

## Utilization of Animal Fat Glycerol for Bioethanol Production in Recombinant *Escherichia coli*

### Pemanfaatan Gliserol Lemak Hewani untuk Produksi Bioetanol pada *Escherichia coli* Rekombinan

Wahyu Suradi Pranata <sup>a\*</sup>

<sup>a\*</sup> Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Persatuan Islam Bandung, Bandung

email: [wahyusuradip@unipi.ac.id](mailto:wahyusuradip@unipi.ac.id)

#### INFO ARTIKEL

**Sejarah artikel:**

Diterima 24 Februari 2023  
Direvisi 30 Maret 2023  
Diterima 1 April 2023  
Tersedia online 18 April 2023

**Kata kunci:**

Aerobik  
*Escherichia coli*  
Glukosa  
Gliserol

**Keywords :**

Aerobic  
*Escherichia coli*  
Glukosa  
Gliserol

**APA style in citing this article:**

Wahyu, S.P. (2023).  
"Utilization of Animal Fat Glycerol for Bioethanol Production in Recombinant *Escherichia coli*,"  
International Journal of Animal Science Universitas Islam Lamongan, vol. 5, no. 3, pp. 243-248, 2023.

#### ABSTRAK

Mengoptimalkan pemanfaatan gliserol dari transesterifikasi lemak hewani sebagai substrat untuk produksi etanol dalam etanologik rekombinan *E. coli* (PDC dan ADH) dalam kondisi aerobik telah diselidiki. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *E. coli* BW25113 yang membandingkan karakteristik pertumbuhan pada substrat gliserol dan glukosa. *E. coli* dapat tumbuh dengan baik pada kedua substrat tersebut dan gliserolnya lebih cepat dikonsumsi daripada glukosa. Pada glukosa, *E. coli* terjadi overflow metabolisme yang menandakan tingginya jumlah asetat, sedangkan pada gliserol akumulasi asetat dapat dikurangi. Sehingga karakteristik pertumbuhan gliserol lebih efektif. Pada *E. coli*  $\Delta$ pta/pHfdh/pTadhB-pdc produksi etanol dengan substrat gliserol adalah 2,18 gL<sup>-1</sup> Angka tersebut dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan substrat glukosa dan gliserol sebagai substrat memiliki kondisi optimal dalam menyediakan NADH untuk menghasilkan etanol.

#### ABSTRACT

Optimizing the utilization of glycerol from animal fat transesterification as a substrate for ethanol production in *E. coli* recombinant ethanogenic (PDC and ADH) under an aerobic condition was investigated. This research was conducted by using *E. coli* BW25113 which compares the growth characteristics on glycerol and glucose as substrates. *E. coli* can grow well on both substrates and it glycerol consumed faster than glucose. On glucose, *E. coli* occurs overflow metabolism that indicated high amount of acetate, meanwhile on glycerol the acetate accumulation could be reduced. So that, the growth characteristics of glycerol was more effective. In *E. coli*  $\Delta$ pta/pHfdh/pTadhB-pdc ethanol production with glycerol substrates was 2.18 gL<sup>-1</sup> The number twice higher than with glucose substrate and glycerol as substrate had optimal condition in providing NADH in order to produce ethanol.

## 1. Pendahuluan

Energi merupakan bagian penting dalam kehidupan karena sebagian besar aktivitas manusia membutuhkan energi. Mayoritas energi yang dimanfaatkan berasal dari fosil khususnya minyak bumi yang tidak dapat diperbaharui dan akan habis. Produksi etanol sebagai bahan bakar terbarukan yang ramah lingkungan merupakan salah satu solusi yang terus dikembangkan. Generasi awal produksi etanol melalui fermentasi khamir (*yeast*) dengan substrat yang berasal dari pati produk pangan, mulai ditinggalkan karena bersaing dengan pangan dan berpengaruh terhadap ekonomi, selanjutnya menuju generasi kedua yang memanfaatkan substrat dari biomassa melalui fermentasi *yeast* atau bakteri yang lebih maju secara teknologi (IEA 2008). Fermentasi *yeast* seperti *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kelemahan waktu pertumbuhan yang lambat sehingga berpengaruh pada hasil produk yang diharapkan selain itu fermentasi bakteri seperti *Zymomonas mobilis* memiliki spektrum pemanfaatan substrat yang terbatas pada gula, sedangkan *Escherichia coli* sudah banyak digunakan dalam rekayasa mikroba untuk produksi etanol karena metabolisme *E. coli* sudah banyak diketahui, memiliki kemampuan pertumbuhan yang cepat, dan memiliki spektrum pemanfaatan substrat yang luas seperti glukosa dan gliserol. Studi sebelumnya menyatakan bahwa peran gula sebagai substrat dalam fermentasi etanol pada *E. coli* dapat digantikan oleh gliserol (Ito *et al.* 2005).

