

## PEMANFAATAN LIMBAH BUAH NANAS SEBAGAI MEDIA PERTUMBUHAN *Xanthophyllomyces dendrorhous* UNTUK PRODUKSI LIPID

### *Utilization of Pineapple Juice Base Growth Medium for Lipid Production by Xanthophyllomyces dendrorhous*

Ria Dewi Andriani<sup>1\*</sup>, Saengchai Akeprathumchai<sup>2</sup>, Kobkul Laoteng<sup>3</sup>, Kanokwan Poomputsa<sup>2</sup>,  
Phenjun Mekvichitsaeng<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Akademi Analisis Farmasi dan Makanan Malang,

<sup>2</sup>School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi,  
Bangkhuntien, Bangkok 10150, Thailand

<sup>3</sup>Biochemical Engineering and Pilot Plant Research and Development Unit, National Center for Genetic  
Engineering and Biotechnology at King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkhuntien,  
Bangkok 10150, Thailand

<sup>4</sup>Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Technology Thonburi,  
Bangkhuntien, Bangkok 10150, Thailand

\*Penulis Korespondensi: email andriani.rd@gmail.com

#### ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui biomassa dan produksi lipid oleh *X. dendrorhous* dengan menggunakan limbah buah nanas sebagai media kultivasi. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa limbah buah nanas mengandung sukrosa, glukosa dan fruktosa dengan konsentrasi 23.58; 39.14 dan 36.86 g/L. Beberapa asam organik yang terkandung pada limbah buah nanas diantaranya adalah asam asetat, asam sitrat, asam propionat dengan konsentrasi 21.70; 2751.30 dan 51.00 mM, selain itu asam amino esensial maupun non esensial juga terdiksi dalam limbah buah nanas. Berdasarkan kandungan gula, asam organik dan asam amino, maka limbah buah nanas dapat dijadikan sebagai media kultivasi untuk pertumbuhan *X. dendrorhous*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biomassa dan total lipid yang diperoleh pada saat *X. dendrorhous* dikultivasi dalam jus nanas sebesar 5.14 g/L dan 8.90% TFA/DW, sedangkan biomassa dan total lipid dari *X. dendrorhous* yang ditumbuhkan dalam *yeast medium* (YM) sebesar 4.88 g/L dan 4.10 % TFA/DW. Hasil yang demikian menunjukkan bahwa pemanfaatan limbah buah nanas sebagai media kultivasi untuk *X. dendrorhous* merupakan salah satu cara untuk mengoptimalkan pemanfaatan limbah dan dari segi ekonomi dapat menekan biaya produksi pada saat *X. dendrorhous* dioptimasi.

Kata Kunci: Biomassa, lipid, *X. dendrorhous*, limbah buah nanas

#### ABSTRACT

The main objective of this study lies in utilization of pineapple juice concentrate, an agricultural by-product derived from canned pineapple industry, as a low cost base growth medium to cultivate and simultaneously produce lipid by the red yeast *X. dendrorhous*. Pineapple juice was characterized and revealed that sucrose, glucose, and fructose were present at the concentration of 23.58, 39.14, and 36.86 g/L, respectively. In addition, acetic acid, citric acid, propionic acid concentrations of 21.70, 2751.30, and 51.00 mM were found to be the main acid in pineapple juice concentrate together with several amino acids; therefore, it possible to employ as base culture medium to cultivate *X. dendrorhous*. Results on cultivation of *X. dendrorhous* in the concentration of total sugar 10 g/L pineapple juice without supplemented of nitrogen source was satisfactory in comparison with that of yeast medium. Biomass and lipid content obtained of when cultivated *X. dendrorhous* in pineapple juice were of 5.14 g/L and 8.90 % in dry cell weight, respectively, while biomass and lipid content when cultivated in yeast medium were 4.88 g/L and 4.10 % in dry cell weight, respectively. Since yeast medium was rather expensive, moreover, cultivation of *X. dendrorhous* in pineapple juice concentrate, a low cost substrate, was fairly reasonable. Therefore, pineapple juice could be an excellent substrate for cultivating *X. dendrorhous* when appropriately optimized.

