

## Penghasilan Lipid Kaya Asid Dokosaheksaenoik (DHA) oleh *Aurantiochytrium* sp. SW1 menggunakan Sisa Kulit Nanas sebagai Sumber Karbon Alternatif

(Docosahexaenoic Acid (DHA)-Rich Lipid Production by *Aurantiochytrium* sp. SW1 using Pineapple Peel Waste as an Alternative Carbon Source)

AIMAN DANIAL MOHD ZAINI<sup>1</sup>, ASVITRA PREVENA PALANIANDY<sup>1</sup>, MUHAMMAD ZIYAD ISMAIL<sup>2</sup>, NURUL AQILAH MOHD ZAINI<sup>1</sup>, NURFATIMAH MOHD THANI<sup>1</sup>, MOHAMAD YUSOF MASKAT<sup>1</sup>, AIDIL ABDUL HAMID<sup>2</sup> & MOHAMED YUSUF MOHAMED NAZIR<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Sciences, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences & Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>3</sup>Innovation Centre for Confectionery Technology (MANIS), Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 29 Februari 2024/Diterima: 28 Ogos 2024

### ABSTRAK

Thraustokaitrid seperti *Aurantiochytrium* sp. telah menarik perhatian penyelidik dan industri disebabkan kebolehannya untuk menghasilkan asid lemak politaktepu (PUFA) bernilai tinggi terutamanya asid dokosaheksaenoik (DHA, C22:6 ω-3). Namun begitu, keperluan penggunaan substrat yang mahal khususnya sumber karbon tulen semasa proses pengkulturan telah menyumbang kepada peningkatan kos pengkomersialan DHA daripada thraustokaitrid. Oleh itu, dalam kajian ini, potensi penggunaan sisa kulit nanas (SKN) yang merupakan antara sisa utama industri pertanian di Malaysia sebagai sumber karbon alternatif yang lebih murah untuk penghasilan DHA daripada *Aurantiochytrium* sp. SW1 telah dikaji. Memandangkan SKN mengandungi lignin, selulosa dan hemiselulosa yang agak kompleks, kaedah perawatan autoklaf, berasid dan beralkali pada kepekatan berbeza telah ditentukan bagi mendapatkan gula jumlah yang optimum daripada SKN. Hasil menunjukkan perawatan autoklaf secara signifikan ( $p < 0.05$ ) menghasilkan hidrolisat dengan kepekatan gula tertinggi ( $39.6 \pm 1.98$  g/L) berbanding dengan perawatan berasid dan alkali yang masing-masing dapat mengekstrak dalam julat 31-38 g/L gula jumlah. Kemudian, kebolehan *Aurantiochytrium* sp. SW1 untuk menggunakan kesemua hidrolisat SKN sebagai sumber karbon alternatif dibandingkan. Didapati, penggunaan hidrolisat SKN dengan rawatan 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bersama nutrien tambahan secara signifikan ( $p < 0.05$ ) menghasilkan biojisim tertinggi ( $7.74$  g/L  $\pm$  0.39) manakala kandungan lipid terbaik ( $60.7\% \pm 3.04$ ) terhasil apabila SW1 dikulturkan menggunakan hidrolisat SKN dengan rawatan autoklaf tanpa penambahan nutrien. Penghasilan DHA yang maksimum ( $0.68 \pm 0.034$  g/L) dicapai apabila *Aurantiochytrium* sp. SW1 dikultur menggunakan hidrolisat SKN dengan rawatan 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bersama nutrien tambahan yang mana 10-35% lebih tinggi jika dibandingkan dengan penghasilan menggunakan hidrolisat SKN yang lain. Kajian ini dapat menjadi asas ke arah penghasilan DHA yang lebih murah daripada thraustokaitrid dengan menggunakan SKN sebagai sumber karbon alternatif. Kata kunci: Asid dokosaheksaenoik; *Aurantiochytrium* sp.; sisa kulit nanas; teknik rawatan

### ABSTRACT

Thraustochytrids such as *Aurantiochytrium* sp. have drawn the attention of researchers and industries due to their ability to produce high-value polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 ω-3) from its total fatty acids. However, the requirement for expensive substrates, particularly refined carbon sources during the cultivation process, has contributed to the increased commercialization costs of DHA from thraustochytrids. Therefore, in this study, the potential use of pineapple peel waste (PPW), which is among the major agricultural wastes in Malaysia, as a cheaper alternative carbon source for DHA production from *Aurantiochytrium* sp. SW1 was investigated. Considering that PPW contains relatively complex lignin, cellulose, and hemicellulose, autoclave, acidic, and alkaline treatment methods at different concentrations were examined to obtain the optimal sugar content from PPW. The results showed that autoclave treatment yielded the highest sugar concentration ( $39.6 \pm 0.39$  g/L) significantly ( $p < 0.05$ ), compared to acidic and alkaline treatments, each of which could extract sugar within the range of 31-38 g/L. Subsequently, the ability of *Aurantiochytrium* sp. SW1 to utilize all PPW hydrolysates as a sole carbon source was compared. It was found that the use of PPW hydrolysate with 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment along with additional nutrients produced the maximum biomass ( $7.74 \pm$

0.39 g/L) significantly ( $p < 0.05$ ), and outstanding lipid content ( $60.7 \pm 3.04\%$ ) was obtained when SW1 was cultured using autoclaved PPW hydrolysate without nutrient supplementation. The maximum DHA production ( $0.68 \pm 0.034$  g/L) was achieved when *Aurantiochytrium* sp. SW1 was cultured using PPW hydrolysate with 100 mM  $H_2SO_4$  treatment along with additional nutrients, which was 10-35% higher compared to production using other PPW hydrolysates. This study could serve as a foundation towards cheaper DHA production from thraustochytrids using PPW as an alternative carbon source.  
 Keywords: *Aurantiochytrium* sp.; docosahexaenoic acids; pineapple peel waste; treatment methods

#### PENGENALAN

Lipid daripada mikrob oleaginus, iaitu mikrob yang mampu menghasilkan lebih daripada 20% lipid (g/g biojisim) telah menarik minat para saintis dan industri di seluruh dunia kerana potensi aplikasinya yang meluas dalam industri tenaga boleh diperbaharui, biofarmaseutikal dan nutraseutikal (Oliver et al. 2020). Sesetengah mikroorganisma oleaginus mampu menghasilkan asid lemak politaktepu (PUFA) yang telah terbukti banyak memainkan peranan penting dalam pelbagai mekanisme fisiologi tubuh manusia. Salah satu PUFA terpenting yang dihasilkan oleh mikrob oleaginus ini ialah asid dokosaheksaenoik (DHA) iaitu sejenis asid lemak  $\omega$ -3. Asid lemak  $\omega$ -3 dikelaskan sebagai asid lemak perlu disebabkan keterbatasan tubuh manusia untuk menghasilkannya. Oleh kerana peranan dan kepentingannya terhadap fisiologi tubuh manusia, asid lemak ini perlu diperolehi melalui diet atau diambil dalam bentuk nutrien tambahan. DHA telah dibuktikan memainkan peranan penting dalam perkembangan otak dan mata mamalia. Pengambilan DHA dalam bentuk suplemen telah dilaporkan berkesan bagi menghindari serta merawat beberapa penyakit seperti artritis reumatoid, dementia, hipertensi, diabetes mellitus dan Alzheimer (Canhada et al. 2018; Djuricic & Calder 2021). Penambahan DHA dalam makanan haiwan ternakan juga didapati dapat meningkatkan jangka hayat haiwan tersebut. Oleh itu, DHA telah digunakan secara meluas sebagai komponen nutraseutikal dalam pasaran makanan dan makanan haiwan (Oliver et al. 2020).

Sehingga kini, ikan berlemak daripada perairan sejuk seperti tuna dan salmon merupakan sumber utama DHA (Patel et al. 2021). Walau bagaimanapun, pengeluaran minyak ikan dijangka tidak dapat memenuhi permintaan pasaran yang semakin berkembang dalam masa beberapa tahun yang mendatang. Selain itu, terdapat beberapa permasalahan yang berkait dengan penghasilan PUFA daripada minyak ikan seperti memberikan kesan negatif terhadap kelestarian dan ancaman kepupusan sumber ikan disebabkan aktiviti penangkapan ikan yang tidak terkawal (Colombo et al. 2020). Tahap pencemaran laut turut sering mengakibatkan kontaminasi bahan toksik seperti merkuri dan logam berat lain di dalam minyak ikan yang dihasilkan (Zhang et al. 2020). Oleh yang demikian, sumber DHA alternatif yang lebih lestari dan selamat menggunakan thraustokaitrid oleaginus yang boleh dihasilkan melalui proses bioteknologi telah dikenal pasti. Kebanyakan

thraustokaitrid oleaginus daripada genus *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* dan *Aurantiochytrium* dilihat mampu menghasilkan lipid melebihi 50% daripada berat kering sel, mengandungi sehingga 35-50% DHA daripada asid lemak jumlah (Nazir et al. 2018).

