohol telah ditemui oleh Louis Pasteur. Beliau berjaya menunjukkan bahawa proses fermentasi berlaku disebabkan oleh penukaran kandungan gula dalam medium kepada gas karbon dioksida dan juga alkohol dibawah keadaan anaerobik.

Pada masa dahulu, proses fermentasi ke atas doh roti dan jus anggur dilakukan dengan memasukkan tinggalan daripada hasil fermentasi yang sebelumnya. Masyarakat dulu selalunya menyimpan bahagian doh yang telah terfermen sebagai 'doh pencetus' dan menggunakannya untuk proses fermentasi yang berikutnya (Charlie, 1998). Sekiranya 'doh pencetus' tersebut telah hilang ataupun terkontaminasi oleh bakteria, maka langkah yang diambil ialah dengan membasahkan tepung kanji dan membiarkan proses fermentasi berlaku secara spontan. Satu lagi alternatif ialah meminjam "doh pencetus" daripada jiran berdekatan. Kini, proses fermentasi bagi penghasilan produk-produk tertentu seperti roti, wain, alkohol dan sebagainya boleh dilakukan dengan menggunakan kultur yis tulen. Ini supaya produk yang terhasil adalah lebih konsisten.

Spesies yis yang sering digunakan secara komersil adalah seperti *S. cerevisiae*, *C. utilis* dan *Kluyveromyces marxianus*. Setiap spesies yang dinamakan telah digunakan untuk tujuan yang berlainan. *S. cerevisiae* yang juga dikenali sebagai *bakers yeast* telah digunakan secara meluas dalam perusahaan pembuatan roti. *S. cerevisiae* juga telah digunakan dalam industri pembuatan bir, arak, alkohol dan sebagainya. Yis *C. utilis* juga dikenali sebagai *Torula yeast* dan telah digunakan sebagai makanan ternakan di sesetengah negara dan juga sebagai makanan di negara Barat seperti Amerika Syarikat dan dikenali sebagai *Amoco yeast*. Spesies ini penting kerana kebolehannya untuk memetabolismekan gula pentosa daripada sisa kayu (Charlie, 1998) serta gula heksosa (Guzman-Juarez, 1982). Manakala bagi spesies *Kluyvetomyces marxianus* pula dikenali sebagai *Whey yeast* kerana kebolehannya untuk menggunakan gula laktosa sebagai substratnya.

## **2.2 Ciri-ciri am yis**

Yis dikelaskan sebagai fungus pada peringkat *famili* dan kesemua yis tidak menunjukkan keupayaan untuk melakukan proses fotosintesis (Jin & Speers, 1999). Yis didapati wujud dalam kuantiti yang banyak dalam alam semulajadi. Ia boleh didapati dari tanah, air, biji gandum, dan rumput kering. Sehingga hari ini, sebanyak 500 spesies yis telah pun dikenalpasti daripada 50 000 spesies fungi. Namun hanya sesetengah spesies yis sahaja yang memberikan manfaat kepada manusia.

## **2.2.1 Ciri-ciri Morfologi yis**

### **2.2.1.1 Saiz dan bentuk sel yis**

Yis wujud secara semulajadi dan merupakan sel eukariot. Ia mempunyai 17 kromosom yang dikurung dalam membran nukleus. Yis mempunyai banyak jenis bentuk yang berbeza termasuk bentuk bujur padat, berbentuk lemon, berbentuk 'pear', bersilinder, segi tiga atau memanjang membentuk miselium (Frazier & Westhoff, 1978). Dimensi bentuk sel yis adalah di bawah paras penglihatan mata kasar dan hanya boleh diperhatikan di bawah mikroskop cahaya. Bentuk sel yis sering berubah semasa pertumbuhan.

Apabila sel yis dipindahkan ke dalam medium nutrien yang baru, sel-sel akan memerlukan sedikit masa untuk menyesuaikan diri dengan keadaan persekitaran yang baru dan pada masa yang sama perlu menyimpan tenaga simpanan untuk tujuan proses pertumbuhan yang seterusnya. Sel yis akan berkembang sehingga saiz yang optimum apabila sudah matang. Namun demikian, apabila proses pembahagian terlalu giat berlaku, sel yis tidak mempunyai masa yang cukup untuk berkembang kepada saiz yang optimum sebelum dipisahkan daripada sel induk. Oleh yang demikian, pada peringkat ini, saiz yis selalunya berbentuk bulat dan kecil. Yis hanya akan terus berkembang ke saiz optimum setelah proses pembahagian sel menurun ataupun berhenti (Kocková-Kratochvílová, 1990).