Keywords: biomass, lipid, *X. dendrorhous*, pineapple juice

## PENDAHULUAN

*Xanthophyllomyces dendrorhous* merupakan khamir merah yang berpotensi menghasilkan pigmen karotenoid dengan astaxantin sebagai pigmen utamanya (Martin *et al.*, 2008). Astaxantin merupakan pigmen yang diperlukan sebagai suplemen karena kaya akan antioksidan, dapat dipakai untuk pakan ikan dan unggas dengan tujuan untuk memberikan warna merah sehingga dapat meningkatkan tingkat kesukaan konsumen (Frengova and Beshkova, 2009). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa *X. dendrorhous* tidak hanya mampu mensintesis astaxantin, tetapi juga lipid yang mengandung beberapa asam lemak. Johnson *et al.* (1979) menyatakan bahwa khamir merah *X. dendrorhous* memiliki kemampuan untuk mengakumulasi lipid dalam sel. Sebagian besar asam lemak jenuh dan tidak jenuh yang terkandung dalam khamir ini adalah asam lemak palmitat (C16:0) oleat (C18:1 $\Delta^9$ ) dan linoleat (C18:2 $\Delta^{9,12}$ ) (So *et al.*, 1997). Lebih lanjut Libkind *et al.* (2007) mengemukakan bahwa beberapa komposisi asam lemak yang diproduksi oleh *X. dendrorhous* strain CRUB 853 diantaranya adalah asam linoleat atau  $\omega$ -6 (64.8%), asam oleat (15%), asam palmitat (11.3%) and  $\alpha$ -asam linolenat (5.4%).

Asam lemak terutama asam lemak tak jenuh (PUFA) memiliki dua fungsi utama: (i) mengatur dinamika, fase transisi dan permeabilitas membran, dan (ii) bertindak sebagai prekursor biosintesis eikosanoid termasuk di dalamnya prostaglandin dan tromboksan, mengatur fungsi hormon yang diperlukan untuk menjalankan fungsi dari organ tubuh manusia. Mamalia tidak dapat mensintesis PUFA secara *de novo*, maka PUFA harus diperoleh dari sumber makanan. Defisiensi PUFA dapat mengakibatkan kelainan pada kulit, sistem saraf, sistem kekebalan tubuh, sistem inflamasi, sistem endokrin, ginjal, pernapasan dan sistem reproduksi (Certik and Shimizu, 1999).

Berdasarkan pentingnya manfaat dari PUFA, maka untuk meningkatkan produksi lipid perlu adanya pemilihan medium pertumbuhan yang tepat sehingga dapat menghasilkan produksi lipid yang tinggi sekaligus dapat meminimalkan biaya produksi. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah memanfaatkan media pertumbuhan yang berasal dari limbah

pertanian. Industri hasil pengalengan nanas menghasilkan limbah berupa kulit dan hati buah sekitar 47%. Berdasarkan hal ini maka limbah buah nanas yang mengandung beberapa nutrisi (Abdullah and Mat, 2008; Elkins *et al.*, 1997; Rosma and Cheong, 2007; Femi-Ola *et al.*, 2009) dapat dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk yang memiliki nilai ekonomi lebih tinggi.

## BAHAN DAN METODE

### Pembuatan Media dan Inokulum

Khamir merah *X. dendrorhous* TISTR 5730, diperoleh dari Thailand Institute of Scientific and Technology Research (TISTR) dalam bentuk *freeze dried cultures*. Strain selanjutnya dipertahankan dalam *yeast medium* (YM) agar. Inokulum dibuat dengan cara menginokulasi satu ose *yeast* dari agar *plate* ke dalam 50 ml media YM dan diinkubasi pada suhu 22 °C, 200 rpm selama 24 jam. Kultur stok dibuat dengan cara mensuspensikan media YM dengan penambahan 20% gliserol dan disimpan pada suhu -80 °C.