Walaupun penghasilan DHA daripada *Aurantiochytrium* sp. ini mempunyai potensi besar untuk dibangunkan pada skala industri, namun cabaran utama yang dihadapi adalah untuk bersaing dengan pengeluaran minyak ikan yang lebih murah. Antara punca utama yang menyumbang kepada peningkatan kos pengeluaran DHA daripada mikroorganisma ini adalah disebabkan oleh penggunaan substrat yang mahal khususnya nutrien makro seperti glukosa, asid organik, ekstrak yis dan mononatrium glutamat. Tambahan pula, sumber karbon sahaja telah menyumbang hampir 70-80% daripada jumlah kos media pengkulturan dan ini menunjukkan bahawa kos pengeluaran keseluruhan DHA daripada *Aurantiochytrium* sp. sangat bergantung kepada harga sumber karbon. Disebabkan ini, pendekatan telah diambil untuk meneroka sumber karbon alternatif yang lebih murah (Du et al. 2021).

Malaysia adalah salah satu pengeluar utama nanas di Asia Tenggara dan menyumbang sebanyak 1.1 peratus daripada pengeluaran nanas dunia (FOA 2019). Bukan itu sahaja, secara kasarnya Malaysia telah mengeksport sebanyak 537,231.40 tan metrik nanas dengan Johor, Sarawak dan Selangor sebagai pengeluar utama nanas Malaysia (Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia 2022). Peningkatan permintaan nanas bukan sahaja telah menyumbang kepada peningkatan pengeluaran nanas tetapi sisa agroindustri yang meliputi jambul, kulit, daun, teras dan batang yang terhasil semasa pemprosesan nanas. Tambahan lagi, sebanyak 20-40% (b/b) sisa adalah dalam bentuk teras dan kulit (Awasthi et al. 2022; Ravindran et al. 2021).

Sisa kulit nanas (SKN) mempunyai kandungan karbohidrat yang tinggi (35-50% selulosa, 20-35% hemiselulosa dan 5-30% lignin) dan komponen penting lain seperti albumin, lipid dan vitamin (Awasthi et al. 2022). Memandangkan SKN kebiasaannya dilupuskan menerusi pembakaran, sisa ini sesuai dijadikan sebagai sumber karbon alternatif yang murah untuk pengkulturan *Aurantiochytrium* sp. Hal ini juga membantu pengurusan sisa nanas yang lebih mampan kerana pencemaran dalam sektor industri nanas ini dapat dikurangkan dan digunakan untuk penghasilan produk yang lebih bernilai tinggi. Namun, penggunaan SKN masih menjadi cabaran besar disebabkan struktur

selulosa, hemiselulosa dan ligninnya yang kompleks yang menjadikannya sukar untuk digunakan secara terus sebagai sumber karbon bagi pengkulturan *Aurantiochytrium* sp. Oleh itu, proses rawatan adalah penting untuk membantu menukarkan SKN kepada gula ringkas yang lebih mudah untuk digunakan oleh *Aurantiochytrium* sp. Dalam kajian ini, tiga jenis teknik rawatan (rawatan berasid, alkali dan autoklaf) dikaji untuk menentukan kaedah yang sesuai bagi mengekstrak gula daripada SKN. Kemudian, kebolehan *Aurantiochytrium* sp. SW1 untuk menggunakan hidrolisat yang terhasil untuk penghasilan lipid kaya DHA ditentukan dalam kajian ini.

#### BAHAN DAN KAEDAH KAJIAN

##### BAHAN

Sisa kulit nanas (SKN) daripada varieti Morris (MR) dan Josapine (JP) diperolehi daripada Lee Pineapple Co Pte Ltd, Skudai, Johor dan disimpan dalam peti beku (-20 °C) sehingga digunakan. Bahan kimia yang digunakan untuk perawatan SKN adalah asid sulfurik (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), natrium hidroksida (NaOH). Gula piawai (sukrosa, glukosa & fruktosa) dan asetonitril digunakan untuk ujian penentuan kandungan gula menggunakan analisis kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Medium pengkulturan terdiri daripada glukosa, yis ekstrak, mononatrium glutamat (MSG) dan garam laut manakala larutan yang digunakan untuk pengekstrakan lipid terdiri daripada larutan kloroform, metanol dan 90% natrium klorida (NaCl). Bahan kimia dan pelarut yang digunakan dalam kajian ini adalah gred analitik (Fisher Scientific, UK).

##### ANALISIS KOMPOSISI PROKSIMAT SKN

Analisis komposisi proksimat telah dijalankan ke atas SKN untuk menentukan komposisi karbohidrat, protein, lemak, abu, nitrogen, kelembapan serta tenaga berdasarkan kaedah AOAC (2005). Kandungan lemak ditentukan dengan kaedah Soxhlet. Seterusnya, kandungan protein ditentukan menggunakan kaedah Kjeldahl dengan pengiraan hasil darab kandungan nitrogen dengan nisbah penukaran 5.64 (Levey, Bissell & O'Keefe 2000). Akhir sekali, karbohidrat ditentukan dengan fomulasi seperti berikut:

$$\% \text{ Jumlah Karbohidrat} =$$

$$100 - (\% \text{ Abu} + \% \text{ Kelembapan} + \% \text{ Protein} + \% \text{ Lemak})$$

##### PENYEDIAAN HIDROLISAT SISA KULIT NANAS (SKN)

SKN dikeringkan pada suhu 80 °C di dalam ketuhar (Memmert Universal Oven- UM 400, 1400 watt, 50/60 Hz, Germany) sehingga mencapai berat malar. Kemudian, SKN tersebut dikisar menggunakan pengisar berkuasa tinggi (Panasonic Mixer Grinder, MX-AC400W, Malaysia) dan

ditapis bagi mendapatkan serbuk SKN. Seterusnya, serbuk SKN tersebut menjalani tiga kaedah rawatan berbeza iaitu; (a) rawatan berasid bersama autoklaf, (b) rawatan berkali bersama autoklaf dan (c) rawatan autoklaf sahaja. Hidrolisat SKN dengan rawatan autoklaf disediakan dengan mencampurkan 10% (b/i) serbuk SKN dengan air suling yang kemudiannya diautoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 15 psi selama 15 minit. Bagi teknik rawatan asid dan alkali, serbuk SKN dicampurkan ke dalam larutan asid dan alkali masing-masing pada kepekatan 50, 100, dan 200 mM asid sulfurik (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dan natrium hidroksida (NaOH). Selepas menjalani rawatan, campuran tersebut ditapis menggunakan kain muslin bagi mengasingkan hampas serta larutan hidrolisat. Hidrolisat SKN ini kemudiannya digunakan sebagai medium pengkulturan *Aurantiochytrium* sp. SW1.

##### ANALISIS KOMPOSISI GULA DALAM HIDROLISAT SKN

Komposisi dan kepekatan gula (glukosa, fruktosa dan sukrosa) dalam setiap hidrolisat SKN yang telah dirawat ditentukan menggunakan sistem HPLC-Waters dilengkapi dengan pengesan indeks biasan (Waters 2414). Kolum karbohidrat Agilent ZOBRAK (4.6mm×250 mm, 5µm) ditetapkan pada 40 °C. Fasa bergerak yang digunakan adalah asetonitril dengan air ternyahion pada nisbah 80:20 dengan kadar aliran yang ditetapkan pada 1.4 mL/min. Isi padu suntikan digunakan adalah 10 µL menggunakan penyuntik Waters 717 plus autosampler dan tempoh analisis dijalankan selama 20- 25 minit.

Larutan piawai yang mengandungi 1%, 3%, 6%, 9% dan 12% (b/i) glukosa, fruktosa dan sukrosa disediakan untuk mendapatkan lengkung piawai gula. Jumlah glukosa, fruktosa dan sukrosa dalam setiap sampel hidrolisat dihitung dengan membandingkan kawasan puncak yang terhasil daripada analisis HPLC (Nazir et al. 2018).

