

Pengoptimuman Pengeluaran Bioetanol Menggunakan Strain Yis Tempatan yang Diasingkan dari Malaysia Melalui Sel Yis Terkurung dalam Bebola Alginat (Optimization of Bioethanol Production Using Locally Isolated Yeast Strain from Malaysia via Alginate Beads Immobilized Yeast Cell)

Abbas Ismail^a, Masniroszaima Md Zain^b, Siti Rozaimah Sheikh Abdullah^a & Noorhisham Tan Kofli^{a*}

^aJabatan Kejuruteraan Kimia dan Proses, Fakulti Kejuruteraan dan Alam Bina,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, MALAYSIA

^bPetronas Research Sdn Bhd. Lot 3288&3289, Off Jalan Ayer Itam, Kawasan Institusi Bangi, 43000 Kajang, Selangor

*Corresponding author: ntk@ukm.edu.my

Received 27 April 2024, Received in revised form 20 August 2024
Accepted 20 September 2024, Available online 30 November 2024

ABSTRAK

Penyelidikan dalam pengeluaran bioetanol semakin pesat sejak dunia menghadapi kekurangan bahan api fosil. Untuk mendapatkan hasil etanol yang tinggi dan kadar penapaian yang optimum, metodologi permukaan tindak balas (RSM) telah diterapkan untuk mengkaji kesan media dan bebola sel yis alginat-ST1 terhadap pengeluaran bioetanol menggunakan strain yis tempatan yang dipanggil ST1. Bioetanol dihasilkan oleh sel yis ST1 yang diimmobilisasi dan dikultur dalam media gula merah tempatan (LBS) menggunakan kelalang kon pada suhu 30°C selama 6 jam. Kesan kepekatan LBS, nisbah bebola alginat (ST1) kepada isipadu media, dan saiz bebola telah dikaji. Rekabentuk faktorial penuh 2³ (model peringkat pertama) dijalankan untuk mengenal pasti kesan yang signifikan sebelum model peringkat kedua; rekabentuk komposit pusat boleh dicadangkan. Hasil analisis model peringkat pertama menunjukkan bahawa parameter yang dipilih adalah penting dalam penggunaan glukosa dan pengeluaran bioetanol. Jumlah pengeluaran bioetanol adalah 5.30g/l dalam keadaan optimum, meningkat sebanyak 14.16% berbanding pengeluaran sebelum proses optimum iaitu 4.73g/l. Hasil rekabentuk komposit pusat menunjukkan keadaan optimum untuk pengeluaran bioethanol adalah pada nisbah 125g/l LBS untuk kepekatan LBS, nisbah 0.47 (bebola: substrat) untuk nisbah bebola alginat kepada isipadu media, dan 0.33 cm untuk saiz bebola alginat. Secara keseluruhan, kajian ini menunjukkan kejayaan pengimobilan sel yis ST1 dalam alginat, yang meningkatkan keberkesanan dan produktiviti pengeluaran bioetanol. Pendekatan ini menawarkan penyelesaian yang lebih mampan, kerana sel yis boleh digunakan semula, sekali gus memendekkan proses penuaian dan menyumbang kepada sistem pengeluaran bioetanol yang lebih efisien.

Kata kunci: Bioetanol; yis diimmobilisasi; alginat kalsium; metodologi permukaan tindak balas

ABSTRACT

Research in production of bioethanol has been accelerating since the world faced depleting fossil fuels. To obtain high ethanol yield and fermentation rate, response surface methodology (RSM) was applied to study the effect of medium and alginate-ST1 yeast cell beads toward production of bioethanol using local yeast strain called ST1. Bioethanol was produced by immobilized ST1 yeast grown in local brown sugar (LBS) using shake flask mode at 30°C for 6 hour and the effect of LBS concentrations, ratio of alginate (ST1) beads to the medium volumes and the beads size were investigated. Firstly, 2³ full factorial design (first order model) was carried out to identify the significant effect prior to second-order model; central composite design (CCD) can be proposed. The first order model analysis showed that the selected parameters are significant in glucose utilization and bioethanol production. The total bioethanol production was 5.30 g/L under optimum conditions, an increase of 14.16% compared to the production before optimization, which was 4.73 g/L. The CCD results showed that the optimum conditions for bioethanol production were at a ratio of 125 g/L

LBS for LBS concentration, 0.47 for the ratio of alginate beads to medium volume, and 0.33 cm for alginate bead size. Overall, this study demonstrated the successful immobilization of ST1 yeasts in alginate, which improved the effectiveness and productivity of bioethanol production. This approach offers a more sustainable solution, as the yeast cells can be reused, thereby shortening the harvesting process and contributing to a more efficient bioethanol production system.

Keywords: Bioethanol; immobilized yeast; calcium alginate; response surface methodology

PENGENALAN

Permintaan yang semakin meningkat dalam fermentasi bioetanol disebabkan oleh perkembangan pasaran untuk biofuel memerlukan kaedah pengoptimuman alternatif seperti imobilisasi sel dalam sokongan lengai (Göksungur & Zorlu 2001) yang mewujudkan kemungkinan kelebihan ekonomi dan teknikal serta meningkatkan produktiviti dan hasil etanol. Dengan cara ini, sel yang terperangkap di dalam sokongan lengai memudahkan pemisahan bioetanol dari media dan menjimatkan kos kerana ia mengurangkan prosedur berbanding dengan sel bebas. Penggunaan sel bebas dalam pengeluaran bioetanol menyukarkan proses pemisahan daripada medium fermentasi, menyebabkan proses pemurnian yang lebih kompleks dan mahal. Selain itu, sel bebas cenderung kehilangan aktiviti pemangkin dengan lebih cepat, menjadikannya kurang sesuai untuk penggunaan berulang. Berbanding dengan sel yang diperangkapkan, sel bebas memerlukan prosedur tambahan untuk pemisahan dan penyingkiran, yang boleh meningkatkan kos keseluruhan operasi dan menjejaskan kecekapan proses secara keseluruhan (Sowatad & Todhanakasem 2020; Zhubanova et al. 2024).