Limbah buah nanas diperoleh dari Pilot Plant Development and Training Institute King Mongkut's University of Technology Thonburi. Limbah buah nanas dalam bentuk konsentrat selanjutnya diencerkan dengan *DI water* dan selanjutnya disaring dengan kain dan disentrifus pada kecepatan 4500 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C.

### Karakterisasi Limbah Buah Nanas

Kandungan gula (sukrosa, glukosa dan fruktosa) dalam limbah buah nanas dilakukan pengujian dengan menggunakan HPLC yang dilengkapi dengan *Sugarpack column* (Waters, United States). 5 ppm CaEDTA dilarutkan dalam *deionized water* untuk digunakan sebagai *mobile phase*. Temperatur dari kolom dipertahankan pada suhu 80 °C, sedangkan volume sampel yang digunakan sebesar 20  $\mu$ L. Sukrosa, glukosa dan fruktosa diidentifikasi sesuai dengan waktu retensi yang ditentukan dengan menggunakan standar. Selanjutnya total kjeldahl nitrogen (TKN) ditentukan berdasarkan metode *Association of Official Analytical Chemistry* (1990). Kandungan asam organik dan asam amino dalam limbah buah nanas ditentukan berdasarkan metode

Association of Official Analytical Chemistry (1990) dan selanjutnya dideteksi dengan menggunakan HPLC, sedangkan untuk total karbon dianalisa sesuai dengan metode Carter (1993).

#### Kultivasi *X. dendrorhous* dalam Yeast Medium dan Limbah Buah Nanas

Media YM dan jus limbah buah nanas yang telah diencerkan sampai konsentrasi 10 g/L dari total gula diambil sebanyak 150 mL dan kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer 500 mL. Tahapan berikutnya adalah sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Proses selanjutnya adalah memasukkan inokulum sebanyak 10% v/v dan diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 22 °C, agitasi 200 rpm. Sampel selanjutnya diambil secara periodik dan disentrifugasi pada suhu 4 °C, 4500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang didapatkan dilakukan pengujian total gula, sedangkan sel pelet digunakan untuk menentukan biomassa dan total lipid dengan menggunakan spektrofotometer pada absorbansi 660 nm dan *gas chromatography* (GC).

#### Analisa Biomassa dan Total Lipid

Biomassa ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer pada absorbansi 660 nm (Kongtragool, 2006). Total lipid ditentukan dengan metode transmetilasi dan selanjutnya asam lemak dideteksi dengan menggunakan GC (Shimadzu, Japan) (Lapage and Roy, 1986) yang dilengkapi dengan *flame ionization detector* dan *Omegawax™ 250 capillary column*. Helium digunakan sebagai *carrier gas*. Injektor dan

detektor masing-masing dipertahankan pada suhu 250 and 260 °C. *Henicosanoic acid* (C21:0) digunakan sebagai internal standar. *Total fatty acids* (TFA) dihitung berdasarkan *chromatographic peak areas*. Persentase asam lemak/fatty acid (FA) dalam berat kering sel dihitung sebagai berikut:

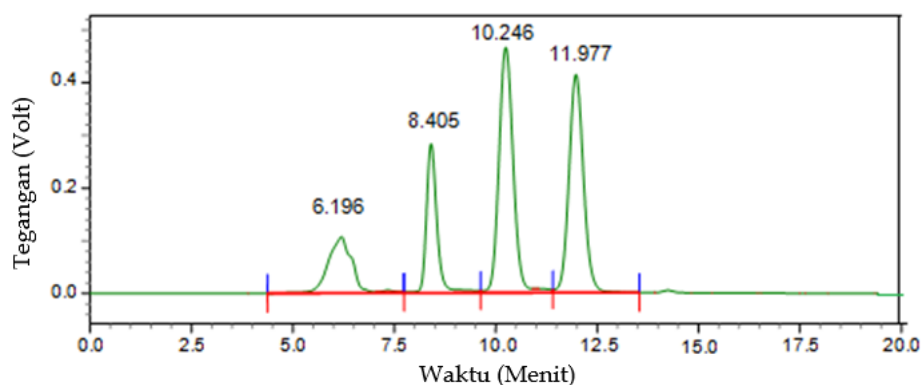
$$\%FA/TFA = \frac{\text{area FA}}{\text{total area}} \times 100$$