##### PENYEDIAAN KULTUR STOK *Aurantiochytrium* sp. SW1

Thraustokaitrid yang digunakan dalam kajian ini ialah *Aurantiochytrium* sp. SW1, yang diperolehi dari Makmal Fisiologi Mikrob, Jabatan Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Kultur stok disediakan pada agar condong nutrien air laut (SNA) yang mempunyai komposisi medium seperti berikut; 28 g/L agar nutrien, 17.5 g/L garam laut yang mencakupi 50% saliniti dan dieram pada suhu bilik. Medium penggantungan pertumbuhan (GSM) disediakan seperti berikut: gliserol 10% v/v GSM (diautoklaf secara berasingan), glukosa 60 g/L, ekstrak yis 2 g/L, mononatrium glutamat (MSG) 8 g/L dan garam laut 6 g/L. 10 mL GSM ditambahkan ke dalam kultur agar condong dan disimpan pada suhu 30 °C. Kultur stok diperbaharui setiap enam bulan.

#### PENYEDIAAN KULTUR BENIH *Aurantiochytrium* sp. SW1

Kultur benih disediakan dengan memasukkan potongan agar daripada piring kultur SNA (berusia 48 jam) dengan anggaran koloni sebanyak 40-50 koloni *Aurantiochytrium* sp. SW1 ke dalam kelalang goncangan Erlenmeyer (500 mL) yang mengandungi 100 mL medium pembenihan. Komposisi medium pembenihan adalah berdasarkan kepada Burja et al. (2006) seperti berikut: glukosa 60 g/L (diautoklaf secara berasingan), ekstrak yis 2 g/L, MSG 8 g/L dan 6 g/L garam laut semula jadi yang mencakupi 15% kepekatan air laut semula jadi (NSW). Kultur benih ini dieram selama 48 jam pada suhu 30 °C dengan kadar goncangan 200 rpm dalam mesin penggoncang eraman (Infors HT, Switzerland). Kultur bernih ini kemudiannya digunakan sebagai inokulum bagi pengkulturan *Aurantiochytrium* sp. SW1 menggunakan hidrolisat SKN.

#### PENGGKULTURAN *Aurantiochytrium* sp. SW1 MENGGUNAKAN HIDROLISAT SKN

Hidrolisat SKN yang dihasilkan dengan rawatan yang berbeza disediakan dengan dan tanpa nutrien tambahan bagi pengkulturan *Aurantiochytrium* sp. SW1. Sebelum pengkulturan, pH hidrolisat SKN diselaraskan kepada sekitar 6.5–7.0 menggunakan asid dan alkali berkepekatan tinggi (8M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan 8M NaOH). Seterusnya, bagi pengkulturan tanpa nutrien tambahan, hidrolisat digunakan secara terus manakala bagi pengkulturan dengan nutrien tambahan, komponen berikut ditambah ke dalam hidrolisat: ekstrak yis (2 g/L), mononatrium glutamat (MSG) (8 g/L) dan garam laut (6 g/L). Pengkulturan dijalankan dengan menginokulat 10% (v/v) kultur benih ke dalam kelalang goncangan 250 mL yang mengandungi 50 mL medium pengkulturan di atas. Kultur dieram selama 120 jam pada 30 °C dengan kadar penggoncangan pada 200 rpm menggunakan penggoncang eraman.

#### PENENTUAN BERAT BIOJISIM

Biojisim *Aurantiochytrium* sp. SW1 dituai dengan mengempar kultur pada 8000 × g selama 10 minit pada suhu 4 °C menggunakan pengempar Eppendorf 5810 R (Nazir et al. 2018). Kemudian, pelet dibilas dengan air suling sebanyak dua kali dan kemudiannya dikeringkan di dalam mesin penyahhidrat makanan pada 70 °C selama 24 jam. Berat kering biojisim tersebut ditimbang dan kepekatan biojisim diekspres sebagai gram biojisim per liter (g/L) medium pengkulturan.

#### PENGEKSTRAKAN LIPID DAN PENENTUAN PROFIL ASID LEMAK

Pengekstrakan lipid ke atas sel *Aurantiochytrium* sp. SW1 dilakukan berdasarkan kaedah Folch, Lees dan Sloane

Stanley (1957). Biojisim kering dicampur dengan 20x (i/b) campuran kloroform dan metanol pada nisbah 2:1. Campuran ini dihomogen secara sonikasi (Ultrasonic Homogenizer, JY96-IIN, SCIENTZ, China) selama 120 saat pada frekuensi 100 Hz dan dibiarkan semalaman. Sisa sel dituras menggunakan kertas turas Whatman No.1. Fraksi organik mengandungi lipid yang bebas daripada sisa sel dimasukkan ke dalam corong pemisah dan dicampurkan dengan larutan NaCl (0.9%) untuk bilasan pertama. Fraksi organik yang terpisah daripada lapisan akueus dibilas sebanyak dua kali menggunakan air suling. Fraksi organik ini kemudiannya diruap menggunakan penyejat berputar (Büchi Rotavapor R-124, Switzerland). Lipid bebas pelarut yang tertinggal dalam kelalang bulat dilarutkan dengan 3 hingga 4 mL dietil eter dan dimasukkan dalam botol kaca kecil yang mana berat keringnya telah ditimbang terlebih dahulu. Campuran lipid dan pelarut dibiarkan meruap semalaman dalam kebuk wasap dan lipid yang tertinggal dalam botol kaca disimpan dalam pengering hampagas selama 24 jam sebelum jisimnya ditimbang. Seterusnya, nilai kandungan lipid dalam biojisim ditentukan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ lipid} = \frac{\text{berat lipid setelah diruapkan}}{\text{berat sel kering}} \times 100$$

Kemudian, komposisi asid lemak sampel ditentukan menggunakan kaedah kromatografi gas (HP 5890) dilengkapi dengan turus kapilari (BPX 70, 30 cm, 0.32 µm). Penyediaan FAME dilakukan dengan menambah 0.05 mL 1 M natrium metoksida ke dalam 0.05 g lipid yang telah dilarutkan ke dalam 0.95 mL heksana. Sampel sebanyak 1 µL disuntik menggunakan helium sebagai gas pembawa dengan kadar aliran 40 cm/min. Suhu turus GC dinaikkan secara perlahan kepada 7 °C min<sup>-1</sup> daripada 50 (5 min tertahan) kepada 200 °C (10 min tertahan). Injektor dikekalkan pada 200 °C. Perisian kromatografi Chrome Leon (Dionex, Sunnyvale, California, USA) digunakan bagi menkuantitikan dan mengenalpasti puncak asid lemak yang terhasil.

#### ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik ANOVA dijalankan menggunakan perisian Minitab® 21.4.2 (64-bit). Komposisi gula dalam hidrolisat SKN telah dianalisis menggunakan analisis variasi (ANOVA) satu hala dan analisis Post-Hoc Turkey dengan nilai kurang daripada 0.05 (p<0.05) dianggap signifikan secara statistik. Manakala penghasilan berat sel kering dan peratusan lipid yang terhasil daripada keadaan rawatan yang berbeza dinilai dan dibandingkan dengan analisis variasi (ANOVA) dua hala dan analisis Post-Hoc Tukey dengan nilai kurang daripada 0.05 (p<0.05) dianggap signifikan secara statistik.

## HASIL KAJIAN DAN PERBINCANGAN

## PERINCIAN KOMPOSISI PROKSIMAT SISA KULIT NANAS

Analisis proksimat telah dijalankan untuk menentukan komposisi nutrisi terkandung dalam SKN yang telah dikisar dan dikeringkan. Hasil mendapati komposisi tertinggi SKN ialah kandungan karbohidrat iaitu sebanyak  $79.82 \pm 3.99\%$  (b/b) manakala yang terendah ialah kandungan lemak dengan peratusan sebanyak  $0.9 \pm 0.05\%$  (b/b) (Jadual 1). Hasil penemuan ini selari dengan kajian yang dijalankan oleh Morais et al. (2016) dan Zakaria et al. (2021) yang mana karbohidrat didapati sebagai komponen utama dalam SKN dan komposisi lemak merupakan komponen yang terendah.

Selain itu, didapati kandungan karbohidrat dalam SKN yang digunakan dalam kajian ini juga merupakan yang tertinggi berbanding dengan kajian lain. Hal ini kerana kandungan karbohidrat yang ditentukan dalam kajian ini merupakan kandungan karbohidrat bersama dengan kandungan serabut kasar, berbeza dengan kajian lain yang membezakan komposisi kedua-dua jenis karbohidrat tersebut. Serabut kasar dalam kulit buah diperhatikan sebagai komposisi kedua tertinggi selepas karbohidrat dengan komponen serabut kasar utama dalam SKN terdiri daripada selulosa, hemiselulosa dan lignin (Zain et al. 2021). Selain itu, kandungan karbohidrat yang terkandung dalam SKN juga boleh dipengaruhi oleh faktor lain seperti jenis nanas, tahap kematangan buah, musim pada masa nanas tersebut dituai dan faktor geografi (Nazir et al. 2018).