Gliserol lemak hewani merupakan hasil samping transesterifikasi lemak hewani seperti lemak sapi sebagai limbah dari rumah pemotongan hewan. Transesterifikasi merupakan proses mereaksikan trigliserida yang terdapat pada minyak hewani atau nabati dengan metanol dan tambahan katalis basa, menghasilkan biodiesel dan gliserol sebagai produk samping (Joelianingsing *et al.* 2006). Peningkatan produksi biodiesel dunia berbanding lurus dengan produksi gliserol sebagai hasil sampingnya. Gliserol disebut juga gliserin merupakan senyawa alkohol trihidrat dengan rumus bangun  $C_3H_8O_3$ . Gliserol merupakan sumber karbon yang murah dan berlimpah, selain itu gliserol lebih mudah direduksi dalam metabolisme dibandingkan dengan gula sehingga menghasilkan senyawa hasil reduksi seperti etanol, suksinat, xylitol, propionat, hidrogen, dan seterusnya dengan rendemen yang lebih tinggi dari penggunaan gula (Dharmadi *et al.* 2006). Setiap 3 mol biodiesel yang dihasilkan, menghasilkan 1 mol gliserol (sekitar 5-10% setara berat biodiesel), untuk mengoptimalkan potensi ini perlu usaha untuk megkonversi gliserol menjadi bahan kimia yang bermanfaat seperti etanol (Yazdani dan Gonzales 2007).

Penelitian-penelitian yang lain melakukan fermentasi pada kondisi anaerob, sehingga pertumbuhan sel berlangsung lambat dan meningkatkan aktivitas laktat dehidrogenase (LDH) yang mengakumulasi laktat dengan substrat piruvat. Suryadarma *et al.* (2012) menyatakan bahwa kultivasi *E. coli* pada kondisi anaerob menyebabkan pertumbuhan sel rendah sehingga berakibat pada turunnya hasil produk yang diharapkan. Kondisi anaerobik menghasilkan produk samping yang tinggi mengakibatkan produksi etanol pada *E. coli* belum efektif, sehingga perlu dilakukan rekayasa genetik (Ingram *et al.* 1987) dan mengubah kondisi kultivasi produksi etanol menjadi aerobik. Penginsersian gen etanologik yaitu gen piruvat dekarboksilase (*pdh*) dan asetaldehid dehidrogenase (*adhB*) dari *Z. Mobilis* ke *E. coli* melalui rekayasa genetik dapat meningkatkan produksi etanol (Ingram *et al.* 1987). Pada studi lain menyebutkan proses kultivasi pada kondisi aerobik menghasilkan biomassa dalam jumlah besar sekitar 66% dan sisanya berupa air, gas, asam organik (Sutapa 1999). Disamping itu, dalam kondisi aerobik enzim pembentuk laktat (Laktat dehidrogenase; LDH) akan mengalami penurunan aktivitas (Ojima *et al.* 2012) sehingga akumulasi laktat dapat ditekan.

Tersedianya oksigen sebagai penerima elektron terakhir akan mengkonsumsi NADH (Causey *et al.* 2004) sehingga menyebabkan berkurangnya NADH untuk produksi etanol. Dilihat dari jalur metabolismenya pemanfaatan gliserol sebagai substrat mampu meningkatkan dua kali NADH dibandingkan glukosa seperti yang dilaporkan oleh Yazdani dan Gonzales (2007). Sehingga gliserol secara substrat dapat menyediakan NADH sebagai kosubstrat untuk pembentukan etanol.