$$\%TFA/DW = \frac{\text{total area}}{\text{area C21}} \times \frac{\text{berat dari C21}}{\text{berat sampel}} \times 100$$

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian kandungan gula dalam limbah buah nanas seperti yang tertera dalam kromatogram pada Gambar 1 menunjukkan bahwa komposisi gula dalam limbah buah nanas terdiri dari peak yang tidak teridentifikasi, sukrosa, glukosa dan fruktosa dengan waktu retensi 6.19; 8.41; 10.25 dan 11.98 menit. Konsentrasi sukrosa, glukosa dan fruktosa yang didapatkan sebesar 23.58; 39.14 dan 36.86 g/L. Hasil dalam penelitian ini sesuai dengan Abdullah and Mat (2008), yang menyatakan bahwa komposisi gula yang terdapat dalam limbah jus nanas adalah sukrosa, glukosa dan fruktosa dengan konsentrasi 16.75; 19.72 dan 20.62 g/L.

Selanjutnya limbah buah nanas dianalisa lebih lanjut untuk mengetahui kandungan asam organik, asam amino dan komponen penting lainnya. Beberapa asam organik yang terdeteksi dalam limbah buah nanas antara lain adalah asam asetat, asam



Gambar 1. Kromatogram komposisi gula dalam limbah buah nanas terdiri dari peak yang tidak teridentifikasi, sukrosa, glukosa dan fruktosa dengan waktu retensi 6.196; 8.405; 10.246 dan 11.977 menit.

Tabel 1. Karakterisasi media limbah buah nanas dalam total gula 100 g/L

Parameter	Hasil Penelitian
Kandungan Gula (g/L)	
Sukrosa	23.58 ± 0.36
Glukosa	39.14 ± 0.60
Fruktosa	36.86 ± 0.57
Asam Organik (mM)	
Asam sitrat	21.70 ± 0.00
Asam propionat	51.00 ± 10.75
Asam butirat	8.50 ± 0.56
Asam Iso-butirat	6.45 ± 1.63
Asam asetat	2751.30 ± 533.58
Asam malat	-
Kandungan Karbon (% w/w)	
Kadar abu	2.95 ± 0.05
Total karbon	53.92 ± 0.03
Bahan organik	97.05 ± 0.05
Kandungan Nitrogen (% w/w)	
Nitrogen (TKN)	0.36 ± 0.005
Protein (N x 6.25)	2.27 ± 0.03

Tabel 2. Profil asam amino limbah buah nanas

Asam Amino	Hasil Penelitian (mg/100 mL)
Essensial	
Leusin	92.30 ± 0.20
Lisin	86.90 ± 0.40
Valin	80.70 ± 0.30
Threonin	74.70 ± 0.60
Isoleusin	60.90 ± 0.30
Phenilalanin	57.10 ± 0.50
Histidin	31.30 ± 0.00
Methionin	30.50 ± 0.40
Tirosin	17.90 ± 0.40
Non Essensial	
Arginin	9.30 ± 0.10
Alanin	147.70 ± 0.10
Aspartat	369.50 ± 2.10
Asparagin	-
Glutamat	212.30 ± 0.70
Glutamin	-
Glisin	88.00 ± 0.60
Prolin	68.10 ± 1.60
Sistein	8.70 ± 0.60
Serin	116.60 ± 0.40
Total	1552.40

sitrat dan asam propionat pada konsentrasi 21.70; 2751.30 dan 51.00 mM seperti yang disajikan pada Tabel 1. Hasil yang didapatkan ini relatif lebih tinggi daripada hasil penelitian Abdullah and Mat (2008) yang mengemukakan bahwa kandungan asam sitrat dalam limbah buah nanas sebesar 2.18 g/L.