Saiz dan bentuk yis yang berbeza juga boleh disebabkan oleh cara pembahagian sel semasa proses pembiakan vegetatif serta faktor-faktor

persekitaran. Bentuk sel yis juga merupakan salah satu karakter bagi sesuatu spesis atau genera yis. Contohnya, bentuk lemon adalah ciri-ciri bagi genera *Kloeckera*, *Hanseniaspora* atau *Brettanomyces* (Kocková-Kratochvílová, 1990). Bentuk sedemikian juga mungkin disebabkan oleh pertunasan yang berlaku pada bahagian hujung sel induk yang berbentuk bujur telur; bentuk sel menjadi bulat apabila ditumbuhkan terlalu lama dalam medium yang sama; sel berbentuk bujur disebabkan oleh kekurangan nutrien serta amalan oksigen yang berlebihan; bentuk pseudomycelium pada yis pula terjadi apabila sel anak yis gagal berpisah daripada sel induknya, kekurangan sumber nutrien, oksigen serta sifat-sifat genetik yis (Kocková-Kratochvílová, 1990; Frazier & Westhoff, 1978). Bentuk ini boleh wujud dalam rantai tunggal ataupun rantai bercabang.

#### **2.2.1.2 Seni-bina struktur sel yis**

Struktur bagi yis ialah sel dinding, membran sitoplasma, matriks sitoplasma yang mengandungi nukleus, mitokondria, ribosom, rektikulum endoplasma, granul-granul lipid dan vakuol-vakuol. Vakuol-vakuol yang terdapat dalam badan sel yis berperanan mengumpulkan asid amino, asid urik, enzim-enzim hidrolitik seperti protease, ribonukleus dan esterase. Enzim-enzim hidrolitik ini perlu diasingkan kerana kecenderungannya menyerang bahagian-bahagian lain dalam badan sel yis.

Dinding sel yis telah disifatkan sebagai yang terkuat dan terteguh dibandingkan dengan dinding sel mikroorganisma-mikroorganisma yang lain (Phaff, 1971; Hunter & Asenjo, 1988). Ia mempunyai ketebalan 25 nm. Ia menyumbang kepada lebih kurang 25% daripada berat kering sel yis. Fungsi utama dinding sel yis ialah sebagai bahan pelindung kepada sel yis, sebagai bahan penapis kepada molekul-molekul yang keluar atau memasuki badan sel, mengujudkan interaksi sel, pengekalan bentuk sel, pelekatan serta menyokong aktiviti enzimatik (Jin & Speers, 1999; Fleet, 1991). Selain itu, dinding sel juga memberikan sokongan kepada beberapa jenis enzim luar sel. Komponen protein-polisakarida dalam dinding sel memainkan peranan yang penting dalam mengujudkan interaksi di antara sel-sel yis dan menggalakkan flokulasi yis dalam industri pembuatan arak (Kocková-Kratochvílová, 1990).

Analisis kimia menunjukkan bahawa dinding sel adalah terdiri daripada glukukan (30%), manan (30%), lipid (8.5%) dan protein (13%) (Phaff, 1971; Berry, 1982; Hunter & Asenjo, 1988). Walaubagaimanapun komponen utama dalam dinding sel ialah glukukan dan manan. Glukukan merupakan suatu jenis polimer bercabang yang kompleks yang terdiri daripada unit-unit glukosa serta memainkan peranan yang penting dalam menyumbangkan ciri-ciri keteguhan kepada dinding sel. Penyingkirannya daripada struktur dinding sel akan mengakibatkan keruntuhan secara menyeluruh pada struktur sel. Kerapuhan dinding sel akan menyebabkan badan sel yis 'meletup' akibat daripada tekanan osmosis dalam medium.