Seterusnya, kandungan abu yang mewakili jumlah unsur surih dalam SKN ialah  $3.20 \pm 0.16\%$  (b/b) lebih rendah berbanding dengan Owoeye et al. (2022), Zakaria et al. (2021), Abdullah dan Mat (2008) dan Morais et al. (2016) yang masing-masing mempunyai kandungan sebanyak 3.78%, 4.87%, 4.05% dan 5.10% (w/w). Unsur surih yang terdapat dalam SKN ini berpotensi digunakan sebagai sumber nutrien mikro bagi pengkulturan mikroorganisma. Selain itu, kandungan protein ( $3.38 \pm 0.17\%$ , b/b), di dalam SKN yang digunakan dalam kajian ini juga menunjukkan trend yang sama dengan kandungan abu yang mempunyai kandungan protein yang rendah berbanding kajian lain yang masing-masing mempunyai kandungan sebanyak 3.7%, 5.78 %, 5.18 % dan 7.3% (b/b) (Jadual 1).

Variasi komposisi proksimat SKN yang diperoleh dalam kajian ini berbanding dengan kajian lain boleh dijelaskan daripada sumber SKN yang digunakan dalam kajian. Sebagai contoh, sampel SKN yang digunakan dalam kajian ini diperoleh daripada kilang pengetinan nanas (Lee Pineapple Ltd., Skudai, Johor Bahru) dan terdapat campuran beberapa bahagian lain seperti isi, daun, batang serta pulpa, berbeza dengan kebanyakan sampel SKN yang digunakan dalam kajian lain yang hanya mengandungi kulit nanas semata-mata (Jadual 1). Tambahan lagi, perbezaan lokasi geografi, kematangan dan jenis kepelbagaian nanas juga memainkan peranan dalam penentuan jumlah kandungan komposisi nutrien di dalam nanas (Zain et al. 2021).

## KESAN RAWATAN BERBEZA TERHADAP KOMPOSISI GULA DALAM HIDROLISAT SISA KULIT NANAS

Dalam kajian ini, hidrolisat SKN diperoleh melalui tiga teknik rawatan berbeza iaitu; (a) rawatan berasid, (b) rawatan beralkali dan (c) rawatan autoklaf. Kemudian, komposisi kandungan gula yang terkandung dalam hidrolisat SKN yang telah dirawat ditentukan dengan tiga jenis gula iaitu glukosa, fruktosa dan sukrosa dijadikan sebagai sasaran pengenalanpastian (Jadual 2). Walau bagaimanapun, hanya dua jenis gula ringkas sahaja iaitu glukosa dan fruktosa dapat dikesan manakala sukrosa tidak dapat dikesan dalam kesemua sampel hidrolisat SKN. Kajian oleh Nazir et al. (2018) dan Rivera et al. (2023) telah melaporkan sukrosa adalah salah satu gula utama terkandung dalam sisa nanas. Walau bagaimanapun, kuantiti sukrosa menurun secara drastik apabila sisa ini dikeringkan dan dirawat pada suhu tinggi dalam keadaan asid dan alkali, menunjukkan berlakunya degradasi sukrosa kepada glukosa dan fruktosa semasa proses perawatan SKN.

Secara keseluruhan, terdapat tujuh sampel hidrolisat diperoleh iaitu tiga sampel daripada rawatan berasid (50 mM, 100 mM dan 200 mM  $H_2SO_4$ ), tiga sampel daripada rawatan beralkali (50 mM, 100 mM dan 200 mM NaOH) dan satu sampel daripada rawatan autoklaf. Berdasarkan hasil analisis ANOVA satu hala, didapati terdapat perbezaan signifikan ( $p < 0.05$ ) antara jenis rawatan SKN terhadap komposisi gula yang terhasil. Hidrolisat SKN yang dirawat dengan autoklaf sahaja mempunyai kandungan jumlah gula ringkas yang tertinggi iaitu sebanyak  $39.6 \pm 1.98$  g/L diikuti dengan 100mM  $H_2SO_4$  ( $37.1 \pm 1.59$  g/L), 200 mM  $H_2SO_4$  ( $36.7 \pm 1.84$  g/L) dan 50 mM  $H_2SO_4$  ( $35.2 \pm 1.76$  g/L) (Jadual 2). Keputusan yang diperoleh sejajar dengan kajian oleh Pathanibul dan Hongkulsup (2021) yang menunjukkan hasil gula ringkas diperoleh lebih tinggi apabila dirawat dengan autoklaf sahaja berbanding rawatan berasid (1% dan 3% (i/i)  $H_2SO_4$ ). Rawatan berasid digunakan untuk pelarutan dan penurunan hemiselulosa serta selulosa dalam biojisim dengan memecahkan daya *van der Waals*, ikatan hidrogen dan ikatan kovalen (Amin et al. 2017). Namun, proses rawatan berasid mempunyai kelemahan dengan sebahagian glukosa dan galaktosa yang terkandung dalam hidrolisat boleh terdegradasi menghasilkan produk sampingan seperti asid asetik, 5-hidroksimetil-2-furaldehid (HMF) dan 2-furaldehid (furfural) yang akan merencat pertumbuhan mikrob pada kepekatan yang tinggi sekiranya digunakan sebagai substrat pengkulturan (Lorenci Woiciechowski et al. 2020). Oleh itu, hasil kajian jumlah gula yang lebih rendah bagi rawatan berasid berbanding autoklaf sahaja berkemungkinan disebabkan oleh penukaran gula ringkas kepada sebatian lain. Walau bagaimanapun, kandungan bahan sampingan tersebut tidak ditentukan dalam kajian ini.

Di samping itu, Jadual 2 juga menunjukkan hidrolisat SKN yang menjalani rawatan beralkali memperoleh gula jumlah yang lebih rendah berbanding rawatan berasid dan

rawatan autoklaf. Rawatan SKN dengan kepekatan alkali 200 mM, 100 mM dan 50 mM, NaOH masing-masing menghasilkan jumlah gula sebanyak ( $33.3 \pm 1.67$ ) g/L, ( $32.0 \pm 1.60$ ) g/L dan ( $31.7 \pm 1.59$ ) g/L (Jadual 2). Hasil yang diperoleh adalah selaras dengan yang dilaporkan oleh Sukruansuwan dan Napathorn (2018) dengan hidrolisat kulit nanas beralkali (NaOH dan  $\text{CaCO}_3$ ) memperoleh jumlah gula ringkas yang lebih rendah berbanding rawatan autoklaf sahaja. Secara amnya, rawatan beralkali digunakan untuk memecahkan lignin daripada biojisim lignoselulosa kepada hemiselulosa dan selulosa yang seterusnya dihidrolisiskan kepada gula ringkas. Namun, keberkesanan proses ini bergantung kepada kandungan lignin dalam biojisim lignoselulosa dengan peningkatan kandungan lignin meyebabkan kaedah ini kurang berkesan (Amin et al. 2017). Tambahan lagi, rawatan beralkali lebih

berkesan pada kayu keras berbanding dengan kayu lembut disebabkan oleh kandungan unit *syringyl* yang lebih tinggi yang menyebabkan ia lebih mudah untuk didelignifikasi (Kim, Lee & Kim 2016). SKN dianggap sebagai kayu lembut dengan kandungan lignin yang rendah (Sukruansuwan & Napathorn 2018). Selain itu, apabila dirawat dengan alkali, sebahagian daripada selulosa dan hemiselulosa terdegradasi daripada biojisim dengan tindakan ion hidroksida semasa proses delignifikasi (Cheng et al. 2010). Oleh yang demikian, dapat disimpulkan bahawa rawatan beralkali kurang sesuai bagi mendapatkan kandungan gula yang tinggi daripada SKN. Kemudian, kesemua hidrolisat SKN yang diperoleh dalam kajian ini digunakan sebagai sumber karbon alternatif bagi pengkulturan *Aurantiochytrium* sp. SW1 dan kesannya terhadap penghasilan biojisim, kandungan lipid dan komposisi asid lemak ditentukan.