Hasil analisa proksimat menunjukkan bahwa limbah buah nanas mengandung total karbon, abu dan bahan organik yang masing-masing sebesar 53.92; 2.95 dan 97.05%. Kandungan nitrogen ditentukan berdasarkan total Kjeldahl nitrogen (TKN) adalah 0.36% dan protein sebesar 2.27%. Nilai TKN yang didapatkan dalam penelitian ini lebih

kecil dari yang dilaporkan oleh Abdullah and Mat (2008) yaitu sebesar 0.64 g/L, namun protein yang dihasilkan lebih tinggi daripada hasil yang diperoleh Abdullah and Mat (2008) yaitu sebesar 1.13 g/L. Meskipun demikian, perlu diketahui bahwa protein dalam penelitian ini dihitung berdasarkan TKN yang terdiri dari nitrogen organik dan anorganik, sedangkan kadar protein yang dilaporkan oleh Abdullah and Mat (2008) dinyatakan sebagai protein terlarut.

Limbah buah nanas juga kaya akan asam amino baik asam amino esensial maupun non esensial dengan total sebesar 1552.40 mg/100 mL (Tabel 2). Konsentrasi tertinggi terdapat pada asam amino aspartat yaitu sebesar 369.50 mg/100 mL, sementara untuk asam amino glutamat sebesar 212.30 mg/100 mL. Elkins *et al.* (1997) menyatakan bahwa delapan belas asam amino kecuali sistein ditemukan dalam limbah buah nanas dengan konsentrasi tertinggi ditemukan pada asam amino asparagin sebesar 551 mg/100 g. Berdasarkan hasil ini maka limbah buah nanas sangat memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai media kultivasi *X. dendrorhous*.

Setelah mengetahui bahwa limbah buah nanas merupakan media yang sesuai untuk fermentasi mikroorganisme berdasarkan kandungannya yang telah dijelaskan di atas, selanjutnya *X. dendrorhous* ditumbuhkan dalam media limbah buah nanas dan yeast media (YM) sebagai pembanding. Gambar 2 A dan B menunjukkan profil dari biomassa, total gula dan total lipid pada saat *X. dendrorhous* dikultivasi dalam limbah buah nanas dan media YM. Berdasarkan hasil penelitian, pertumbuhan *X. dendrorhous* pada media YM dan limbah buah nanas menunjukkan pertumbuhan yang lebih cepat pada fase logaritmik seiring dengan kecepatan

