

Biokonversi Selobiosa Langsung menjadi Etanol Menggunakan Ko-Imobilisasi Sel *Lipomyces starkeyi* dan *Saccharomyces cerevisiae* secara Fed-Batch

Direct Bioconversion of Cellobiose into Ethanol Using Co-Immobilized Cells of Lipomyces starkeyi and Saccharomyces cerevisiae by Fed-batch System

KOESNANDAR

Balai Pengkajian Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Gedung 630, Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang 15314
Tel. +62-21-7563120, Fax. +62-21-7560208, E-mail: koesnandar_bio@hotmail.com

Cellobiose as intermediate and glucose as end product of cellulose hydrolysis, respectively are known as inhibitor to the enzyme reaction; therefore continuous removal of these products by direct conversion to ethanol, is though advantages. These paper reported development of a co-immobilization cell system in calcium alginate between *Lipomyces starkeyi* as source of periplasmic β -glucosidase and *Saccharomyces cerevisiae* to convert cellobiose directly into ethanol at high efficiency in repeated fed-batch reactor. The compensate temperature and pH of the co-immobilized cell for the conversion of cellobiose were found to be 30°C and 4.4; respectively. In the repeated batch, 50 g/l cellobiose has been metabolized into ethanol in 15 hour; and the co-immobilized cells preparation showed an operational stability of more than 24 of repeated batches for 400 hour. The ethanol yield based on substrate were 0.4-0.46 g ethanol/g cellobiose (80-86% yield). In the repeated fed-batch, 6-7% of ethanol was produced utilizing 15% cellobiose in 50-75 hour. The complete conversion (0.51 g ethanol/g cellobiose) was obtained when the reaction was prolonged into 96-120 hour.

Key words: cellobiose conversion, ethanol, fed-batch, *Lipomyces starkeyi*, *Saccharomyces cerevisiae*

Selulosa yang tersedia berlimpah sangat potensial dipakai sebagai bahan baku untuk produksi etanol. Proses hidrolisis enzimatis secara bertahap dari selulosa menjadi glukosa dipengaruhi faktor penghambat yang sangat menentukan di dalam biokonversi selulosa menjadi etanol. Faktor penyebab utamanya ialah adanya penghambatan produk (terutama selobiosa dan glukosa) terhadap semua tahapan hidrolisis karena rendahnya aktivitas enzim β -glukosidase (EC.3.2.1.21) dalam kompleks enzim selulase (Gambar 1), di samping kompleksnya struktur molekul selulosa itu sendiri.

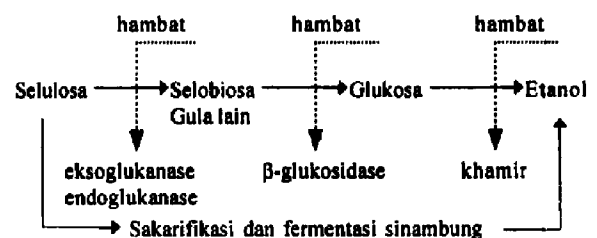
Hidrolisis dan fermentasi dapat dilangsungkan secara simultan. Selama hidrolisis glukosa dapat langsung dikonversi menjadi etanol sehingga mengurangi akumulasi selobiosa dan glukosa dan akibatnya mempercepat hidrolisis selulosa menjadi glukosa.

Sakarifikasi dan fermentasi sinambung (SFS) dapat memperbaiki kinetika fermentasi dan biaya produksi (Wright *et al.* 1988) serta meningkatkan efisiensi konversi selulosa menjadi etanol 25% lebih baik dibandingkan apabila sakarifikasi dan fermentasi dilangsungkan pada reaktor yang terpisah (Spangler & Emert 1986). Hal ini karena SFS dapat menekan penghambatan terhadap selulase dan β -glukosidase akibat akumulasi selobiosa dan glukosa hasil hidrolisis, mengurangi

risiko kontaminasi karena terbentuknya etanol, dan berkurangnya modal untuk peralatan yang digunakan (Philippidis *et al.* 1992).