JADUAL 1. Komposisi proksimat sisa kulit nanas

Komposisi	Unit	Kajian ini	Owoeye et al. (2022)	Zakaria et al. (2021)	Abdullah dan Mat (2008)	Morais et al. (2016)
Lembapan	%	$12.70 \pm 0.64$	5.10	-	-	8.80
Kandungan Abu	%	$3.20 \pm 0.16$	3.78	4.87	4.05	5.10
Lemak	%	$0.90 \pm 0.05$	5.57	1.80	0.15	1.30
Nitrogen	%	$0.60 \pm 0.03$	-	-	0.83	-
Protein	%	$3.38 \pm 0.17$	5.78	3.70	5.18	7.30
Karbohidrat	%	$79.82 \pm 3.99$	75.67	52.30	-	61.60
Serabut kasar	%	-	4.10	37.30	10.57	15.90
Tenaga	kcal/100 g	$340.90 \pm 17.05$	357.05	-	-	-

JADUAL 2. Komposisi gula utama dalam hidrolisat SKN dengan kaedah rawatan berbeza yang ditentukan melalui HPLC

Jenis rawatan	Kandungan gula (g/L)		
	Fruktosa	Glukosa	Gula jumlah
50 mM $\text{H}_2\text{SO}_4$	$13.4 \pm 0.67^{ab}$	$21.8 \pm 1.09^{bc}$	$35.2 \pm 1.76^{bc}$
100 mM $\text{H}_2\text{SO}_4$	$13.4 \pm 0.62^a$	$23.7 \pm 1.19^{ab}$	$37.1 \pm 1.79^{ab}$
200 mM $\text{H}_2\text{SO}_4$	$13.8 \pm 0.69^{ab}$	$22.9 \pm 1.15^{abc}$	$36.7 \pm 1.84^b$
50 mM NaOH	$12.6 \pm 0.63^{ab}$	$19.1 \pm 0.96^{bc}$	$31.7 \pm 1.59^d$
100 mM NaOH	$12.1 \pm 0.61^{ab}$	$19.9 \pm 0.96^c$	$32.0 \pm 1.6^d$
200 mM NaOH	$11.7 \pm 0.59^b$	$21.6 \pm 1.08^{bc}$	$33.3 \pm 1.6^c^d$
Autoklaf	$14.3 \pm 0.72^a$	$25.3 \pm 1.27^a$	$39.6 \pm 1.98^a$

Data adalah min  $\pm$  SD data triplikat. <sup>a-d</sup>:Min dengan huruf berbeza menunjukkan perbezaan signifikan mengikut ujian post-hoc Turkey selepas ANOVA satu-hala ( $p < 0.05$ )

KESAN PENGGUNAAN HIDROLISAT SKN YANG DIRAWAT  
DENGAN KAEDAH RAWATAN BERBEZA TERHADAP  
PENGHASILAN BIOJISIM

Pertumbuhan *Aurantiochytrium* sp. SW1 di dalam tujuh hidrolisat SKN yang telah dirawat dengan rawatan yang berbeza ditentukan dengan mengkulturkan SW1 dengan dan tanpa tambahan nutrien. Kepekatan biojisim yang diperoleh adalah seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1. Berdasarkan analisis statistik ANOVA dua-hala dengan ujian post-hoc Tukey, terdapat korelasi yang signifikan ( $p < 0.05$ ) antara penambahan nutrien dengan jenis perawatan SKN terhadap penghasilan biojisim *Aurantiochytrium* sp. SW1.

Didapati biojisim yang dihasilkan daripada kesemua hidrolisat SKN dengan penambahan nutrien lain mempunyai hasil yang lebih tinggi (3.68 - 7.74 g/L) berbanding dengan hidrolisat tanpa penambahan nutrien (2.06 - 4.62 g/L) (Rajah 1). Hal ini kerana penambahan nutrien lain iaitu ekstrak yis (2g/L), mononatrium glutamat (MSG) (8g/L) dan garam laut (6g/L) dalam hidrolisat dapat menjadi sumber makronutrien dan mikronutrien bagi menampung pertumbuhan sel dengan lebih baik. Ekstrak yis dan MSG merupakan sumber nitrogen manakala garam laut merupakan sumber unsur surih bagi pertumbuhan sel. Tambahan lagi, ekstrak yis juga menyumbang kepada kandungan vitamin seperti vitamin B1, B2 dan B12. Walaupun hidrolisat SKN juga didapati mempunyai kandungan nitrogen, nilainya adalah rendah (0.06 g/L) dan sebagai salah satu nutrien makro yang penting untuk pertumbuhan mikrob, kepekataannya tidak mencukupi untuk menampung pertumbuhan sel *Aurantiochytrium* sp. SW1 yang optimum. Ini menunjukkan hidrolisat SKN secara sendirinya tidak sesuai untuk digunakan secara terus tanpa penambahan nutrien lain bagi pengkulturkan *Aurantiochytrium* sp. SW1.

Seterusnya, ketiga-tiga biojisim tertinggi yang terhasil adalah apabila *Aurantiochytrium* sp. SW1 dikulturkan di dalam hidrolisat SKN yang dirawat dengan asid bersama dengan penambahan nutrien lain. Hidrolisat yang dirawat dengan 100 mM, 200 mM dan 50 mM  $H_2SO_4$  masing-masing mempunyai penghasilan biojisim sebanyak (7.74  $\pm$  0.39) g/L, (7.30  $\pm$  0.37) g/L dan (6.92  $\pm$  0.35) g/L dengan hanya 40 - 110% lebih tinggi berbanding dengan biojisim yang terhasil apabila menggunakan hidrolisat dengan rawatan berkali dan autoklaf. Hasil biojisim ini selari dengan hasil kandungan komposisi gula yang lebih tinggi (35.2 - 37.1 g/L) dalam hidrolisat yang dirawat dengan asid seperti dalam Rajah 1. Namun, hipotesis ini tidak disokong dengan penghasilan biojisim SW1 yang dikulturkan dengan hidrolisat SKN yang dihasilkan menggunakan teknik autoklaf. Walaupun hidrolisat yang dihasilkan menggunakan rawatan autoklaf didapati menghasilkan kandungan gula tertinggi berbanding dengan keadaan rawatan yang lain, penghasilan berat sel keringnya dilihat antara yang terendah. Hal ini berkemungkinan kerana terdapat komponen lain di dalam hidrolisat SKN dengan

rawatan berasid seperti  $SO_4$  atau bahan lain yang terhasil di dalam hidrolisat SKN tersebut yang boleh meningkatkan pertumbuhan SW1. Walau bagaimanapun, kajian yang lebih terperinci perlu dijalankan untuk mengesahkan keputusan ini.

Selain itu, menurut beberapa kajian lepas, biojisim *Aurantiochytrium* sp. SW1 boleh mencapai 15.0 - 20 g/L (Auma, Hamid & Yusoff 2018; Manikan, Kalil & Hamid 2015; Nazir et al. 2018), lebih tinggi berbanding dengan hasil dalam kajian ini. Hal ini berkemungkinan disebabkan penggunaan medium dengan komposisi yang optimum, terutamanya jumlah kandungan gula atau sumber karbon yang digunakan hampir dua kali ganda lebih tinggi (glukosa/fruktosa; 60-70 g/L) berbanding kandungan sumber karbon yang dihasilkan daripada hidrolisat SKN (31-39 g/L) dalam kajian ini.

KESAN PENGGUNAAN HIDROLISAT SKN DENGAN KAEDAH  
RAWATAN BERBEZA TERHADAP PENGHASILAN LIPID OLEH  
*Aurantiochytrium* sp. SW1

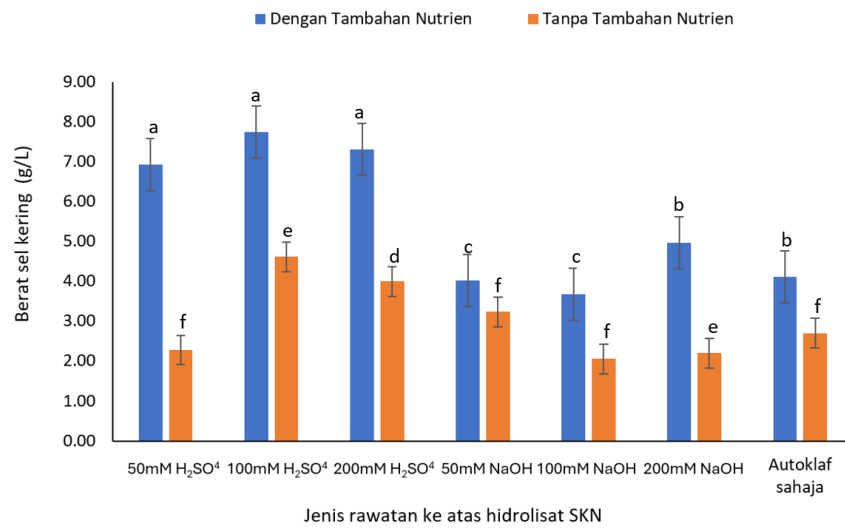
Kesan penggunaan hidrolisat SKN hasil rawatan berbeza dengan dan tanpa penambahan nutrien terhadap penghasilan lipid oleh *Aurantiochytrium* sp. SW1 telah dijalankan (Rajah 2). Hasil ANOVA dua-hala dengan ujian post-hoc Turkey menunjukkan terdapat korelasi antara penambahan nutrien dan jenis rawatan terhadap penghasilan lipid *Aurantiochytrium* sp. SW1. Juga, terdapat perbezaan signifikan terhadap penghasilan lipid oleh mikrob ini apabila dikulturkan di dalam medium dengan jenis hidrolisat SKN yang dihasilkan menggunakan rawatan yang berbeza ( $p < 0.05$ ) (Rajah 2).