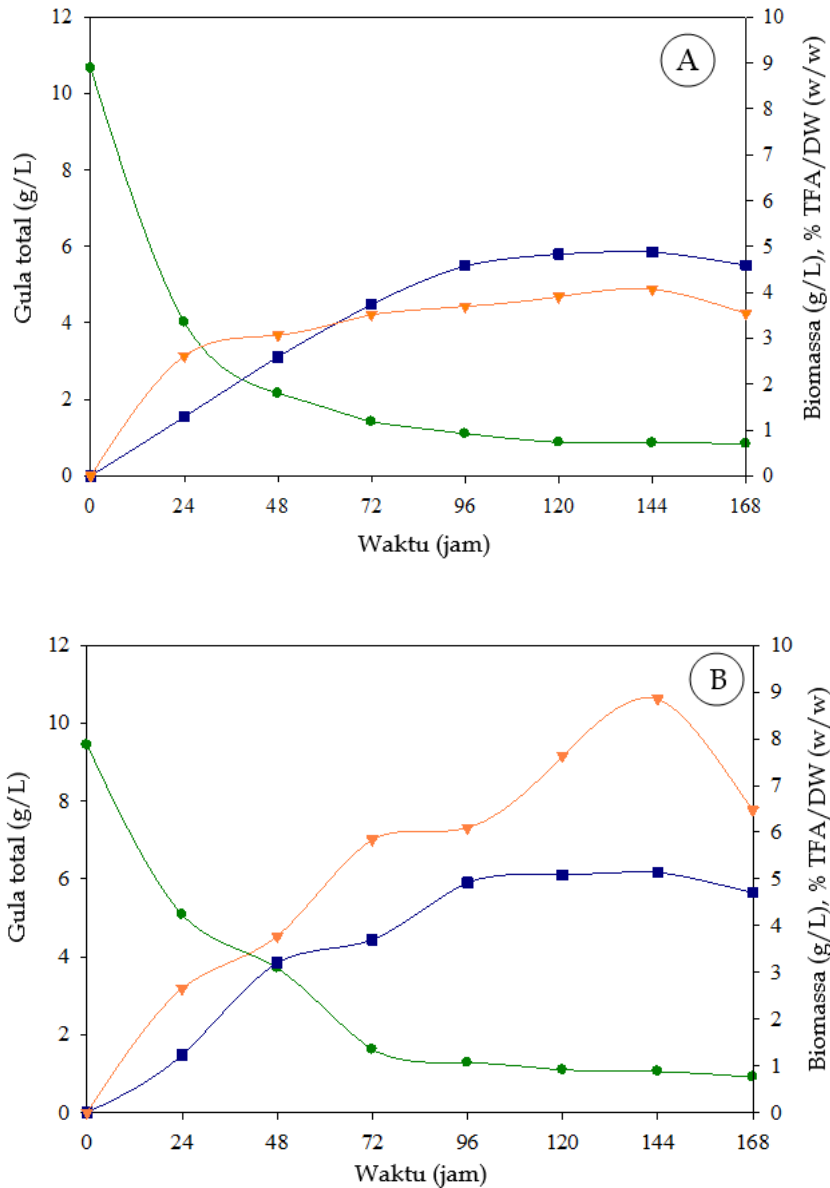
konsumsi gula atau sumber karbon. Setelah memasuki fase stasioner pertumbuhan dari *X. dendrorhous* cenderung lebih lambat (Gambar 2 A dan B) karena kandungan gula dalam substrat mulai habis. Total gula pada media YM dan limbah buah nanas dengan cepat dikonsumsi oleh *X. dendrorhous* pada 0 - 48 jam kultivasi, yaitu sebesar 10.66 - 2.16 g/L dan 9.44 - 3.71 g/L. Lambatnya konsumsi gula terjadi pada 48 - 96 jam kultivasi bertepatan dengan lambatnya pertumbuhan dari *X. dendrorhous*. Selanjutnya total gula pada kedua media stabil hingga 144 jam kultivasi. Hasil yang demikian dikarenakan konsentrasi gula sebagai sumber karbon sesuai untuk pertumbuhan *X. dendrorhous*.

Pada Gambar 2 A dan B, juga dapat dilihat bahwa produksi biomassa dalam media YM dan limbah buah nanas memiliki tren yang sama yaitu sekitar 4.88 dan 5.14 g/L pada 144 jam setelah inokulasi. Meskipun media YM sesuai sebagai media untuk kultivasi sebagian besar mikroorganisme, namun produksi biomassa yang tertinggi didapatkan pada saat *X. dendrorhous* dikultivasi pada limbah buah nanas. Hal ini dikarenakan limbah buah nanas tidak hanya mengandung glukosa tetapi juga sukrosa dan fruktosa, yang dapat digunakan sebagai alternatif sumber karbon untuk menstimulasi pertumbuhan dari *X. dendrorhous*. Johnson and Lewis (1979) mengemukakan bahwa *X. dendrorhous* dapat memproduksi enzim invertase, yaitu enzim yang berperan dalam menghidrolisis disakarida menjadi monosakarida, yang mudah dimanfaatkan oleh sel khamir. Total akumulasi lipid yang didapatkan ketika *X. dendrorhous* ditumbuhkan dalam media limbah buah nanas sebesar 8.9% TFA/DW, sedangkan di media YM sebesar 4.1% TFA/DW. Sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya bahwa limbah buah nanas mengandung