Manan merupakan suatu jenis polimer bercabang yang terdiri daripada manosa dan hanya didapati pada bahagian lapisan luar dinding sel. Ia sering didapati terikat dengan protein. Kompleks ini boleh dipisahkan dari permukaan dinding sel melalui proses pensterilan, pengekstrakan secara alkali ataupun melalui proses proteolisis (Hunter & Asenjo, 1988).

Menurut Kocková-Kratochvílová (1990) kebanyakan polisakarida dinding sel bersifat neutral, namun terdapat juga polisakarida dalam sesetengah spesis yis yang bersifat keasidan. Contohnya dengan kehadiran asid uronik, asid fosforik dan sebagainya. Kehadiran polisakarida berasid ini boleh diperhatikan dalam yis *Lipomyces* dan *Cryptococcus*. Menurut Charlie (1998), dinding sel yis mempunyai peranan dalam mengikat atau menyerap bahan-bahan bertoksik, anti-vitamin, virus serta bakteria patogen. Beliau menerangkan bahawa manan dalam dinding sel yis hanya boleh diserap oleh bakteria yang baik dalam perut dan secara tidak langsung akan membendung pertumbuhan bakteria yang tidak bagus. Oleh yang demikian, produk yis juga dikenali sebagai "MOS" (mananoligosaccharide) yang menunjukkan fungsi yang hampir sama dengan makanan "FOS" (fructooligosaccharide).

Pertumbuhan populasi yis boleh diperhatikan dengan pertunasan sel anak daripada sel induk. Saiz sel anak akan semakin membesar sehingga hampir sama dengan sel induknya sebelum proses pemisahan berlaku. Walaubagaimanapun, proses pertunasan yang baru mungkin akan berlaku

sebelum pemisahan sel anak yang matang daripada sel induk. Oleh itu, sel-sel yis dalam keadaan berkumpulan akan diperhatikan.

Setiap kali pemisahan sel anak daripada sel induk berlaku, suatu tapak akan terbentuk pada permukaan dinding sel kedua-dua sel yis. Tapak yang terbentuk pada sel induk dikenali sebagai bekas tapak pertunasan (*bud scar*) manakala pada sel anak dikenali sebagai bekas tapak kelahiran (*birth scar*) (Berry, 1982). Menurut Berry (1982) lagi, pertunasan tidak akan berlaku pada bekas tapak pertunasan yang sama. Oleh yang demikian, jangkakan akan bilangan sel anak yang dihasilkan oleh suatu sel induk boleh dilakukan dengan membilang jumlah tapak yang terdapat pada permukaan dinding sel yis tersebut. Ini juga dapat membantu menganggarkan umur sel yis.

Membran sel adalah terdiri daripada komposisi lipid dan protein. Ia terbahagi kepada tiga lapisan yang dikenali sebagai *unit membrane*. Fungsi utama membran sel ialah untuk mengujudkan sempadan bagi proses metabolik yang berlaku dalam sel. Kehadiran membran sel dalam sel juga dapat membahagikan bahagian dalaman sel yis kepada beberapa bahagian yang berasingan serta menyediakan beberapa tapak tindakbalas yang memainkan peranan yang penting dalam segala proses metabolik sel (Kocková-Kratochvílová, 1990). Membran sel turut mempamerkan darajah ketelapan yang berbeza. Ia bersifat telap terhadap molekul-molekul air tetapi sebagai penghalang kepada molekul-molekul asing yang muncul dalam air.



Kajian menunjukkan bahawa komposisi major yang membentuk matriks bagi kebanyakan membran sel ialah molekul fosfolipid. Molekul ini terdiri daripada dua bahagian, iaitu bahagian yang bersifat hidrofilik (kumpulan fosfotida) serta bahagian yang bersifat hidrofobik (kumpulan asid lemak). Bahagian hidrofobik fosfolipid disusun pada bahagian dalaman dwilapisan manakala bahagian yang hidrofilik pula disusun supaya membentuk lapisan luaran yang berdepan dengan persekitaran akueus (Kocková-Kratochvílová, 1990). Terdapat juga globul-globul protein yang terletak pada permukaan membran sel ataupun terbenam dalam matriks membran. Selain itu, saiz bagi globul protein ini adalah bergantung kepada spesis yis serta bilangan dan taburannya adalah bergantung kepada status fisiologi sel. Iaitu samaada sel berada dalam fasa log ataupun fasa pegun.