Berdasarkan Rajah 2, perbezaan peratusan lipid (% lipid/g biojisim) yang ketara dapat dilihat yang mana pengkulturkan SW1 di dalam medium dengan tambahan nutrien lain menghasilkan peratusan lipid yang lebih rendah berbanding dengan pengkulturkan di dalam medium tanpa tambahan nutrien. Peratusan lipid yang lebih rendah ini berkemungkinan disebabkan terdapat kandungan sumber nitrogen yang berlebihan di dalam medium hidrolisat tersebut. Nitrogen merupakan nutrien penting yang diperlukan untuk pertumbuhan sel mikrob oleaginus seperti *Aurantiochytrium* sp. SW1. Namun, bagi mencetuskan pengumpulan lipid yang banyak di dalam mikrob oleaginus, keadaan terhadap nitrogen dalam medium kultur diperlukan. Apabila sumber nitrogen dalam medium telah habis digunakan, lebih karbon dalam medium akan diasimilasikan oleh sel dan ditukar menjadi lipid simpanan yang sekali gus meningkatkan penghasilan lipid simpanan di dalam sel (Ratledge 2004). Hal ini dapat dilihat apabila pengkulturkan di dalam hidrolisat yang dirawat dengan 100 mM  $H_2SO_4$  bersama tambahan nutrien, menghasilkan biojisim yang tinggi (7.74  $\pm$  0.37 g/L, Rajah 2) dan lipid yang rendah (8%) berbanding apabila dikulturkan tanpa tambahan yang menghasilkan biojisim rendah tetapi dengan

kandungan lipid yang tinggi namun kandungan lipidnya rendah (8%). Sebaliknya, pengkulturan di dalam hidrolisat tanpa tambahan nutrien menghasilkan biojisim yang rendah tetapi menghasilkan kandungan lipid yang tinggi. Hal ini kerana kandungan nitrogen di dalam hidrolisat autoklaf tanpa penambahan komponen medium lain adalah jauh lebih rendah seperti yang ditunjukkan dengan hasil analisis proksimat (Jadual 1) yang sekali gus menghasilkan keadaan terhad nitrogen. Keputusan yang serupa juga diperoleh dalam kajian Jakobsen (2019) dan Pawar et al. (2021) ke atas genus yang sama iaitu *Aurantiochytrium* sp. strain T66 dan *Aurantiochytrium limacinum* yang menunjukkan

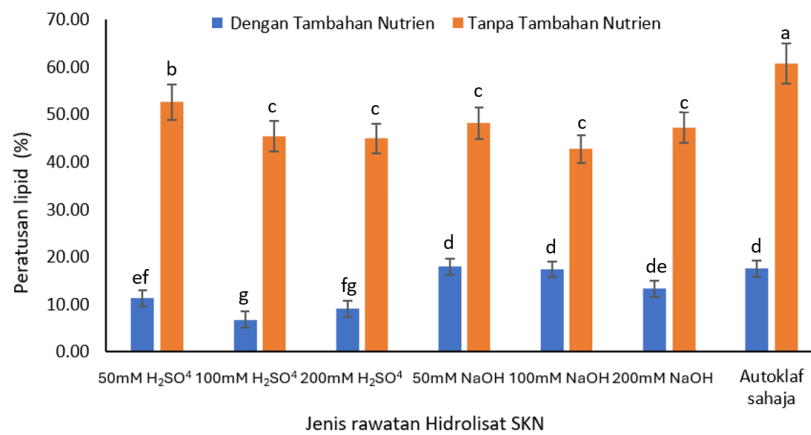
keadaan terhad nitrogen di dalam medium pengkulturan adalah penting untuk mengaruh penghasilan lipid yang banyak di dalam mikrob tersebut.

Oleh itu, kandungan nutrien terutamanya nitrogen dan karbon di dalam medium hidrolisat memainkan peranan penting bagi penghasilan lipid oleh *Aurantiochytrium* sp. SW1. Justeru, hidrolisat SKN ini perlu diubah suai kandungan nutriennya iaitu penggunaan nisbah karbon dan nitrogen (K:N) yang tinggi bagi mencapai pertumbuhan sel yang optimum berpandukan hasil daripada biojisim serta peratusan lipid.



Data adalah min ± SD data triplikat. <sup>a-f</sup>:Min dengan huruf berbeza menunjukkan perbezaan signifikan mengikut ujian post-hoc Turkey selepas ANOVA dua-hala (p<0.05)

RAJAH 1. Penghasilan biojisim daripada *Aurantiochytrium* sp. SW1 menggunakan hidrolisat SKN dengan dan tanpa nutrien tambahan



Data adalah min ± SD data triplikat. <sup>a-g</sup>:Min dengan huruf berbeza menunjukkan perbezaan signifikan mengikut ujian post-hoc Tukey selepas ANOVA dua-hala (p<0.05)

RAJAH 3.2 Penghasilan kandungan lipid (% , g lipid/g biojisim) daripada *Aurantiochytrium* sp. SW1 menggunakan hidrolisat SKN dengan kaedah rawatan berbeza



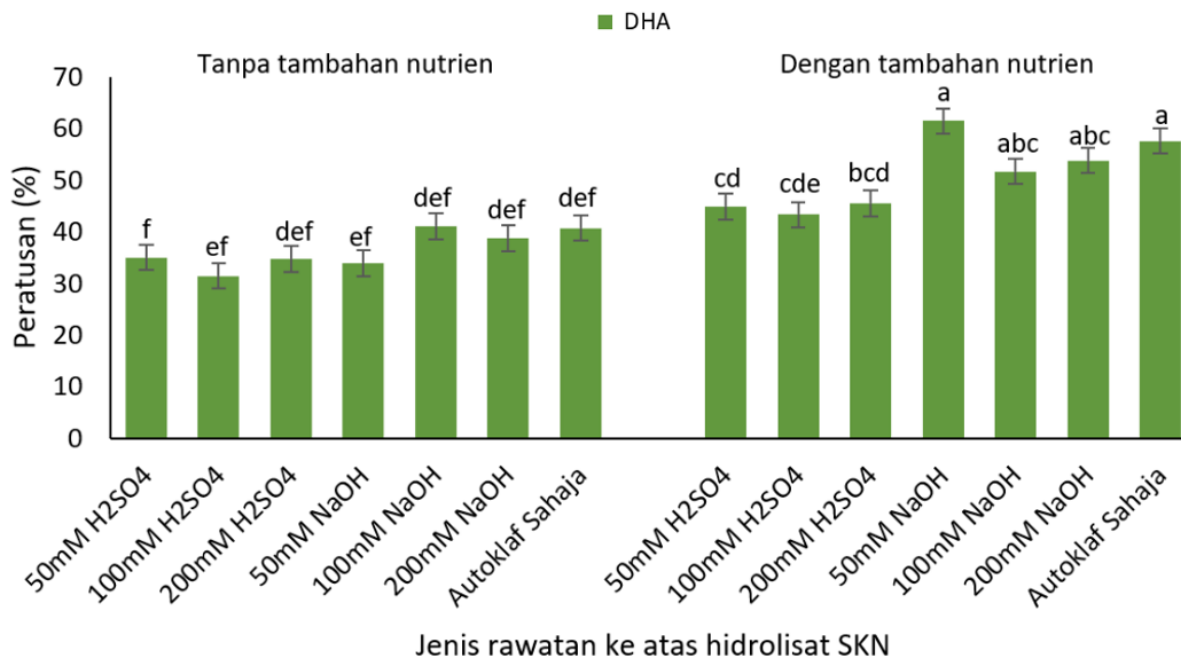
KESAN PENGGUNAAN HIDROLISAT SKN DENGAN KAEDAH RAWATAN BERBEZA TERHADAP PROFIL ASID LEMAK OLEH *Aurantiochytrium* sp. SW1

Lipid yang telah diekstrak kemudiannya digunakan untuk penentuan kesan penggunaan hidrolisat SKN dengan kaedah rawatan berbeza terhadap profil asid lemak yang dihasilkan oleh *Aurantiochytrium* sp. SW1 (Rajah 3).