Penjerapan dalam bebola gel alginat telah banyak diterapkan dalam pengimobilisasi bakteria, yis, kulat, dan alga dalam pelbagai proses bioteknologi seperti rawatan air sisa, pengeluaran cuka, dan pengeluaran etanol. Penggunaan alginat sebagai matriks penjerapan sel telah mendapat populariti yang meluas dalam beberapa tahun kebelakangan ini kerana kesederhanaan kaedah ini, tidak toksik, kos rendah, boleh dipulihkan, dan mempunyai sifat mekanikal yang baik (Permatasari et al. 2022). Natrium alginat adalah polisakarida linear yang diekstrak dari pelbagai jenis alga coklat dan rumpai laut, dan pemejalan natrium alginat berlaku dalam larutan kalsium klorida dengan pemindahan ion natrium (Villacrés et al. 2023). Saiz liang maksimum bebola alginat adalah 15nm yang sesuai untuk saiz yis dan mikroba lain. Pada kepekatan alginat yang digunakan (2 wt %), bebola sepenuhnya aktif, fleksibel, dan cukup kuat untuk menahan pengacauan lembut serta mempunyai kestabilan, ketahanan, dan keserbagunaan yang baik (Ghasem Najafpour et al. 2004), yang penting untuk resapan dan ketelapan bebola.

Makanan tempatan adalah makanan tradisional yang dihasilkan pada skala rumah atau industri kecil di

kebanyakan negara di Asia Timur. Di Malaysia, yang terdiri daripada pelbagai kaum, makanan yang diperam seperti *tapai* dan *tuak* dihidangkan sebagai makanan dan minuman beralkohol semasa majlis khas. *Tapai* adalah makanan yang dibuat daripada ubi kayu, beras pulut, beras, atau pisang dan boleh dimakan mentah selepas beberapa hari penapaian dengan ragi. Sama seperti *tape ketan* (fermentasi beras hitam) di Indonesia, *tapai* di Malaysia adalah pes beras yang sebahagiannya cair, manis masam, dan sedikit beralkohol, yang dihidangkan sebagai pencuci mulut atau snek. Manakala, *tuak* adalah wain beras untuk penduduk asli (terutama di Sarawak) dan disediakan sama seperti *tapai* tetapi dengan tempoh fermentasi yang lebih lama, menghasilkan pencairan beras yang lebih besar dan diminum sebagai minuman beralkohol. Oleh kerana kedua-dua *tapai* dan *tuak* dihasilkan melalui penapaian beras, proses ini dirujuk sebagai fermentasi *tape* (Gunam et al. 2022; Rodzi & Lee 2021), tetapi dalam bahasa tempatan dikenali sebagai fermentasi *tapai*.

Substrat adalah komponen utama dalam proses penapaian, dan adalah penting untuk mempunyai substrat yang berkualiti tinggi dan murah sambil mengekalkan hasil pengeluaran etanol yang baik. Gula merah tempatan (LBS) adalah bahan pemanis semula jadi yang dihasilkan dengan pemekatan jus tebu dan biasanya digunakan dalam penyediaan kek, sirap, dan pencuci mulut serta dijual dengan harga murah di pasaran tempatan. Sistem fermentasi yis diimobilisasi membenarkan sel yang terperangkap di dalam sokongan lengai untuk menghasilkan bioetanol dari media melalui aktiviti pemangkin sel perlu dipertimbangkan. Terdapat kajian terdahulu mengenai faktor-faktor pengimobilisasian sel yis-alginat yang mempengaruhi pengeluaran bioetanol (Göksungur & Zorlu 2001). Pengoptimuman sel yis diimobilisasi menentukan nilai optimum untuk parameter pemboleh ubah seperti kepekatan substrat, saiz bebola, dan jumlah bebola kepada isipadu substrat untuk mencapai hasil pengeluaran etanol yang baik.

Kaedah reka bentuk eksperimen (DOE) digunakan secara meluas dalam pengoptimuman proses bioteknologi kerana ia merupakan pendekatan alternatif yang melibatkan eksperimen statistik berbanding dengan kaedah konvensional (Le Man et al. 2010; Montgomery 2017; Yu et al. 2009). Rekabentuk eksperimen terdiri daripada metodologi permukaan tindak balas, rekabentuk faktorial, dan rekabentuk campuran untuk mengenal pasti dan

memadankan data eksperimen dalam pengoptimuman untuk mencari keadaan optimum bagi sistem berbilang pemboleh ubah dengan cekap (Derman et al. 2022; Myers et al. 2016).