Tabel 3 Komposisi Asam Lemak yang dihasilkan oleh *X. dendrorhous* pada saat dikultivasi dalam media YM dan limbah buah nanas yang didapatkan pada 144 jam kultivasi

Jumlah Atom C Jumlah Ikatan Rangkap	% Asam Lemak	
	Yeast Media	Limbah Buah Nanas
C 14:0	7.13	11.67
C 16:0	24.74	39.85
C 16:1	0.15	0.27
C 18:0	3.09	5.81
C 18:1	49.88	16.79
C 18:2	13.30	23.79
C 18:3	1.35	1.05
C 20:0	0.34	0.64





Gambar 2. Kultivasi *X. dendrorhous* dalam media YM (A) dan limbah buah nanas (B) (● total gula, ■ biomassa dan ▼ total lipid (%TFA/DW))

komponen yang sangat penting seperti asam organik, protein, karbon, nitrogen dan asam amino yang cukup untuk meningkatkan produksi lipid dari *X. dendrorhous*.

Tabel 3 menunjukkan komposisi asam lemak yang diproduksi oleh *X. dendrorhous* pada saat ditumbuhkan dalam media YM dan limbah buah nanas. Berdasarkan Tabel 3, asam lemak yang paling banyak diproduksi oleh *X. dendrorhous* saat ditumbuhkan pada media YM adalah asam oleat (49.88%), asam palmitat (24.74%) dan asam linolenat (13.30%), sementara asam lemak palmitat, linolenat dan oleat dengan konsentrasi 39.85;

23.70 dan 16.79% merupakan asam lemak yang dominan pada saat *X. dendrorhous* dikultivasi dalam limbah buah nanas. Hasil yang demikian sesuai dengan penelitian Johnson *et al.* (1979) dan Libkind *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa palmitat, oleat dan linolenat merupakan asam lemak yang dominan pada khamir *X. dendrorhous*.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa limbah buah nanas juga dapat digunakan sebagai substrat untuk fermentasi dan produk non fermentasi (Hun and Mat, 1997; Femi-Ola *et al.*, 2009; Rosma and Cheong, 2007). Hasil penelitian Abdullah

and Mat (2008) menyatakan bahwa beberapa trace element terdapat dalam limbah buah nanas antara lain adalah Fe, Mn, Zn dan Mg dengan konsentrasi 3.30; 3.60; 5.80 dan 47.70 mg/L. Lebih lanjut Laoteng and Certik (2010) menyatakan bahwa beberapa ion logam mampu menstimulasi akumulasi lipid pada beberapa mikroorganisme. Pengaruh dari trace element terhadap produksi lipid dan gamma linoleic acid (GLA) telah diteliti oleh Muhid *et al.* (2008) yang menemukan bahwa suplementasi Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup> dalam medium pertumbuhan menunjukkan pengaruh yang signifikan pada akumulasi lipid dari *Cunninghamella* sp.2A1 dan menghasilkan peningkatan kadar lemak masing-masing sebesar 64, 43, dan 33%. Ion logam merupakan molekul yang berfungsi sebagai kofaktor dari beberapa enzim seperti enzim malat, ATP Citrate Lyase (ACL) dan Fatty Acid Synthase (FAS). Enzim malat memiliki peranan penting dalam menyediakan NADPH untuk aktivitas FAS, sedangkan ACL menyediakan asetil-KoA yang merupakan prekursor untuk biosintesis lipid (Flores-Cotera *et al.*, 2001).