Secara keseluruhannya, didapati asid lemak utama yang terhasil adalah asid palmitik (C16:0), asid miristik (C14:0), asid dokosapentaenoik (22;n5, DPA) dan DHA yang mana ia selari dengan kajian lepas yang telah dijalankan menggunakan *Aurantiochytrium* sp. SW1 (Manikan et al. 2015; Nazir et al. 2018; Rahman et al. 2020) (Rajah 3). Selain itu, berdasarkan ANOVA satu hala dengan ujian post-hoc Tukey (Rajah 4), jenis rawatan serta penambahan nutrien didapati memberi kesan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) terhadap peratusan DHA yang terhasil. Secara keseluruhannya, penambahan nutrien lain dalam hidrolisat meningkatkan komposisi DHA yang terhasil sebanyak 12.8-38.4% berbanding dengan hidrolisat tanpa tambahan nutrien lain. Hal ini kerana penambahan nutrien lain seperti MSG memberi kesan ke atas sel *Aurantiochytrium* sp. SW1 yang membantu pertumbuhan sel dan biosintesis DHA. Sebagai contoh, kajian yang dijalankan oleh Auma, Hamid dan Yusoff (2018) dan Nazir

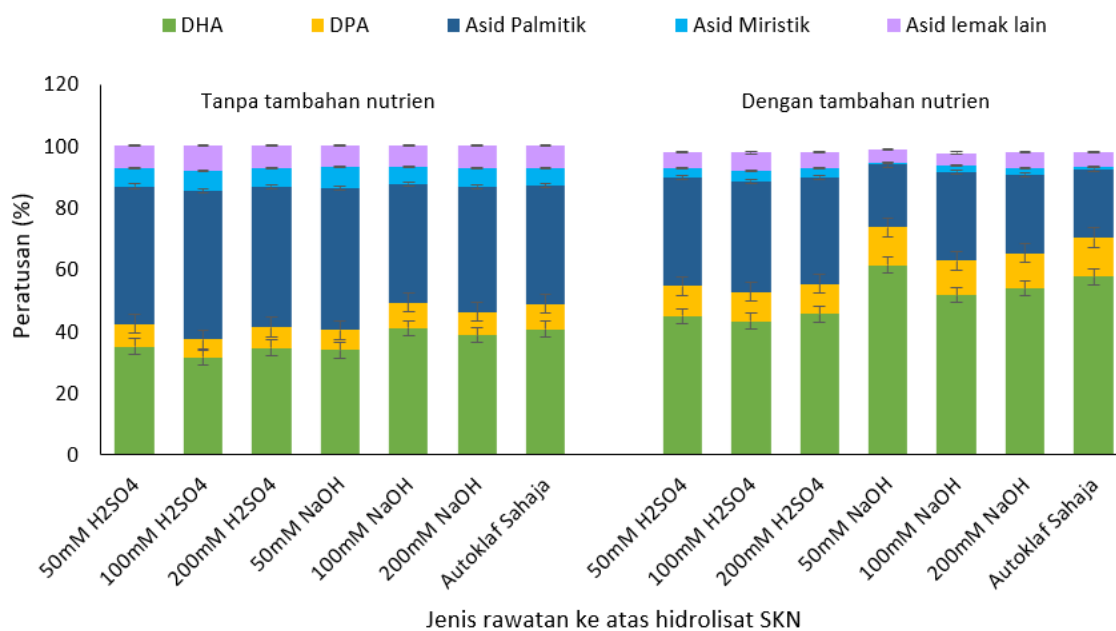
et al. (2018) menunjukkan korelasi positif antara kepekatan MSG dan biosintesis DHA oleh *Aurantiochytrium* sp. SW1. Penghasilan DHA yang tertinggi dapat dilihat pada hidrolisat yang dirawat dengan 0.5% NaOH bersama tambahan nutrien iaitu sebanyak 61.4%. Hal ini mungkin disebabkan kepekatan perencat yang kurang daripada hasil kesan rawatan. Walau bagaimanapun, kajian yang lebih terperinci perlu dijalankan untuk mengesahkan keputusan ini.

Hasil keseluruhan DHA (g/L) dan yil DHA (g/g gula yang digunakan) berdasarkan jumlah gula terhasil telah dipersembahkan dalam Jadual 3. Didapati hidrolisat dirawat dengan 100 mM  $H_2SO_4$  tanpa tambahan nutrien didapati membawa penghasilan dan produktiviti DHA tertinggi iaitu sebanyak  $0.68 \pm 0.03$  g/L dan  $0.17 \pm 0.0085$  g DHA/hari (Jadual 3). Berdasarkan ANOVA dua hala dengan ujian post-hoc Tukey (Jadual 3), terdapat perbezaan yang signifikan terhadap DHA (g/L) dan yil DHA (g/g gula yang digunakan) apabila SW1 dikultur menggunakan hasil hidrolisat SKN dengan pra-rawatan berbeza serta keadaan nutrien medium pengkulturan. Hidrolisat dirawat dengan 100 mM  $H_2SO_4$  tanpa tambahan nutrien didapati membawa penghasilan dan produktiviti DHA tertinggi iaitu sebanyak  $0.68 \pm 0.03$  g/L dan  $0.17 \pm 0.0085$ g DHA/hari (Jadual 3), yang menunjukkan perbezaan ketara berbanding kebanyakan rawatan lain ( $p < 0.05$ ).



Data adalah min  $\pm$  SD data triplikat. a-f:Min dengan huruf berbeza menunjukkan perbezaan signifikan mengikut ujian post-hoc Tukey selepas ANOVA dua-hala ( $p < 0.05$ )

RAJAH 4. Peratusan DHA terkandung dalam *Aurantiochytrium* sp. SW1 daripada hidrolisat SKN dengan kaedah rawatan berbeza



Data adalah min  $\pm$  SD data triplikat

RAJAH 3. Profil asid lemak (% daripada asid lemak jumlah) *Aurantiochytrium* sp. SW1 daripada hidrolisat SKN dengan kaedah rawatan berbeza

JADUAL 3. Penghasilan dan produktiviti DHA oleh *Aurantiochytrium* sp. SW1 apabila dikultur menggunakan hidrolisat SKN dengan dan tanpa tambahan nutrien

Jenis rawatan	DHA (g/L)	Produktiviti DHA (g DHA/hari)
<b>Tanpa tambahan nutrien</b>		
50mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>de</sup>	0.11 $\pm$ 0.0055 <sup>cd</sup>
100mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.68 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.0085 <sup>a</sup>
200mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.60 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	0.15 $\pm$ 0.076 <sup>ab</sup>
50mM NaOH	0.55 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.14 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
100mM NaOH	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>fg</sup>	0.09 $\pm$ 0.0045 <sup>ef</sup>
200mM NaOH	0.41 $\pm$ 0.02 <sup>fg</sup>	0.10 $\pm$ 0.005 <sup>de</sup>
Autoklaf Sahaja	0.66 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.16 $\pm$ 0.008 <sup>ab</sup>
<b>Dengan tambahan nutrien</b>		
50mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.38 $\pm$ 0.019 <sup>efg</sup>	0.09 $\pm$ 0.046 <sup>ef</sup>
100mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.27 $\pm$ 0.014 <sup>h</sup>	0.07 $\pm$ 0.0035 <sup>g</sup>
200mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.33 $\pm$ 0.017 <sup>fgh</sup>	0.08 $\pm$ 0.004 <sup>fg</sup>
50mM NaOH	0.48 $\pm$ 0.024 <sup>d</sup>	0.12 $\pm$ 0.006 <sup>c</sup>
100mM NaOH	0.34 $\pm$ 0.017 <sup>fg</sup>	0.09 $\pm$ 0.0045 <sup>ef</sup>
200mM NaOH	0.38 $\pm$ 0.019 <sup>efg</sup>	0.09 $\pm$ 0.0045 <sup>ef</sup>
Autoklaf Sahaja	0.34 $\pm$ 0.018 <sup>gh</sup>	0.08 $\pm$ 0.004 <sup>fg</sup>

Data adalah min  $\pm$  SD data triplikat. <sup>a-f</sup>:Min dengan huruf berbeza menunjukkan perbezaan signifikan mengikut ujian post-hoc Tukey selepas ANOVA dua-hala ( $p < 0.05$ )

## KESIMPULAN

Kesimpulannya, penghasilan lipid kaya DHA oleh *Aurantiochytrium* sp. SW1 berjaya dihasilkan menggunakan ekstrak SKN sebagai sumber karbon alternatif. Didapati perawatan SKN menggunakan autoklaf berjaya mengekstrak kandungan gula yang lebih tinggi berbanding perawatan asid dan alkali. Kesan penggunaan hidrolisat SKN dengan perawatan berbeza, bersama penambahan dan tanpa penambahan nutrien lain menunjukkan biojisim tertinggi ( $7.74 \pm 0.39$  g/L) berjaya dihasilkan apabila *Aurantiochytrium* sp. SW1 dikulturkan menggunakan ekstrak SKN yang dirawat dengan 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bersama nutrien tambahan manakala kandungan lipid tertinggi (60.7%) dihasilkan menggunakan hidrolisat SKN dengan rawatan autoklaf tanpa penambahan nutrien. Penghasilan DHA yang tertinggi ( $0.68 \pm 0.03$  g/L) dicapai apabila *Aurantiochytrium* sp. SW1 dikultur menggunakan hidrolisat SKN dengan rawatan 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bersama nutrien tambahan yang mana ia 10-35% lebih tinggi jika dibandingkan dengan penghasilan menggunakan hidrolisat SKN yang lain.