Konversi gliserol menjadi asam suksinat merupakan contoh keseimbangan redoks. Meskipun jalur untuk etanol dan suksinat setara mengenai keseluruhan keseimbangan redoks, kontribusi energi dari jalur etanologik jauh lebih tinggi, setiap 1 ATP diproduksi per molekul gliserol yang diubah menjadi etanol, sementara produksi energi di jalur suksinat terbatas untuk memenuhi generasi *proton motive force* oleh *fumarate reduktase (frd)* (Dharmadi *et al.* 2006). Oleh karena itu, dalam penelitian ini

membandingkan gliserol dengan glukosa sebagai substrat, sehingga diharapkan dapat mengetahui potensi gliserol sebagai substrat untuk selanjutnya diarahkan menuju produksi etanol pada kondisi aerobik.

## 2. Materi dan Metode

Bahan yang digunakan yaitu strain *E. coli* BW25113 dan strain rekombinan *E. coli* yang telah dihilangkan fungsi dari gen *pta* (penghasil asetat), yang berasal dari *National BioResources Project (National Institute of Genetics (NIG), Jepang)*. Strain tersebut ditambahkan gen etanologenis *adhB-pdc* dan gen *fdh* untuk menghasilkan NADH yang berasal dari *Departement Chemical Science and Engineering, Osaka University, Jepang*, dengan nama isolat BW25113  $\Delta pta/pHfdh/pTadhB-pdc$ .

### Prakultivasi dan Kultivasi

Prakultivasi bertujuan menyegarkan kembali sel *E. coli* dalam stok gliserol untuk mencapai pertumbuhan optimum pada saat kultivasi. Sejumlah 50 mL media LB ditambahkan dengan 1% (v/v) isolat BW25113 tanpa antibiotik dan 50 mgL<sup>-1</sup> ampicilin, 34 mgL<sup>-1</sup> kloramfenikol, 15 mgL<sup>-1</sup> kanamisin untuk 1% (v/v) isolat BW25113  $\Delta pta/pHfdh/pTadhB-pdc$ . Media berisi sampel diinkubasi dalam penggoyang berputar (Optic Ivymen System) dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 12 jam pada suhu 37°C. Kemudian dihitung nilai OD<sub>660</sub> dengan rentang nilai 1 – 1.5, lalu sampel dikultivasi.

Kultivasi bertujuan untuk memproduksi metabolit sel dalam kondisi aerobik. Strain *E. coli* dikultivasi berdasarkan prosedur Ojima *et al.* (2012). Media LB kultivasi terdiri atas Inokulum 5% (v/v), 222 mM glukosa atau 220 mM gliserol, 20 gL<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> per liter air dan antibiotik (30 mgL<sup>-1</sup> ampicilin, 34 mgL<sup>-1</sup> kloramfenikol, 15 mgL<sup>-1</sup> kanamisin) serta penambahan 0.5 mM isopropil tiogalaktosida (IPTG) untuk strain etanologenis sebagai penginduksi protein rekombinan. Kemudian media kultivasi diatur pH pada pH 7.0. Penambahan CaCO<sub>3</sub> untuk mempertahankan pH agar tidak mengalami penurunan selama kultivasi. Setelah itu, sampel diinkubasi dalam penggoyang berputar (Optic Ivymen System) dengan kecepatan agitasi 250 rpm selama 72 jam pada suhu 37°C. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0, ke-12, ke-24, ke-48, dan ke-72. Pengulangan dilakukan sebanyak 2-3 kali. Sampel selanjutnya dianalisis.

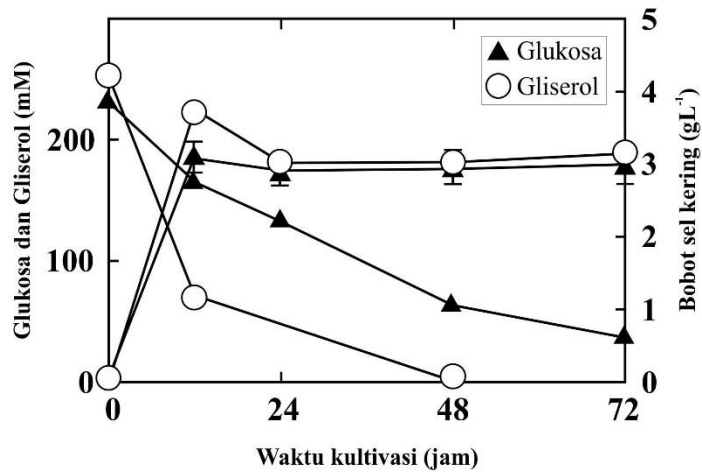
### Pengukuran Bobot Sel Kering, Konsumsi Substrat dan Akumulasi Etanol