Sedangkan untuk menghilangkan sama sekali akumulasi selobiosa diperlukan aktivitas β -glukosidase yang tinggi. Saika (1987) menemukan β -glukosidase dari *Lipomyces starkeyi* dengan aktivitas tinggi serta mempunyai kisaran stabilitas pH dan suhu yang luas. Enzim tersebut terikat sel sehingga memungkinkan untuk menggunakan teknik imobilisasi sel.

Serangkaian penelitian untuk mengonversi secara langsung selobiosa menjadi etanol telah dilakukan menggunakan *L. starkeyi* dan *Saccharomyces cerevisiae* serta memberikan hasil yang efisien (Koesnandar 1995).



Gambar 1. Tahapan hidrolisis selulosa oleh enzim dan sistem sakarifikasi dan fermentasi sinambung selulosa menjadi etanol.

Penelitian ini melaporkan penggunaan ko-imobilisasi sel *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* untuk fermentasi secara langsung selobiosa menjadi etanol dalam reaktor *fed-batch*.

BAHAN DAN METODE

Mikrob. *Lipomyces starkeyi* HUT 7263 dan *Saccharomyces cerevisiae* Hansen HUT 7099 yang mempunyai aktivitas intrasel digunakan sebagai sumber β -glukosidase.

Media dan Kondisi Pertumbuhan. Komposisi media yang digunakan untuk *S. cerevisiae*: 20 g ekstrak malt, 1 g polipepton, 15-17.5 g agar-agar, 1 l akuades pH 6.0. Media untuk prekult: 10 g glukosa, 15 g pepton, 3 g ekstrak khamir, 3 g ekstrak malt, 1 l akuades. Media *L. starkeyi*: 30 g ekstrak malt, 15 g agar-agar, 1 l akuades, pH 5.0. Media untuk produksi: 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 g KH_2PO_4 , 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g ekstrak khamir, 2.5 g selobiosa, 7.5 g glukosa, 1 l akuades. Kedua mikrob ditumbuhkan pada suhu 28°C dalam *rotary shaker* (235 rpm) selama tiga hari pada berbagai volume yaitu 10 ml (tabung reaksi), 100 ml (500 ml tabung Sakaguchi), dan 1000 ml (5000 ml botol erlenmeyer). Penyesuaian pH media dilakukan sebelum sterilisasi (autoklaf, 1 kg/cm², 15 menit).

Imobilisasi Sel. Imobilisasi sel ganda antara *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* dilakukan pada kalsium alginat secara steril dengan mencampurkan suspensi sel *L. starkeyi* dengan kultur *S. cerevisiae* berumur 18 jam, dan kemudian dicampur dengan 50 ml larutan sodium alginat. Prosedur penyiapan imobilan dan ko-imobilan mengikuti Koesnandar (1995). Butiran sel terimobilisasi diaktifkan dengan menginkubasikannya pada media tumbuh mengandung glukosa pada suhu 28°C dan 235 rpm selama 60 jam. Setelah inkubasi butiran sel terimobilisasi dicuci dengan air steril dan disimpan pada suhu 4°C.

Kondisi Konversi. Konversi selobiosa dilakukan menggunakan 5 ml media mengandung 50 g/l selobiosa dan 5 ml butiran imobilisasi sel yang diinkubasikan pada 30°C, kondisi anaerob. Pada percobaan *batch* ulangan (*repeated batch*) dan *batch* ulangan dengan penambahan substrat (*repeated fed-batch*) digunakan volume masing-masing 10 ml media dan 10 ml imobilan. (Koesnandar 1995).

Analisis. Aktivitas fermentasi imobilan diukur dengan mereaksikan 4 ml media yang mengandung 50 g/l selobiosa atau 100 g/l glukosa dengan 1 ml butiran sel terimobilisasi pada 30°C selama empat jam pada kondisi kocok (110 osc/min). Satu unit aktivitas fermentasi didefinisikan sebagai jumlah mikrogram etanol yang diproduksi setiap menit per ml butiran sel terimobilisasi pada kondisi di atas (Koesnandar 1995).

Kadar gula total diukur dengan metode Dobois pada panjang gelombang 490 nm menggunakan glukosa sebagai standar (Koesnandar 1995).