Fokus penyelidikan ini adalah untuk mengenal pasti keadaan optimum bagi tiga parameter; kepekatan substrat LBS, saiz bebola sel yis alginat-ST1, dan nisbah isipadu bebola alginat-ST1 kepada isipadu media semasa fermentasi sel yis alginat-ST1 yang diimobilisasi untuk menghasilkan bioetanol. Sel yis ST1 dipilih daripada kajian terdahulu yang diasingkan daripada pemula ragi dari Sarawak yang digunakan dalam penyediaan makanan tradisional yang diperam seperti *tapai* dan *tuak*. Untuk mengoptimumkan parameter yang disebutkan di atas, rekabentuk faktorial penuh telah digunakan dalam proses saringan untuk mengenal pasti parameter yang kritikal, penting, dan signifikan serta diterapkan dalam eksperimen rekabentuk komposit pusat untuk membangunkan model korelasi matematik antara parameter yang signifikan bagi pengeluaran etanol yang optimum.

BAHAN DAN KAEDAH

MIKROORGANISMA

Pemula ragi dibeli di pasar tempatan di Kuching, Sarawak (Malaysia). Pemula ragi berbentuk bulat leper dengan diameter kira-kira 3-5 cm, diperbuat daripada tepung beras dan dibungkus dalam beg plastik kecil. Ia disubkulturkan, disaring, dan diasingkan pada agar Sabouraud (Koehler et al. 1999) untuk menghasilkan koloni tunggal. Strain yang dipilih dinamakan ST1 dan disimpan pada media/agar YPD pada suhu 4°C.

SUBSTRAT

Gula merah tempatan (LBS) yang murah digunakan sebagai media. Ia dibeli di pasaraya tempatan dalam bungkusan plastik. Penyediaan medium mengikut kaedah oleh (Bravo & Gonzalez 1991). Komposisi media adalah LBS (100-200 g/L) yang dicairkan dan ditapis dengan penambahan 5.19 g/l (NH₄)₂SO₄, 1.53 g/l KH₂PO₄, dan 0.55 g/l MgSO₄. Media YPD adalah media komersial untuk yis yang terdiri daripada: ekstrak yis 10g/l, peptone 10g/l, dan dextrose 20g/l.

PENGIMOBILISASIAN SEL

Sel ST1 dikultur pada suhu 30°C selama 10 jam. 150 ml kultur dituai dengan emparan pada 7000 rpm selama 10 minit. 50 ml medium kultur ini dicampur dengan jumlah

yang sama (1:1v/v) larutan 4% (w/v) Na-alginat (Sigma A-2033). 100 ml ampai alginat-sel yang mengandungi 2% Na-alginat (kecuali dinyatakan sebaliknya) ditambahkan secara titisan ke dalam 1000 ml larutan 2% CaCl₂ menggunakan picagari (Tataridis et al. 2005). Titisan alginat mengeras apabila bersentuhan dengan CaCl₂ membentuk bebola dan dengan itu memerangkap sel bakteria. Bebola dibiarkan mengeras selama 30 minit dan kemudian dibasuh dengan larutan garam steril (0.85% NaCl) untuk mengeluarkan ion kalsium dan sel yang berlebihan.

PENGELUARAN ETANOL

Fermentasi bebola alginat-ST1 dijalankan dalam kelalang 250 ml yang dilengkapi dengan 150 ml gula merah tempatan sebagai media. Tiga parameter pemboleh ubah dipilih untuk menyiasat kesannya terhadap prestasi pengeluaran bioetanol; saiz bebola alginat-ST1, nisbah bebola kepada substrat, dan kepekatan LBS. Dua saiz bebola yang dipilih, 0.3cm dan 0.5cm diameter, dibentuk menggunakan muncung yang berbeza dan disimpan dalam 0.2% ekstrak yis sehingga digunakan. Isipadu bebola diukur dengan pengukuran silinder untuk menyiasat nisbah isipadu bebola kepada isipadu substrat; iaitu nisbah 0.2 mewakili 30ml bebola dalam media LBS 150ml. Ketakmabilan yis dieram pada suhu 30°C dengan pengacauan pada 75 rpm untuk mengelakkan bebola pecah.

KAEDAH ANALITIK

Kepekatan etanol dan glukosa ditentukan menggunakan penganalisis biokimia YSI Select (Yellow Spring Ltd.).

REKABENTUK EKSPERIMEN DAN PENGOPTIMUMAN

Dua rekabentuk digunakan dalam eksperimen ini; rekabentuk faktorial dua peringkat dan rekabentuk komposit pusat (CCD) menggunakan Perisian Design Expert (Ver. 6.0.10). Rekabentuk faktorial dua peringkat digunakan pada mulanya untuk melihat kepentingan statistik bagi pemboleh ubah dan diperluaskan lagi kepada CCD dengan pemboleh ubah signifikan yang ditunjukkan dari rekabentuk pertama (Mahat et al. 2004). Kesan tiga pemboleh ubah; kepekatan media LBS, nisbah bebola alginat-ST1 kepada media, dan saiz bebola sel yis alginat-ST1 dipilih sebagai faktor bebas yang berkaitan dengan pengeluaran etanol dan penggunaan gula sebagai tindak balas untuk pengoptimuman proses. Rekabentuk faktorial penuh 2³ menghasilkan 22 set eksperimen dengan enam ulangan pada titik tengah untuk menganggarkan ralat dalam

eksperimen dan juga untuk mengetahui sama ada terdapat sebarang kelengkungan dalam permukaan tindak balas. Jadual 1 menunjukkan tahap pemboleh ubah yang tinggi dan rendah yang dikaji dalam kajian ini.