Pengukuran bobot sel kering untuk mengetahui pertumbuhan sel. Dilakukan berdasarkan Ojima *et al.* (2012), sampel diukur nilai *Optical density* (OD) pada spektrofotometri panjang gelombang 660 nm. Nilai OD<sub>660</sub> dikalikan dengan 0.36 untuk pengkonversian menjadi nilai bobot sel kering. Sebelum diukur sampel dicampurkan dengan 1 M HCL untuk pendilusian CaCO<sub>3</sub>.

Pengukuran konsumsi glukosa, konsumsi gliserol dan akumulasi etanol dilakukan dengan kit (Roche *Glucose kit*, Roche *Glycerol kit* dan Roche *Ethanol kit*). Sampel hasil kultivasi 72 jam diinaktivasi dengan pemanasan dan penghilangan gas. Setelah itu disentrifugasi (Hettich Zentrifugen) selama 2 menit 9727 g suhu 4°C. Supernatan difilter dengan filter 0.2 µm, dilakukan pengenceran sesuai dengan estimasi glukosa sisa dan akumulasi etanol. Kemudian dilakukan pengukuran berdasarkan prosedur metode enzimatik dari produsen. Data yang didapatkan adalah nilai rata-rata dan standar deviasi dari pengukuran tiga kali pengulangan dengan signifikansi berdasarkan uji-t. Data yang diperoleh adalah nilai rata-rata dan standar deviasi dari dua hingga tiga pengulangan dengan pengukuran signifikansi berdasarkan uji-t.

### 3. Hasil dan Diskusi

#### Karakteristik Pertumbuhan pada Glukosa dan Gliserol sebagai Sumber Karbon dalam Kondisi Aerobik

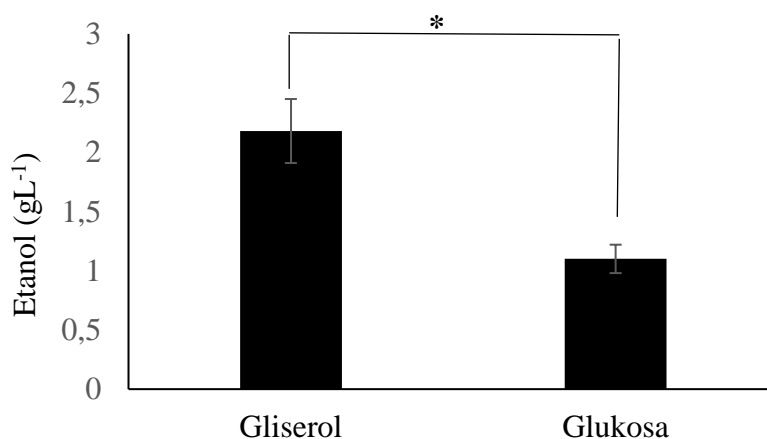


**Gambar 1.** Profil waktu konsumsi substrat dan bobot sel kering *E. coli* BW25113 pada glukosa dan gliserol dikultivasi selama 72 jam

Pada jam ke-0 hingga jam ke-12 *E. coli* berada pada fase lag hingga akhir fase logaritmik, pada jam ke-12 hingga jam ke-72 pertumbuhan sel berada pada fase stasioner, secara umum kondisi pertumbuhan sel pada kedua substrat mirip (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa *E. coli* mampu tumbuh dengan baik pada glukosa maupun gliserol dalam kondisi aerobik. Kondisi tersebut sesuai dengan penelitian Durnin *et al.* (2008), bahwa biomassa yang dihasilkan pada glukosa maupun gliserol tidak berbeda pada kondisi tersedianya oksigen sebagai akseptor elektron terakhir.

Gliserol cepat dikonsumsi pada jam ke-48 sedangkan glukosa lambat dikonsumsi hingga jam ke-72 belum habis (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan gliserol lebih cepat dikonsumsi daripada glukosa pada kondisi aerobik. Hal ini memungkinkan karena rataan tingkat pengurangan per karbon,  $k$  (Nielsen *et al.* 2003) gliserol ( $C_3H_8O_3$ :  $k=4.67$ ) signifikan lebih tinggi dibandingkan glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ :  $k=4$ ). Kondisi ini mengindikasikan bahwa gliserol lebih efektif digunakan sebagai substrat.