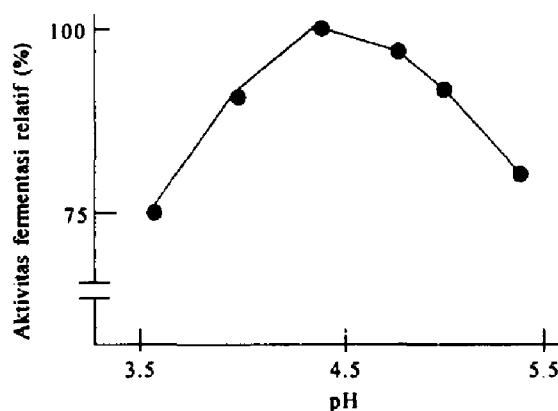
Kadar etanol diukur dengan gas kromatografi (Shimadzu GC-8) menggunakan kolom gelas berisi Palopack. Sebelum diinjeksikan pada GC, semua contoh disentrifugasi pada 12 000 rpm selama lima menit (Kubota KM 15 000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pH dan Suhu. Kemasaman optimum fermentasi etanol menggunakan *S. cerevisiae* ialah 5.0 (Wada *et al.* 1980). Enzim β -glukosidase dari *L. starkeyi* dalam penelitian ini mempunyai pH optimum 3.5 dan stabil digunakan pada kisaran pH 2.0-7.0 (Saika 1987). Oleh karena itu, pH optimum perlu ditentukan sehingga baik hidrolisis selobiosa maupun fermentasinya menjadi etanol dapat berlangsung dengan efisiensi. Efisiensi konversi selobiosa menjadi etanol secara langsung diuji pada pH antara 3.5 sampai dengan 5.0 menggunakan imobilisasi sel ganda dan menunjukkan konversi optimum tercapai pada pH 4.4 (Gambar 2). Pada pH optimum masing-masing sel (pH 3.5 dan pH 5.0), aktivitas fermentasinya hanya 75% dibandingkan dengan aktivitasnya pada pH 4.4. Beberapa peneliti menggunakan pH yang berbeda bergantung pada asal enzimnya. Kierstan *et al.* (1982) menggunakan pH 5.0 untuk β -glukosidase yang berasal dari *Talaromyces emersonii*, sedangkan Hartmeir (1981) dan Hahn-Hagerdal (1984) masing-masing menggunakan pH 4.0 dan 4.9 untuk enzim yang berasal dari *Aspergillus niger*.

Efisiensi konversi selobiosa menjadi etanol menggunakan ko-imobilisasi sel selanjutnya diuji pada suhu 30°C dan 35°C dengan pH optimum 4.4. Apabila konversi dapat berlangsung pada suhu lebih tinggi dari 30°C diharapkan hidrolisis dapat berlangsung lebih cepat sehingga pada gilirannya dapat meningkatkan efisiensi konversi secara menyeluruh. Suhu optimum β -glukosidase dari *L. starkeyi* yaitu 70°C (Saika 1987), sedangkan pada suhu 30°C aktivitasnya hanya 25%. Percobaan pengaruh suhu dilakukan pada kondisi anaerob dengan gas N₂ sebagai *head-space*. Hal ini perlu dilakukan karena pada kondisi aerob, *L. starkeyi* memetabolisme glukosa hasil hidrolisis dari selobiosa (hasil tidak ditunjukkan).

Meskipun kecepatan konversi lebih tinggi pada suhu 35°C, tetapi konsentrasi etanol akhir yang diperoleh hanya 80%, lebih rendah dibandingkan dengan konversi pada suhu 30°C (Gambar 3). Baik glukosa maupun selobiosa tidak terdeteksi



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas fermentasi selobiosa menjadi etanol menggunakan ko-imobilisasi sel *Lipomyces starkeyi* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

selama berlangsungnya konversi sehingga informasi yang jelas mengapa hasilnya rendah pada suhu 35°C tidak diketahui. Rendahnya konversi pada suhu yang lebih tinggi diduga karena keterbatasan kemampuan daya hidup khamir sehingga terjadi pembentukan metabolit lain oleh *S. cerevisiae* pada suhu yang tidak optimum. Dengan demikian, galur khamir yang mempunyai kemampuan hidup dan memproduksi etanol pada suhu tinggi perlu ditemukan sehingga hidrolisis selobiosa dan konversinya menjadi etanol dapat ditingkatkan dan pada gilirannya dapat meningkatkan kecepatan konversi keseluruhan dari selobiosa menjadi etanol. Pada penelitian selanjutnya digunakan pH 4.4 dan suhu optimum 30°C untuk kedua katalis.