Membran yis mengandungi *phosphotides cephalin* dan lesitin yang tinggi. Kedua-dua jenis komponen ini wujud secara semulajadi dalam bentuk campuran. Namun, pemisahannya agak mudah kerana tahap keterlarutan *cephalin* yang rendah dalam alkohol (Kocková-Kratochvílová, 1990). Kajian telah menunjukkan bahawa membran sel bagi yis *S. cerevisiae* terdiri daripada 34% protein, 7% sakarida, 5% RNA, 5% sterol dan 0.5% fosforus lipid.

### 2.2.2 Ciri-ciri fisiologi yis

Yis dapat tumbuh dengan baik apabila dipindahkan ke dalam medium cecair yang berbekalkan kandungan nutrisi yang mencukupi, suhu serta keadaan pH yang sesuai. Sepanjang proses pertumbuhan, isipadu dan jisim sel yis akan meningkat sehingga mencapai suatu saiz yang kritikal sebelum terpisah dari badan sel induk (Pringle & Hartwell, 1981). Pertumbuhan sel-sel yis yang baru turut melibatkan sintesis *de novo* yang mana ia melibatkan penghasilan makromolekul-makromolekul dalam sel. Proses ini merupakan sebahagian daripada tindakbalas biokimia yang berlaku dalam metabolisme sel yis (Young, 1987).

Yis secara semulajadinya dapat tumbuh dengan baik dalam keadaan yang lembap. Walau bagaimanapun, yis telah dibahagikan kepada dua jenis, iaitu yis biasa dan yis osmofilik. Yis biasa adalah kumpulan yis yang dapat tumbuh dengan baik dalam keadaan kelembapan tinggi, iaitu dengan nilai  $a_w$ nya yang terendah dalam lingkungan 0.88 hingga 0.94. Yis osmofilik merupakan kumpulan yis yang dapat hidup dalam medium yang berkepekatan tinggi dan ia didapati boleh tumbuh dalam medium yang nilai  $a_w$ nya dalam lingkungan 0.62 hingga 0.65. (Frazier & Westhoff, 1978).

Secara umumnya, yis tumbuh dengan baik dalam keadaan yang berasid, iaitu dalam lingkungan nilai pH 4.0 hingga 5.0. Yis tidak dapat hidup dengan baik

dalam keadaan yang terlalu berasid ataupun beralkali. Yis didapati dapat tumbuh dengan baik dalam julat suhu yang besar iaitu dari 25<sup>0</sup>C hingga 47<sup>0</sup>C. Namun demikian, yis didapati mati apabila dibiarkan terdedah kepada suhu 50<sup>0</sup>C hingga 60<sup>0</sup>C dalam jangka masa kurang daripada 30 minit (Stokes, 1971) mungkin disebabkan oleh pemusnahan enzim di dalam sel yis.

Yis merupakan mikroorganisma jenis fakultatif di mana ia dapat menghasilkan tenaga untuk kegunaan sendiri daripada sumber makanannya dengan atau tanpa kehadiran oksigen (Charlie, 1998). Sumber karbon akan ditukarkan kepada bentuk gas karbon dioksida, air dan tenaga menandakan proses respirasi telah berlaku dalam yis. Dalam keadaan anaerobik pula, sumber karbon akan ditukarkan kepada bentuk alkohol menandakan proses fermentasi telah berlaku. Dalam keadaan sedemikian, penghasilan tenaga adalah kurang efisien dibandingkan dengan keadaan aerobik. Proses fermentasi juga boleh berlaku sekiranya kepekatan gula adalah terlalu tinggi dalam medium pertumbuhan (Suomalainen & Oura, 1971).

### **2.3 Sisa pertanian tempatan sebagai sumber karbon**

Pokok kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) yang ditanam di Malaysia adalah berasal dari negara Afrika. Pokok kelapa sawit mula tiba di Malaysia pada tahun 1875 dan pada ketika ia mula ditanam di sini, pokok kelapa sawit hanya dijadikan sebagai perhiasan sahaja.