JADUAL 1. Pemboleh ubah bebas dan tahap kepekatan yang dikaji dalam reka bentuk saringan pertama

Pembolehubah	Unit	Had rendah (-1)	Had tinggi (+1)
A(x ₁):Kepekatan LBS	g/l	50	150
B(x ₂):Nisbah (bebola:substrat)		0.25	0.75
C(x ₃):Saiz bebola	cm	0.1	0.5

CCD penuh digunakan dengan titik bintang dan enam ulangan di titik tengah serta persamaan polinomial peringkat kedua umum untuk ramalan titik optimum dalam sistem ini dipasang mengikut Persamaan (1):

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{j=1}^k \sum_{i=j+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + e_i \quad (1)$$

di mana y adalah tindak balas, x_i dan x_j adalah faktor, β_0 adalah pekali pemalar, β_j , β_{jj} , dan β_{ij} adalah pekali

interaksi terma linear, kuadratik, dan peringkat kedua masing-masing, k adalah bilangan faktor yang dikaji, dan e_i adalah ralat (Chauhan & Gupta 2004). Kepentingan statistik dianalisis melalui analisis varians (ANOVA) dan plot kontur untuk menentukan sifat permukaan tindak balas.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Penyaringan tiga pemboleh ubah bebas; kepekatan media LBS, nisbah bebola alginat-ST1 kepada media, dan saiz bebola sel yis alginat-ST1 untuk menilai potensi hasil etanol dijalankan menggunakan rekabentuk faktorial penuh 2³. Keputusan dianalisis menggunakan ujian statistik Fisher untuk ANOVA seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2. Nilai F (jumlah kuasa dua regresi: jumlah kuasa dua sisa = 87.69 dan 78.09 untuk tindak balas kepekatan glukosa dan etanol masing-masing) dengan nilai P yang rendah menunjukkan bahawa model untuk kedua-dua tindak balas adalah sangat signifikan. Nilai R² (pekali korelasi berganda) adalah 0.9793 dan 0.9763 dalam penggunaan glukosa dan pengeluaran bioetanol masing-masing, yang menunjukkan bahawa hanya 1% daripada variasi yang tidak diterangkan oleh model.

JADUAL 2. Reka bentuk eksperimen dan hasil (nilai eksperimen dan ramalan) bagi reka bentuk faktorial penuh 2³

Simulasi	Kod had			Glukosa (g/l)		Etanol (g/l)	
	x ₁	x ₂	x ₃	Eksperimen	Ramalan	Eksperimen	Ramalan
1	-1	1	1	0.052	0.042	2.200	2.235
2	1	-1	1	0.031	0.042	2.270	2.235
3	1	1	-1	0.159	0.170	5.210	5.545
4	-1	-1	-1	0.180	0.170	5.880	5.545
5	-1	1	1	0.059	0.067	1.960	2.195
6	0	0	0	0.074	0.067	2.430	2.195
7	1	1	-1	0.031	0.033	6.710	6.240
8	0	0	0	0.035	0.033	5.770	6.240
9	-1	1	-1	0.014	0.012	2.400	2.390
10	1	1	1	0.009	0.012	2.380	2.390
11	0	0	0	0.039	0.036	6.540	6.540
12	-1	-1	1	0.033	0.036	6.540	6.540
13	1	-1	-1	0.011	0.010	1.970	2.090
14	-1	-1	1	0.008	0.010	2.210	2.090
15	1	1	1	0.018	0.018	5.390	5.570
16	0	0	0	0.017	0.018	5.750	5.570
17	0	0	0	0.015	0.019	2.210	2.503
18	0	0	0	0.008	0.019	2.320	2.503
19	-1	1	-1	0.023	0.019	2.910	2.503
20	1	-1	-1	0.020	0.019	2.150	2.503
21	1	-1	1	0.023	0.019	2.720	2.503
22	-1	-1	-1	0.026	0.019	2.710	2.503

Jadual 3 menunjukkan bahawa semua terma model x_1 , x_2 , x_3 , x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 , dan $x_1x_2x_3$ adalah terma model yang signifikan ("kebarangkalian > F" kurang daripada 0.0500) dalam tindak balas penggunaan glukosa manakala terma model x_1 , x_2x_3 , dan $x_1x_2x_3$ adalah terma model yang signifikan untuk tindak balas pengeluaran bioetanol. Model

$$y_2 = 4.1 + 1.87x_1 - 0.077x_2 + 0.047x_3 + 0.00813x_1x_2 + 0.034x_1x_3 - 0.24x_2x_3 - 0.18x_1x_2x_3 \quad (2)$$

$$y_1 = 0.048 + 0.016x_1 - 0.017x_2 - 0.03x_3 - 0.022x_1x_2 - 0.00775x_1x_3 + 0.011x_2x_3 + 0.018x_1x_2x_3 \quad (3)$$

Rekabentuk pertama 2^3 faktorial penuh menunjukkan bahawa pemboleh ubah bebas; kepekatan media (x_1), nisbah bebola kepada substrat (x_2), dan saiz bebola (x_3) terbukti sebagai pemboleh ubah penting dalam penggunaan glukosa dan pengeluaran bioetanol dengan kesan pekali terbesar +1.87 dari kepekatan media. Oleh itu, tiga pemboleh ubah signifikan ini kemudian dioptimumkan menggunakan

regresi boleh digunakan dalam penyaringan komponen medium yang penting dan kritikal. Persamaan regresi (Per. 2&3) diperoleh daripada analisis varians dan semua terma dimasukkan ke dalam persamaan berikut tanpa mengira kepentingannya di mana x_1 , x_2 dan x_3 mewakili kepekatan LBS, nisbah, dan saiz bebola masing-masing:

rekabentuk komposit pusat (CCD) dengan enam titik paksi ($\alpha=2$) dan enam ulangan di titik pusat ($n_0=6$) seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 4. Sebanyak dua puluh eksperimen telah dijalankan dan Jadual 5 merumuskan matriks rekabentuk komposit pusat bersama dengan tindak balas eksperimen dan ramalan untuk setiap eksperimen individu.