Produksi Etanol dengan Sistem Batch Berulang. Hasil percobaan menggunakan reaktor dengan sistem *batch* berulang pada kondisi pH dan suhu optimum pada Gambar 4. Kadar gula total yang terdeteksi (sama dengan jumlah selobiosa karena glukosa tidak pernah terdeteksi selama berlangsungnya fermentasi) terus menurun secara proporsional dengan meningkatnya produksi etanol. Setelah 20 jam inkubasi gel alginat disaring dan dicuci untuk menghilangkan substrat dan produk yang mungkin terbawa, kemudian media segar yang mengandung selobiosa ditambahkan kembali untuk inkubasi selanjutnya. Setelah *batch* yang kedua berakhir, media baru yang mengandung selobiosa ditambahkan kembali dan seterusnya.

Hasil pengulangan *batch* tersebut menunjukkan bahwa imobilisasi kedua sel dapat digunakan dengan stabil untuk mengonversi selobiosa secara langsung menjadi etanol untuk lebih dari 24 kali pengulangan *batch* selama lebih dari 480 jam dengan hasil berkisar 0.4-0.48 g etanol/g selobiosa. Hasil ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya, baik dibandingkan dengan khamir (Wayman *et al.* 1987) atau bakteri (Asther & Khan 1984) yang langsung memfermentasi selobiosa menjadi etanol maupun dibandingkan dengan imobilisasi sel *S. cerevisiae* dengan β -glukosidase

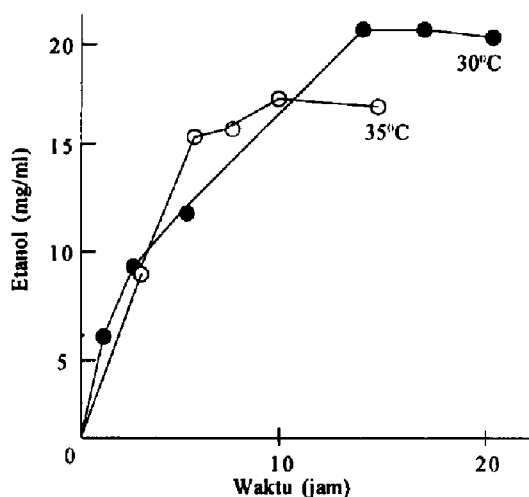
komersial (Hahn-Hagerdal 1984).

Berdasarkan hasil perhitungan terhadap substrat maka imobilisasi *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* dapat mengonversi 80-96% substrat, sedangkan apabila digunakan imobilisasi sel secara terpisah maka konversinya hanya 40%. Dengan demikian imobilisasi sel ganda lebih menguntungkan dibandingkan dengan imobilisasi terpisah.

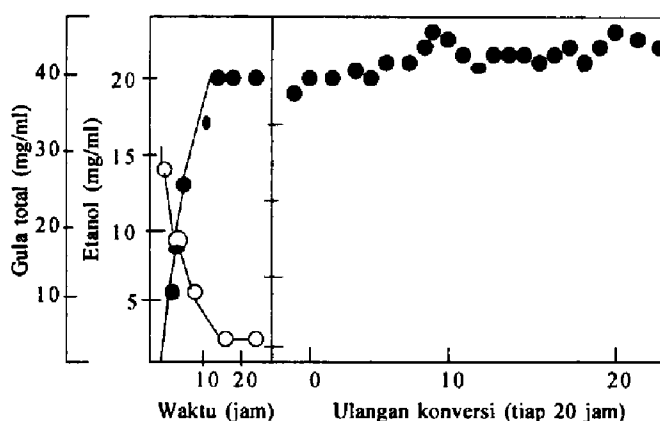
Meskipun dalam percobaan ini terlihat bahwa aktivitas katalitiknya lebih rendah dibandingkan dengan katalisis oleh enzim bebas (Hahn-Hagerdal 1984), imobilisasi sel ganda menguntungkan karena selain dapat digunakan secara terus menerus juga lebih stabil karena enzim yang digunakan terikat dalam sel hidup.