#### Produksi Etanol pada *E. coli* Etanologenk



**Gambar 3.** Produksi etanol pada *E. coli* BW25113  $\Delta pta/pHfdh/pTadhB-pdc$  dikultivasi selama 72 jam. Garis vertikal menggambarkan standar deviasi. (\*) menunjukkan signifikansi pada taraf uji 5% (uji t).

Berdasarkan karakteristik pertumbuhan gliserol mampu tumbuh dengan baik, lebih cepat dikonsumsi dan tidak ada akumulasi asam asetat maka hal ini menguntungkan untuk selanjutnya diarahkan pada produksi etanol melalui *E. coli* etanologenis. Pada BW25113  $\Delta pta/pHfdh/pTadhB-pdc$  dengan substrat gliserol *E. coli* menghasilkan akumulasi etanol sebesar  $2.18 \text{ gL}^{-1}$  lebih besar dua kali lipat dari glukosa  $1,1 \text{ gL}^{-1}$  (Gambar 3). Yield etanol mol/mol pada gliserol sebesar 0.16 dimana hasil ini tiga kali lebih tinggi dari hasil pencapaian tertinggi Shah *et al.* (2014) pada kondisi aerobik dan rekayasa genetik. Hasil ini menunjukkan gliserol efektif menyediakan NADH sebagai kosubstrat untuk produksi etanol dan menyeimbangkan rasio NADH/NAD<sup>+</sup> yang diperlukan sel.

#### 4. Kesimpulan

Karakteristik pertumbuhan pada strain *E. coli* BW25113 menunjukkan hasil gliserol lebih baik sebagai substrat dibandingkan glukosa. *E. coli* etanologenis dengan substrat gliserol yang mampu menyediakan NADH sebagai kosubstrat dalam menghasilkan etanol  $2.18 \text{ gL}^{-1}$  dan menyeimbangkan rasio NADH/NAD<sup>+</sup> yang dibutuhkan sel dalam kondisi aerobik. Sehingga gliserol efektif digunakan sebagai substrat untuk produksi etanol.

#### 5. References

- Causey TB, Shanmugam KT, Yomano LP, Ingram LO. 2004. Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:2235–2240.
- Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R. 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 821-829.
- Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, Alvarez PJJ, Zygorakis K, Campbell P, Gonzalez R. 2008. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 103:148–161.
- [IEA] International Energy Agency. 2008. *From 1<sup>st</sup> to 2<sup>nd</sup>-generation Biofuel Technologies. An Overview of Current Industry and RD & D Activities*. Paris Cedex (FR): OECD/IEA.
- Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewell GW, Preston JF. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(10): 2420 – 2425.
- Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. 2005. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *J Biosci Bioeng.* 100(3): 260-265.
- Joelianingsih, Armansyah H.T., Hisrohi N., Yasuyuki S., Kamaruddin A. Perkembangan Proses Pembuatan Biodiesel Sebagai Bahan Bakar Nabati (BBN). *Jurnal Keteknik Pertanian* 20 (2006): hal. 205-216.
- Nielsen J, Villadsen J, Liden G. 2003. *Bioreaction engineering principles*. New York (US): Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Ojima Y, Suryadarma P, Tsuchida K, Taya M. 2012. Accumulation of pyruvate by changing the redox status in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 34:889-893.
- Shah P, Chiu F, Lan JC. 2014. Aerobic utilization of crude glycerol by recombinant *Escherichia coli* for simultaneous production of poly 3-hydroxybutyrate and bioethanol. *J Biosci Bioeng.* 117(3): 343-350.

- Suryadarma P, Ojima Y, Tsuchida K, Taya M. 2012. Design of *Escherichia coli* cell culture for regulating alanine production under aerobic condition. *J Chem Eng Japan of Japan*. 45(8): 604-608.
- Sutapa DAI. 1999. Lumpur Aktif : Alternatif Pengolah Limbah Cair. *J Studi Pem Kem & Ling*. 3:25-38.
- Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA. 2006. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5): 3653–3661.
- Yazdani SS, Gonzalez R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol*. 18:213–219.