JADUAL 3. Analisis regresi bagi reka bentuk faktorial penuh 2^3

Faktor	$y_1 = \text{glukosa (g/l)}$			$y_2 = \text{etanol (g/l)}$		
	Min kuasa dua	Nilai F	Nilai P	Min kuasa dua	Nilai F	Nilai P
x_1	0.00403225	64.25	< 0.0001	56.1376	531.73	< 0.0001
x_2	0.004356	69.41	< 0.0001	0.0946	0.90	0.3612
x_3	0.013924	221.87	< 0.0001	0.0352	0.33	0.5738
x_1x_2	0.007921	126.22	< 0.0001	0.0011	0.01	0.9219
x_1x_3	0.000961	15.31	0.0018	0.0189	0.18	0.6791
x_2x_3	0.00207025	32.99	< 0.0001	0.9264	8.77	0.0110
$x_1x_2x_3$	0.00525625	83.76	< 0.0001	0.4935	4.67	0.0498
Model	0.005502964	87.69	< 0.0001	8.2400	78.09	< 0.0001
	$R^2= 0.9793$			$R^2= 0.9768$		

JADUAL 4. Pemboleh ubah bebas dan tahap kepekatan yang dikaji dalam reka bentuk saringan

Pemboleh ubah	Kod had				
	-2	-1	0	1	2
Kepekatan (g/l)	50	75	100	125	150
Nisbah (bebola:substrat)	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75
Saiz bebola (cm)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

JADUAL 5. Reka bentuk eksperimen dan hasil (nilai eksperimen dan ramalan) bagi reka bentuk komposit pusat faktorial penuh 2^3

Simulasi	Kod had			Glukosa (g/l)		Etanol (g/l)	
	x_1	x_2	x_3	Eksperimen	Ramalan	Eksperimen	Ramalan
1	-1	-1	-1	0.0195	0.0184	3.9900	3.8018
2	1	-1	-1	0.0270	0.0262	4.2900	4.4643
3	-1	1	-1	0.0135	0.0116	3.9900	3.8580
4	1	1	-1	0.0200	0.0267	4.2700	4.6405

bersambung ...

... sambungan

5	-1	-1	1	0.0195	0.0160	3.6200	3.3568
6	1	-1	1	0.0180	0.0230	4.8300	5.0693
7	-1	1	1	0.0180	0.0219	2.9100	2.8430
8	1	1	1	0.0320	0.0362	4.3800	4.6755
9	-2	0	0	0.0145	0.0174	2.8900	3.2689
10	2	0	0	0.0455	0.0395	6.2500	5.7639
11	0	-2	0	0.0215	0.0233	3.9350	4.0076
12	0	2	0	0.0345	0.0296	3.8500	3.6701
13	0	0	-2	0.0075	0.0076	3.6250	3.5664
14	0	0	2	0.0180	0.0148	3.2050	3.1564
15	0	0	0	0.0240	0.0239	4.5400	4.6380
16	0	0	0	0.0170	0.0239	4.1000	4.6380
17	0	0	0	0.0245	0.0239	4.7300	4.6380
18	0	0	0	0.0285	0.0239	4.4950	4.6380
19	0	0	0	0.0275	0.0239	5.7500	4.6380
20	0	0	0	0.0250	0.0239	4.3200	4.6380

Dari keputusan analisis ANOVA, model kuadratik dicadangkan sebagai signifikan untuk penggunaan glukosa dan pengeluaran etanol. Persamaan regresi berganda akhir (Per. 4 & 5) untuk meramalkan kepekatan glukosa (y_1) dan etanol (y_2) adalah seperti berikut di mana x_1 , x_2 , dan x_3 mewakili kepekatan LBS, nisbah, dan saiz bebola masing-masing:

$$\begin{aligned}
 y_1 = & 0.024 + 0.00553x_1 + 0.00159x_2 \\
 & + 0.001781x_3 + 0.000114x_1^2 + 0.000636x_2^2 \\
 & - 0.00318x_3^2 + 0.001812x_1x_2 \\
 & - 0.000188x_1x_3 \\
 & + 0.00319x_2x_3
 \end{aligned} \quad (4)$$

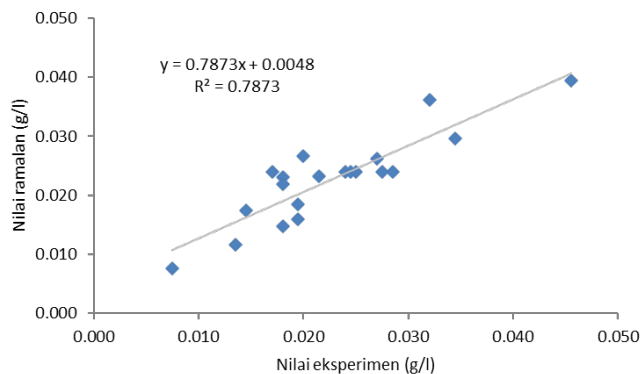
Persamaan (5)

$$\begin{aligned}
 y_2 = & 4.64 + 0.62x_1 - 0.084x_2 - 0.1x_3 \\
 & - 0.03x_1^2 - 0.2x_2^2 - 0.32x_3^2 + 0.03x_1x_2 \\
 & + 0.26x_1x_3 - 0.14x_2x_3
 \end{aligned} \quad (5)$$