Konversi Selobiosa Menggunakan Sistem Batch Berulang dengan Penambahan Substrat. Imobilisasi sel ganda antara *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* memberikan stabilitas yang sangat baik dalam mengkonversi selobiosa menjadi etanol, tetapi konsentrasi etanol yang diperoleh masih rendah dibandingkan dengan produksi etanol skala industri dengan substrat glukosa menggunakan *S. cerevisiae*, yang merupakan fermentasi satu tahap pada kondisi optimum. Sebaliknya, proses fermentasi dalam penelitian ini menggunakan selobiosa yang tidak dapat dikonsumsi langsung oleh *S. cerevisiae* dan menggunakan dua galur yang terimobilisasi dan dioperasikan pada pH dan suhu kombinasi antara kedua katalis.

Untuk memperoleh konsentrasi etanol yang tinggi maka konversi selobiosa dilakukan dengan sistem *batch* berulang dengan penambahan selobiosa secara bertahap. Hal ini dilakukan karena konversi selobiosa pada kadar yang tinggi memberikan efisiensi yang rendah (data tidak diperlihatkan). Konversi dimulai pada konsentrasi selobiosa 50 g/l pada kondisi anaerob menggunakan 10 ml imobilan kedua sel pada tabung serum. Apabila kadar selobiosa dalam kultur hampir habis (ditunjukkan dengan analisis kadar etanol dan perhitungan konversi selobiosa) maka sejumlah selobiosa ditambahkan dalam kultur sehingga konsentrasinya dalam



Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap konversi langsung selobiosa menjadi etanol menggunakan ko-imobilisasi sel *Lipomices starkeyi* dan *Saccharomyces cerevisiae*.



Gambar 4. Konversi langsung selobiosa menjadi etanol dengan sistem *batch* berulang menggunakan ko-imobilisasi sel *Lipomices starkeyi* dan *Saccharomyces cerevisiae* pada pH dan suhu optimum (4.4, 30°C). Konversi menggunakan selobiosa (50 g/l) sebagai substrat dan konversi diulang menggunakan ko-imobilan yang sama. O: gula total, ●: etanol.

tabung kembali menjadi 50 g/l. Penambahan selobiosa dilakukan lagi sehingga seluruh selobiosa yang dikonversi dalam satu *batch* menjadi 150 g/l. Imobilan kemudian dicuci secara aseptik dan *batch* berikutnya diulang lagi dengan prosedur di atas.

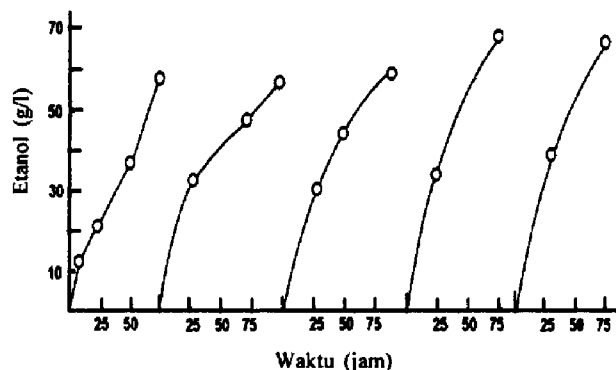
Etanol yang diperoleh ialah 60-70 g/l selama 50-75 jam inkubasi dengan hasil konversi antara 0.40-0.47 g etanol/g selobiosa (Gambar 5). Konversi sempurna (100%, 0.51 g etanol/g selobiosa) dapat dicapai melalui perpanjangan inkubasi menjadi 96-120 jam. Wood dan Ingram (1992) berhasil menyisipkan gen produsen etanol dari *Zymomonas mobilis* ke dalam *Klebsiella oxytoca* untuk mengkonversi selulosa dan selobiosa langsung menjadi etanol. Dengan menggunakan khamir rekombinan tersebut, 10% substrat selobiosa maksimum dikonversi menjadi 45 g/l etanol, lebih rendah dibandingkan dengan sistem imobilisasi sel ganda *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1).