Industri melibatkan kelapa sawit bermula sejak tahun 1917 (Latiff, 2000). Pada tahun 1925, Malaysia mempunyai keluasan ladang kelapa sawit sebanyak 3848 hektar dan menjelang tahun 1940an berkembang sehingga 31000 hektar (Latiff, 2000). Walaubagaimanapun, industri ini hanya mula diperkembangkan dengan aktif pada akhir tahun 1950'an berikutan polisi kerajaan untuk mempelbagaikan sektor pertanian daripada industri getah kepada industri kelapa sawit (Husin, *et al.*, 1986).

Sejak tahun 1975 hingga akhir tahun 1987, Malaysia merupakan pengeluar utama minyak kelapa sawit dunia iaitu dengan sumbangan sebanyak 59% daripada jumlah pengeluaran minyak kelapa sawit dunia dengan keluasan ladang sekitar 1.465 juta hektar serta keupayaan untuk mengeluarkan sebanyak 4.11 juta tan minyak kelapa sawit setahun (Husin *et al.*, 1987; Mahlia *et al.*, 2001). Untuk memperolehi 1 juta tan metrik minyak kelapa sawit, sebanyak 2.8 hingga 3.3 juta tan metrik bahan buangan dihasilkan (Kirkaldy & Sutanto, 1976) seperti yang ditunjukkan dalam jadual di bawah.

Jadual 2.1 Total sisa daripada perindustrian minyak kelapa sawit (Kirkaldy & Sutanto, 1976).

---

<b>Sisa perindustrian kelapa sawit</b>	<b>Kuantiti (juta tan metrik)</b>
Tandan kosong	0.5
Tempurung	0.8
enapcemar	1.5
Gentian pada bahagian perikap	0.8

---

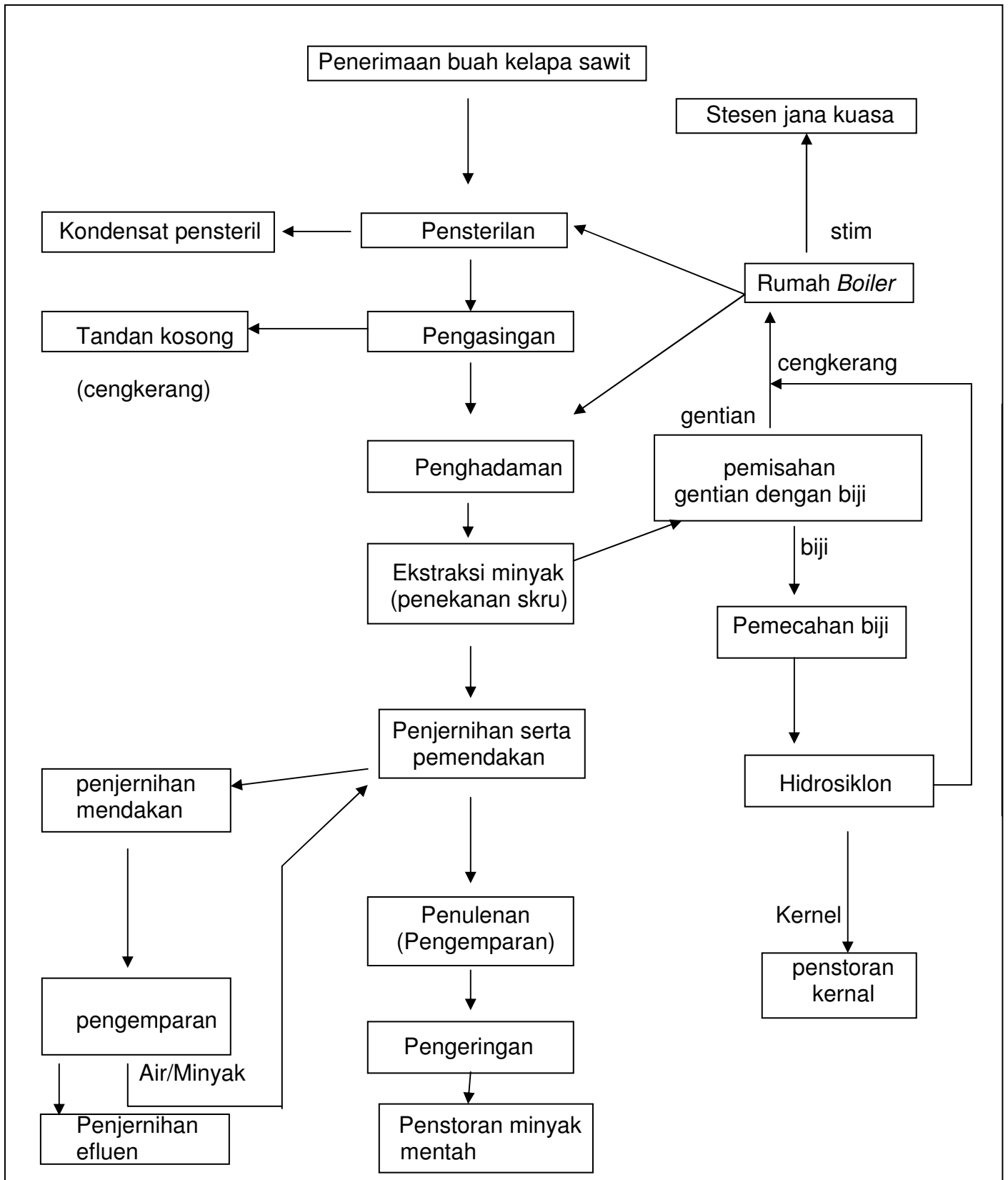
Pengeluaran minyak kelapa sawit didapati semakin meningkat dari tahun ke tahun (Yeong, 1987). Peningkatan permintaan dunia terhadap minyak kelapa sawit sudah semestinya akan merangsangkan pertumbuhan industri kelapa sawit tempatan. Pertambahan keluasan ladang serta peningkatan penghasilan minyak kelapa sawit bagi menampung permintaan pasaran akan turut menjanakan lebih banyak produk sampingan daripada pokok kelapa sawit. Produk-produk sampingan kelapa sawit adalah seperti batang dan pelepah kelapa sawit dari ladang, tempurung, tandan-tandan kosong, gentian-gentian buah terperah serta efluen kilang minyak kelapa sawit (*Palm oil mill effluent*) dari kilang kelapa sawit (Husin *et al.*, 1987).