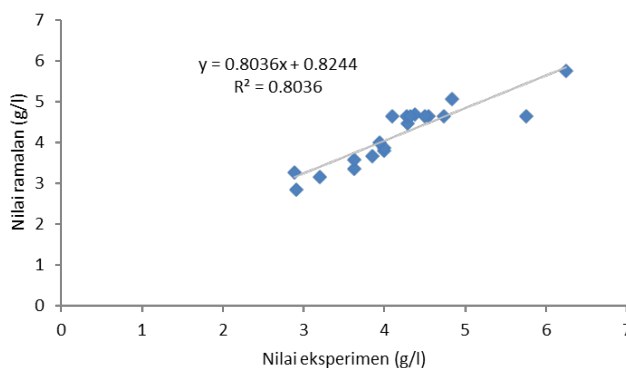
Nilai pekali penentuan R^2 untuk kedua-dua tindak balas kepekatan glukosa dan etanol masing-masing adalah 0.787 dan 0.803; nilai R^2 dianggap rendah kerana semakin dekat dengan 1 menunjukkan hubungan yang lebih baik antara eksperimen (Mahat et al. 2004), tetapi ia boleh diterima dengan model $R^2 > 0.75$ (Myers et al. 2016). Walau

bagaimanapun, kekurangan kecocokan tidak signifikan untuk ketiga-tiga pemboleh ubah bebas yang mengekspresikan kesesuaian model untuk kedua-dua tindak balas dan terma model x_1 dan x_3^2 yang mewakili kepekatan LBS dan saiz bebola masing-masing signifikan untuk kedua-dua tindak balas.

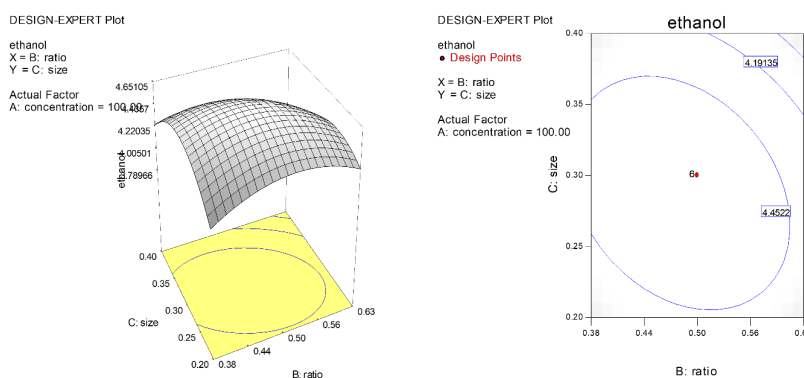
Tujuan utama pendekatan CCD dalam kajian ini adalah untuk mencari kesan yang diinginkan daripada tiga pemboleh ubah bebas dan menjejak keadaan optimum untuk pengeluaran etanol. Plot permukaan tindak balas 3-D digunakan untuk menentukan tahap optimum setiap pemboleh ubah untuk tindak balas maksimum pengeluaran etanol dengan tindak balas minimum kepekatan glukosa. Plot kontur isorespon dan permukaan yang mewakili kesan parameter proses yang berbeza, dua parameter diubah pada satu masa sementara mengekalkan yang ketiga pada tahap tengah, pada kepekatan etanol ditunjukkan dalam Rajah 1-3. (Le Man et al. 2010; Muralidhar et al. 2003) melaporkan bahawa interaksi tidak signifikan antara parameter dengan plot kontur bulat sementara plot elips menunjukkan bukti interaksi. Model meramalkan bioetanol maksimum pada kepekatan 150 g/l LBS, nisbah 0.5 bebola kepada substrat, dan saiz bebola 0.3cm.



RAJAH 1. Plot pariti yang menunjukkan taburan nilai eksperimen dan ramalan bagi kepekatan glukosa



RAJAH 2. Plot pariti yang menunjukkan taburan nilai eksperimen dan ramalan bagi kepekatan etanol