#### SIMPULAN

Limbah buah nanas mengandung beberapa komponen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme, antara lain adalah glukosa, sukrosa dan fruktosa sebagai sumber karbon, asam amino, protein sebagai sumber nitrogen dan beberapa asam organik, sehingga limbah buah nanas dapat dimanfaatkan sebagai media yang murah untuk kultivasi mikroorganisme. Berdasarkan hasil penelitian maka perlu dilakukan optimasi media pertumbuhan *X. dendrorhous* dengan tujuan untuk meningkatkan produksi lipid.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada *Animal Cell Culture Laboratory, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand* atas dukungan dalam penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

Abdullah and Mat, H. 2008. Characterization of Solid and Liquid Pineapple Waste. *Reaktor*, 12(1): 48-52

- Association of Official Analytical Chemistry. 1990. *Official Methods of Analysis*, 15<sup>th</sup> ed, Arlington. VA
- Carter, MR. 1993. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publisher. London
- Certik, M and Shimizu, S. 1999, Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87(1): 1-14
- Elkins, ER, Lyon, R, Huang, CJ, and Matthys, A. 1997. Characterization of Commercially Produced Pineapple Juice Concentrate. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10: 285 - 298
- Femi-Ola, TO, Oluyeye, JO, and Gbadebo, AO. 2009. Citric Acid Production from Pineapple Waste. *Continental Journal of Microbiology*. 3: 1-5
- Flores-Cotera, LB, Martin, R, and Sanchez, S. 2001. Citrate, a Possible Precursor of Astaxanthin in *Phaffia Rhodozyma*: Influence of Varying Levels of Amonium, Phosphate and Citrate in a Chemically Defined Medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 341-347
- Frengova, GI, and Beshkova, DM. 2009. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of Biotechnological Importance. *Microbiol Biotechnol*. 36: 163-180
- Hun, LT, and Mat, MB. 1997. The Potential of Citric Acid Production Using Pineapple Waste. Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources. Universiti Teknologi Malaysia, Johor, Malaysia.
- Johnson, EA, and Lewis, MJ, 1979, Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*, *Journal of General Microbiology*, 115: 173 - 183
- Johnson, EA, Villa, TG, and Lewis, MJ. 1979. *Phaffia rhodozyma* as an Astaxanthin Source in Salmonid Diets. *Aquaculture*. 20(2): 123-134.
- Kongtragool, J. 2006. Optimization of Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma*. Master of Science Thesis, Biotechnology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi.
- Laoteng, K, and Certik, M. 2010. Biotechnological Production and Application of High-Value Microbial Oils. In *Industrial Fermentation Food*

- Processes*. Krause, J, and Fleischer O. Nova Science Publishers Inc. pp. 187-215
- Lapage, G, and Roy, CC. 1986. Direct Transesterification of All Classes of Lipids in a One-Step Reaction. *Journal of Lipid Research*, 27: 114-120
- Libkind, D, Ruffini, A, Van Broock, M, Alves, L, and Sampaio, JP. 2007. Biogeography, Host Specificity, and Molecular Phylogeny of the Basidiomycetous Yeast *Phaffia Rhodozyma* and Its Sexual Form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 1120-1125
- Martin, JF, Gudina, E, and Barredo, JL. 2008. Conversion of  $\beta$ -Carotene into Astaxanthin: Two Separate Enzymes or a Bifunctional Hydroxylase-Ketolase Protein. *Microbial Cell Factories*. 7(3): 2-10
- Muhid, F, Wan Nawi, NN, Abdul Kader, AJ, Wan Yusoff, WM, and Hamid, AA. 2008. Effects of Metal Ion Concentrations on Lipid and Gamma Linoleic Acid Production by *Chunninghamella sp.* 2A1. *Journal of Biological Sciences*, 8(3): 62-67
- Rosma, A and Cheong, MW. 2007. Effects of Nitrogen Supplementation on Yeast (*Candida Utilis*) Biomass Production by using Pineapple (*Ananas Comosus*) Waste Extracted Medium. *Malaysian Journal of Microbiology*. 3(1): 19-26
- So, S, Kim, YK, and Park, DK, 1997, Make-Up Cosmetic Compositions Containing Powdered *Phaffia* Yeast, United States Patent No. 5674506.