Pelbagai usaha telah dilakukan untuk mengkaji potensi produk-produk sampingan ini antaranya ialah penghasilan kertas picisan, papan kenyataan serta produk-produk tertambah nilai yang sesuai bagi sektor industri berdasarkan sisa pertanian.

### **2.3.1 Efluen kilang minyak kelapa sawit (POME).**

#### **2.3.1.1 Pengekstrakan dan POME**

Minyak kelapa sawit diekstrak daripada bahagian mesokarpa dan bahagian kernel bagi tandanan buah kelapa sawit yang segar (Mahlia *et al.*, 2001) melalui beberapa langkah yang agak ringkas. Langkah-langkah pengekstrakan minyak kelapa sawit adalah seperti mana yang telah ditunjukkan dalam Rajah 2.1.



Rajah 2.1 Prosedur pengekstrakan minyak kelapa sawit serta penghasilan POME (Tan, 1978).

Efluen minyak kilang kelapa sawit secara umumnya berpunca daripada bahagian alat pensteril, alat pengempar serta hasil cucian hidrosiklon. Efluen dari alat pensterilan diperolehi melalui proses pensterilan tandan buah kelapa sawit di dalam retort stim. Stim yang terkondensasi akan seterusnya disalur keluar sebagai sisa. Adalah dianggarkan amaun sisa yang dihasilkan adalah lebih kurang 180 kg per tan tandan buah kelapa sawit (Ma, 1975).

Proses yang seterusnya ialah pemisahan buah kelapa sawit daripada tangkainya dan diikuti dengan proses penghadaman buah. Selepas itu, minyak daripada buah kelapa sawit diekstrak dengan menggunakan alat penekan skru ataupun hidrolik. Minyak yang diekstrak keluar diemparkan bagi memisahkan minyak daripada mendakan. Mendakan ini akan dibuang sebagai sisa minyak dan adalah dianggarkan bahawa terdapat sebanyak 360 kg mendakan per tan tandan buah kelapa sawit segar akan dihasilkan (Ma, 1975). Sisa yang diperolehi selalunya disalur keluar pada suhu 75-85<sup>0</sup>C dan akan dicampurkan bersama pada kolam primer untuk rawatan (Husin *et al.*, 1987).