## PENGHARGAAN

Kajian ini telah dibiayai oleh Geran Universiti Penyelidikan dengan kod geran (GUP-2022-047) daripada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM).

## RUJUKAN

- Abdul Rahman, S.N.S., Kalil, M.S. & Hamid, A.A. 2021. Production of docosahexaenoic acid, DHA using different modes of cultivation by *Aurantiochytrium* sp. SW1. *Sains Malaysiana* 50(7): 1947–1957.
- Abdullah, A. and Mat, H. 2008. Characterisation of solid and liquid pineapple waste. *Reaktor*, 12(1): 48-52.
- Amin, F.R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S.U., Zhang, R., Liu, G. & Chen, C. 2017. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* 7: 72.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Washington DC: AOAC.
- Auma, K., Hamid, A.A. & Yusoff, W.M.W. 2018. Effect of nitrogen sources on biomass, lipid and docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium* sp. SW1. *AIP Conference Proceedings* 1940(1): 020065.
- Awasthi, M.K., Azelee, N.I.W., Ramli, A.N.M., Rashid, S.A., Manas, N.H.A., Dailin, D.J., Illias, R.M., Rajagopal, R., Chang, S.W., Zhang, Z. & Ravindran, B. 2022. Microbial biotechnology approaches for conversion of pineapple waste in to emerging source of healthy food for sustainable environment. *International Journal of Food Microbiology* 373: 109714.
- Burja, A.M., Radianingtyas, H., Windust, A. & Barrow, C.J. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: Screening of strains and optimization of Omega-3 production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(6): 1161-1169.
- Canhada, S., Castro, K., Schweigert Perry, I. & Luft, V.C. 2018. Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutr. Neurosci.* 21: 529-538.
- Cheng, Y.S., Zheng, Y., Yu, C.W., Dooley, T.M., Jenkins, B.M. & Vanderghenst, J.S. 2010. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(6): 1768–1784.
- Colombo, S.M., Rodgers, T.F., Diamond, M.L., Bazinet, R.P. & Arts, M.T. 2020. Projected declines in global DHA availability for human consumption as a result of global warming. *Ambio*. 49(4): 865-880.
- Djuricic, I. & Calder, P.C. 2021. Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients* 13(7): 2421.
- Du, F., Wang, Y.Z., Xu, Y.S., Shi, T.Q., Liu, W.Z., Sun, X.M. & Huang, H. 2021. Biotechnological production of lipid and terpenoid from *thraustochytrids*. *Biotechnology Advances* 48: 107725.
- FAO. 2019. Major tropical fruits - Preliminary market results 2019. *Rome*: 3–4. Diakses pada 10 Mei 2024.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226(1): 497-509.
- Jakobsen, A.N. 2008. Compatible solutes and docosahexaenoic acid accumulation of *thraustochytrids* of the *Aurantiochytrium* group. PhD Thesis. Faculty of Natural Sciences and Technology, Norwegian University of Science and Technology (Unpublished).
- Kim, J.S., Lee, Y.Y. & Kim, T.H. 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 199: 42-48.
- Lembaga Perindustrian Nanas Malaysia. 2022. *Data Statistik Nanas 2022*.
- Levey, D.J., Bissell, H. & O'Keefe, S.F. 2000. Conversion of nitrogen to protein and amino acids in wild fruits. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1749-1763.
- Lorenci Woiciechowski, A., Dalmas Neto, C.J., Porto de Souza Vandenberghe, L., de Carvalho Neto, D.P., Novak Sydney, A.C., Letti, L.A.J., Karp, S.G., Zevallos Torres, L.A. & Soccol, C.R. 2020. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance - Conventional processing and recent advances. *Bioresource Technology* 304: 122848.

- Manikan, V., Kalil, M.S. & Hamid, A.A. 2015. Response surface optimization of culture medium for enhanced docosahexaenoic acid production by a Malaysian thraustochytrid. *Scientific Reports* 5: 8611.
- Manikan, V., Nazir, M.Y.M., Kalil, M.S., Isa, M.H.M., Kader, A.J.A., Yusoff, W.M.W. & Hamid, A.A. 2015. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. *Algal Research* 9: 40-47.
- Morais, D.R., Rotta, E.M., Sargi, S.C., Bonafe, E.G., Suzuki, R.M., Souza, N.E., Matsushita, M. & Visentainer, J.V. 2016. Proximate composition, mineral contents and fatty acid composition of the different parts and dried peels of tropical fruits cultivated in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28(2): 308-318.
- Nazir, Y., Shuib, S., Kalil, M.S., Song, Y. & Hamid, A.A. 2018. Optimization of culture conditions for enhanced growth, lipid and docosahexaenoic acid (DHA) production of *Aurantiochytrium* SW1 by response surface methodology. *Scientific Reports* 8: 8909.
- Oliver, L., Dietrich, T., Marañón, I., Villarán, M.C. & Barrio, R.J. 2020. Producing Omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of sustainable sources and future trends for the EPA and DHA market. *Resources* 9(12): 148.
- Owoeye, T.F., Akinlabu, D.K., Ajayi, O.O., Afolalu, S.A., Popoola, J.O. & Ajani, O.O. 2022. Phytochemical constituents and proximate analysis of dry pineapple peels. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 993: 012027.
- Patel, A., Karageorgou, D., Katapodis, P., Sharma, A., Rova, U., Christakopoulos, P. & Matsakas, L. 2021. Bioprospecting of thraustochytrids for Omega-3 fatty acids: A sustainable approach to reduce dependency on animal sources. *Trends in Food Science & Technology* 115: 433-444.
- Pathanibul, P. & Hongkulsup, C. 2021. Production of succinic acid from pineapple peel waste. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-474844/v1>
- Pawar, P.R., Velani, S., Kumari, S., Lali, A.M. & Prakash, G. 2021. Isolation and optimization of a novel thraustochytrid strain for DHA rich and astaxanthin comprising biomass as aquafeed supplement. *3 Biotech* 11: 71.
- Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86(11): 807-815.
- Ravindran, B., Karmegam, N., Yuvaraj, A., Thangaraj, R., Chang, S.W., Zhang, Z. & Kumar Awasthi, M. 2021. Cleaner production of agriculturally valuable benignant materials from industry generated bio-wastes: A review. *Bioresource Technology* 320(PA): 124281.
- Rivera, A.M.P., Toro, C.R., Londoño, L., Bolivar, G., Ascacio, J.A. & Aguilar, C.N. 2023. Bioprocessing of pineapple waste biomass for sustainable production of bioactive compounds with high antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization* 17(1): 586-606.
- Sukruansuwan, V. & Napathorn, S.C. 2018. Use of agro-industrial residue from the canned pineapple industry for polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* strain A-04. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 11: 202.
- Zain, N.A., Aziman, S.N., Suhaimi, M.S. & Idris, A. 2021. Optimization of L(+) lactic acid production from solid pineapple waste (SPW) by *Rhizopus oryzae* NRRL 395. *Journal of Polymers and the Environment* 29: 230-249.
- Zakaria, N.A., Rahman, R.A., Abang Zaidel, D.N., Dailin, D.J. & Jusoh, M. 2021. Microwave-assisted extraction of pectin from pineapple peel. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 17(1): 33-38.
- Zhang, X., Lin, L., Chen, Z., Zhang, J., Wang, X. & Tao, N. 2020. Characterization of refined fish oil from small fish in Mauritania. *Aquaculture and Fisheries* 7(6): 639-646.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: yusufnazir@ukm.edu.my