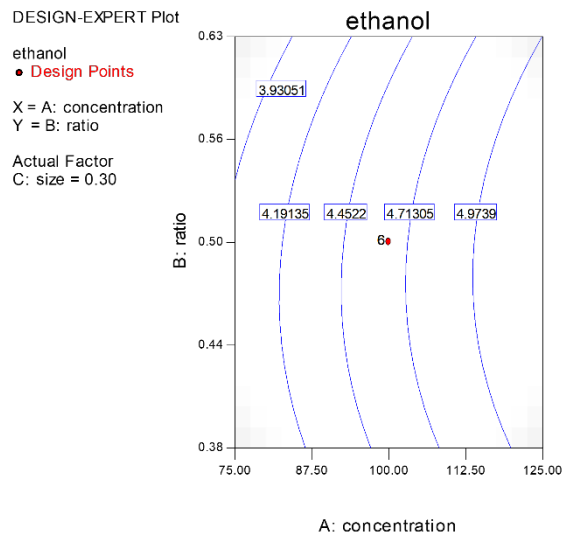
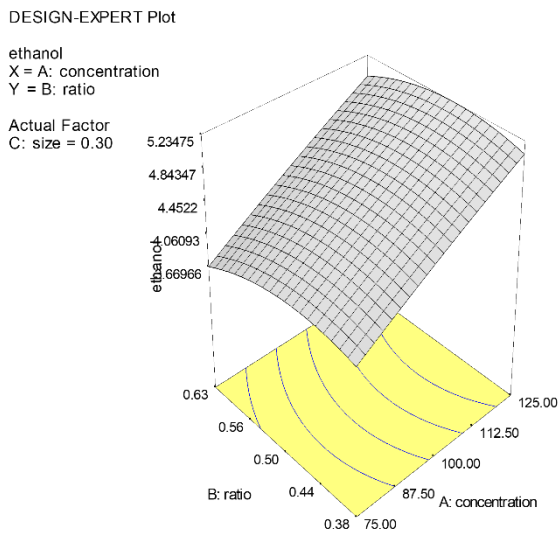
RAJAH 3. Plot permukaan tindak balas dan plot kontur kepekatan etanol daripada persamaan model: kesan nisbah dan saiz bebola

Permukaan tindak balas cembung dalam Rajah 3 menunjukkan pemboleh ubah optimum yang baik untuk kesan nisbah dan saiz bebola serta kepekatan etanol meningkat ke puncak apabila saiz bebola dan nisbah bebola kepada substrat meningkat sehingga 0.3cm dan 0.5 masing-masing, kemudian menurun dengan peningkatan selanjutnya parameter ini menunjukkan bahawa permukaan tindak balas mempunyai titik maksimum untuk hasil etanol.

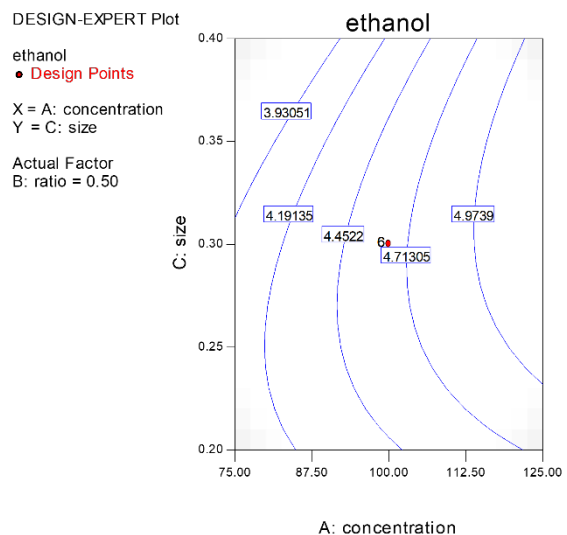
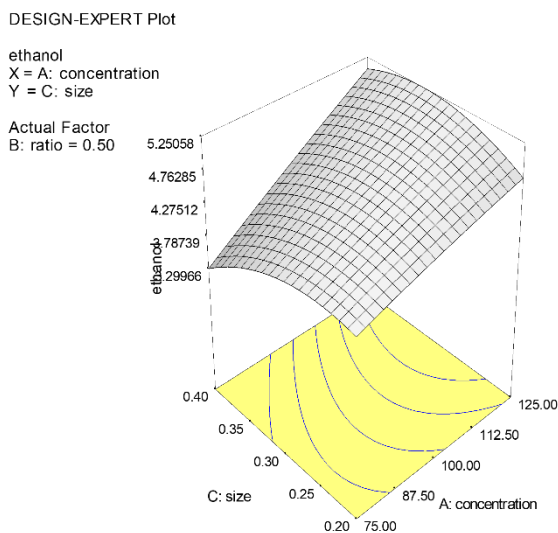
Fermentasi dengan pengimobilisasian mempertimbangkan pemindahan massa bebola kepada substrat untuk menghasilkan bioetanol. Oleh kerana bebola adalah tegar, kadar pengacauan harus rendah untuk mengelakkan bebola pecah. Bebola kecil dengan nisbah tinggi bebola kepada substrat menghadapi kesukaran dalam menghasilkan bioetanol kerana bebola cenderung melekat di antara satu sama lain dengan pengacauan rendah yang mengakibatkan

pemindahan massa berlaku antara gula dan sel yis yang terperangkap. Pasangan lain seperti kepekatan-nisbah dan kepekatan-saiz bebola pada kepekatan etanol menunjukkan sistem rabung pegun seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4 dan Rajah 5 masing-masing dalam julat eksperimen (nisbah: 0.38-0.63 saiz bebola: 0.02-0.4cm), sebarang perubahan dalam nisbah dan saiz bebola mempunyai

perbezaan kecil dalam kepekatan etanol sementara perubahan dalam kepekatan media mempunyai kesan yang signifikan terhadap kepekatan etanol. Dengan peningkatan kepekatan media sehingga 125g/l, kepekatan etanol meningkat dari 3.67 g/l kepada 5.23g/l dan menunjukkan bahawa tidak ada pengurangan terhadap hasil etanol oleh peningkatan kepekatan media LBS.