Hasil di atas menunjukkan bahwa imobilisasi sel ganda antara *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* sangat potensial untuk memproduksi etanol dari selobiosa secara langsung pada konsentrasi yang tinggi.

Kemampuan imobilisasi sel ganda *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* untuk mengkonversi selobiosa secara langsung ini dapat diterapkan pada konversi selulosa menjadi etanol (bersama ekso β -1,4-glukanase dan endo β -1,4-glukanase) sehingga diharapkan dapat mengatasi masalah rendahnya efisiensi konversi karena faktor hambatan pada proses hidrolisis bertingkat pada selulosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Asther M, Khan AW. 1984. Conversion of cellobiose and xylose to ethanol by immobilized growing cells of *Clostridium saccharolyticum* on charcoal support. *Biotechnol Lett* 6:809-812.
- Brown S, Oliver WSG, Harrison DEF, Righelato RC. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 11:151-155.
- Hahn-Hagerdal B. 1984. An enzyme coimmobilized with a microorganism: the conversion of cellobiose to ethanol using β -glucosidase and *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gels. *Biotech Bioeng* 26:771-774.
- Hartmeier W. 1981. Basic trials on the conversion of cellulosic material to ethanol using yeast coimmobilized with cellulolytic enzymes. Di dalam: Moo-Young M (ed). *Advances in Biotechnology*. Vol II. Pergamon Pr. hlm. 377-382.
- Kierstan M, McHale A, Coughlan MP. 1982. The production of ethanol from cellobiose using immobilized β -glucosidase coentrapped with yeast in alginate gels. *Biotech Bioeng* 24:1461-1463.
- Kilian SG, Prior BA, Potgieter HJ, du Preez JC. 1983. Utilization of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17:281-286.
- Koesnandar. 1995. Pengaruh sistem imobilisasi sel ganda *L. starkeyi* dan *S. cerevisiae* untuk konversi langsung selobiosa menjadi etanol.



Gambar 5. Konversi langsung selobiosa menjadi etanol dengan sistem *fed-batch* berulang menggunakan ko-imobilisasi sel *Lipomyces starkeyi* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Konversi dilakukan pada pH 4 dan suhu optimum (4.4, 30°C) menggunakan substrat selobiosa awal (50 g/l) dengan 2 kali penambahan masing-masing 50 g/l.

Tabel 1. Sakarifikasi dan fermentasi simultan selobiosa menjadi etanol menggunakan berbagai katalis.

Katalis yang digunakan	Produksi etanol final (g/l)	Etanol (g EtOH/g substrat)	Suber Acuan
Rekombinan <i>Klebsiella oxytoca</i>	45.20	0.49	Wood & Ingram (1992)
Imobilisasi <i>Clostridium saccharolyticum</i>	7.00	-	Asther & Khan (1984)
<i>Candida wickerhamii</i>	8.71	0.41	Kilian <i>et al.</i> (1983)
Imobilisasi sel ganda <i>Lipomyces starkeyi</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70.00	0.47	Penelitian ini

- Di dalam: Jamaran I *et al.* (ed). *Prosiding Seminar Bioteknologi Biomasa BPPT I*. Bandar Lampung, 27 Apr 1995. hlm 65-72.
- Philippidis GP, Splinder DD, Wyman CW. 1992. Mathematical modeling of cellulose conversion to ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Appl Biochem Biotechnol* 34/35:543-556.
- Saika T. 1987. Studies on the properties and application of β -glucosidase from *L. starkeyi* HUT 7263 [dalam bahasa Jepang]. [Tesis]. Hiroshima: Hiroshima University.
- Spangler DJ, Emert GH. 1986. Simultaneous saccharification/fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Biotech Bioeng* 28:115-118.
- Wada M, Kato J, Chibata I. 1980. Continuous production of ethanol using immobilized growing yeast cells. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 10:275-287.
- Wood BE, Ingram LO. 1992. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol* 58:2103-2110.
- Wright JD, Wyman CE, Grohmann K. 1988. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose. *Appl Biochem Biotechnol* 18:75-90.