Pelbagai teknik telah digunakan untuk menangani masalah efluen dari kilang minyak kelapa sawit. Namun sehingga kini, cara-cara penyelesaian yang digunakan masih tidak begitu sesuai memandangkan ia melibatkan ruang, kos serta masa yang lama. Kaedah rawatan secara kimia seperti pemendakan dan flokulasi dengan menggunakan alum atau garam ferum klorida telah ditunjukkan tidak mendatangkan hasil yang memuaskan. Selain itu, teknik-teknik seperti

penyejatan, penurasan, pengemparan, osmosis berbalik serta pengeringan diikuti dengan pembakaran telahpun dicadangkan (Stanton, 1974) namun tidak praktikal dalam sektor perindustrian kerana tidak begitu ekonomik.

POME didapati akan bertukar menjadi kelodak yang sukar dikendalikan apabila kandungan lembapannya dikurangkan ke tahap yang lebih rendah daripada 90% (Webb *et al.*, 1975). Kaedah penurasan dan osmosis berbalik adalah tidak sesuai dilaksanakan kerana POME masih lagi mengandungi kandungan lignin yang tinggi dan dengan cepat akan menyumbat permukaan lapisan penuras. POME merupakan salah satu punca pencemaran yang penting sekiranya dilepaskan ke dalam sungai atau pun laut tanpa dirawat terlebih dahulu. Ma (1975) pernah mencadangkan supaya POME terus disalurkan ke laut. Kaedah ini sememangnya mudah dan menjimatkan kos, tetapi akan mendatangkan banyak kesan negatif terhadap alam sekitar terutamanya flora dan fauna dalam laut.

Selain itu, lokasi kilang minyak kelapa sawit juga perlu berdekatan dengan kawasan laut. Ini akan menimbulkan kesulitan dari segi pengangkutan tandan-tandan buah kelapa sawit yang segar dari ladang ke kilang pemprosesan. Hasil yang diperolehi dari ladang perlu dihantar untuk diproses dalam masa 24 jam bagi mengelakkan pembentukan asid lemak-asid lemak bebas akibat daripada tindakan enzim yang sekaligus akan mengurangkan kualiti minyak kelapa sawit.



Sistem kolam anaerobik fakultatif memerlukan kawasan tanah yang luas. Selain itu, sistem ini juga akan turut menghasilkan efluen sekunder yang perlu dibuang.

Oswal *et al.* (2002) dalam kajiannya telah berjaya mengurangkan kandungan COD di dalam POME sebanyak 99% menggunakan yis *Yarrowia lipolytica* serta dengan bantuan koagulan kimia. Teknik rawatan ke atas POME dengan bantuan mikroorganisma daripada spesis yang sama dalam keadaan yang beroksigen didapati akan mengurangkan kandungan karbon serta nitrogen inorganik, dan dalam masa yang sama akan mengubah nilai pH POME dari keadaan berasid kepada beralkali. Perubahan nilai pH mungkin disebabkan oleh penggunaan asid-asid lemak yang hadir dalam POME.

#### **2.3.1.2 Ciri-ciri fizikal dan kimia POME.**

Minyak kelapa sawit merupakan salah satu jenis produk yang sangat penting bagi negara tropika seperti Malaysia, Indonesia dan Brazil. Sisa daripada industri penghasilan minyak kelapa sawit juga didapati semakin meningkat. Salah satunya ialah POME.

Secara umumnya, POME merujuk kepada enapcemar yang pekat serta berwarna kelabu atau perang, berminyak, berbau busuk dan mengandungi kandungan pepejal total pada tahap 50, 000 ppm (Stanton, 1974). Ugoji (1997) menyifatkan POME sebagai sisa yang bebas daripada sebarang gentian serta tanpa komponen berminyak. POME mengandungi nilai BOD dan COD yang