RAJAH 4. Plot permukaan tindak balas dan plot kontur kepekatan etanol daripada persamaan model: kesan kepekatan media dan nisbah



RAJAH 5. Plot permukaan tindak balas dan plot kontur kepekatan etanol daripada persamaan model: kesan kepekatan media dan saiz bebola

Daripada rekabentuk komposit pusat, keadaan optimum didapati pada kepekatan 125g/l gula merah tempatan (LBS), nisbah 0.47 (bebola: substrat), dan saiz bebola alginat 0.33cm dengan nilai optimum pengeluaran

bioetanol ialah 5.3g/l. Untuk mengesahkan pengoptimuman yang diramalkan, ujian eksperimen dilakukan menggunakan keadaan yang dicadangkan oleh mod pengoptimuman (Jadual 6).

JADUAL 6. Ringkasan pengoptimuman medium menggunakan reka bentuk eksperimen untuk pengeluaran bioetanol

Faktor	Sebelum pengoptimuman	Selepas pengoptimuman	Pengeluaran bioetanol		
			Sebelum pengoptimuman	Selepas pengoptimuman	
				Yramalan	Yeksperimen
LBS	100g/l	125g/l	4.73g/l	5.26g/l	5.4g/l
Nisbah (bebola:substrat)	0.5	0.47			
Saiz	0.3cm	0.33cm			

KESIMPULAN

Rekabentuk faktorial penuh dan rekabentuk komposit pusat membolehkan kami mencari nilai yang tepat bagi parameter fermentasi untuk produk maksimum dengan pemboleh ubah yang signifikan dan keadaan optimum untuk pengeluaran bioetanol masing-masing. Nilai optimum pengeluaran bioetanol ialah 5.3g/l dan keadaan optimum didapati pada kepekatan 125g/l gula merah tempatan (LBS), nisbah 0.47 (bebola: substrat), dan saiz bebola alginat 0.33cm.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini dibiayai oleh Geran Penyelidikan Universiti UKM-GUP-BTT-07-25-165.

PENGISYTIHARAN KEPENTINGAN BERSAING

Tiada.

REFERENCES

Bravo, P. & Gonzalez, G. 1991. Continuous ethanol fermentation by immobilized yeast cells in a fluidized-bed reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 52(1): 127-134.

Chauhan, B. & Gupta, R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry* 39(12): 2115-2122.

Derman, E., Abdulla, R., Marbawi, H., Sabullah, M. K., Gansau, J. A. & Ravindra, P. 2022. Simultaneous saccharification and fermentation of empty fruit bunches of palm for bioethanol production using a microbial consortium of *s. cerevisiae* and *t. harzianum*. *Fermentation* 8(7):

Ghasem Najafpour, G. N., Habibollah Younesi, H. Y. & Ku Ismail, K. 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*.

Göksungur, Y. & Zorlu, N. 2001. Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turkish Journal of Biology* 25(3): 265-275.

Gunam, I. B. W., Kaban, T. E. B. & Suwariani, N. P. 2022. Effect of yeast concentration and fermentation time on the characteristics of tuak from coconut sap. *Canrea Journal: Food Technology, Nutrition, and Culinary Journal* 5(2): 139-150.

Koehler, A. P., Chu, K.-C., Houang, E. T. & Cheng, A. F. 1999. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 37(2): 422-426.

Le Man, H., Behera, S. & Park, H. 2010. Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *International Journal of Environmental Science & Technology* 7: 157-164.

Mahat, M. K., Illias, R. M., Rahman, R. A., Abd Rashid, N. A., Mahmood, N. a. N., Hassan, O., Aziz, S. A. & Kamaruddin, K. 2004. Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. *Enzyme and Microbial Technology* 35(5): 467-473.

Montgomery, D. C. 2017. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons.

- Muralidhar, R., Gummadi, S. N., Dasu, V. V. & Panda, T. 2003. Statistical analysis on some critical parameters affecting the formation of protoplasts from the mycelium of *Penicillium griseofulvum*. *Biochemical Engineering Journal* 16(3): 229-235.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. & Anderson-Cook, C. M. 2016. *Response surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons.
- Permatasari, A. A. A. P., Rosiana, I. W., Wiradana, P. A., Lestari, M. D., Widiastuti, N. K., Kurniawan, S. B. & Widhiantara, I. G. 2022. Extraction and characterization of sodium alginate from three brown algae collected from Sanur Coastal Waters, Bali as biopolymer agent. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 23(3):
- Rodzi, N. a. R. M. & Lee, L. K. 2021. Traditional fermented foods as vehicle of non-dairy probiotics: Perspectives in South East Asia countries. *Food Research International* 150(110814).
- Sowatad, A. & Todhanakasem, T. 2020. Bioethanol production by repeated batch using immobilized yeast cells on sugarcane bagasse. *Waste and Biomass Valorization* 11(5): 2009-2016.
- Tataridis, P., Ntagas, P., Voulgaris, I. & Nerantzis, E. 2005. Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation. *Electron J Sci Technol* 1(1-21).
- Villacrés, N. A., Cavalheiro, E. T., Schmitt, C. C., Venâncio, T., Alarcón, H. A. & Valderrama, A. C. 2023. Preparation of composite films of sodium alginate-based extracted from seaweeds *Macrocystis pyrifera* and *Lessonia trabeculata* loaded with aminoethoxyvinylglycine. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 34(1509-1519).
- Yu, J., Zhang, X. & Tan, T. 2009. Optimization of media conditions for the production of ethanol from sweet sorghum juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy* 33(3): 521-526.
- Zhubanova, A., Abdieva, G., Ualieva, P., Akimbekov, N., Malik, A. & Tastambek, K. 2024. Whey-to-bioethanol valorisation: fermentation with immobilised yeast cells. *Engineered Science* 27: 995.