

## Kesan Pengudaraan dan Pencairan ke Atas Penghasilan Bioetanol Secara Selanjur dalam Bioreaktor Padat oleh *Saccharomyces cerevisiae*

(Effect of Aeration and Dilution on Continuous Bioethanol Production in a Packed-bed Bioreactor by *Saccharomyces cerevisiae*)

NG KEE WEE, AIDIL ABDUL HAMID, MOHD SAHAID KALIL  
& WAN MOHTAR WAN YUSOFF\*

### ABSTRAK

*Pertumbuhan sel secara selanjur pada keadaan mantap telah diperolehi dalam pengkulturan dengan bioreaktor padat. Produktiviti (0.02 g/L/j) bioetanol yang paling tinggi diperolehi adalah pada pengudaraan 0.003 vvm. Produktiviti bioetanol didapati meningkat dengan peningkatan kadar pencairan. Produktiviti tertinggi sebanyak 0.037 g/L/j direkod semasa kadar pencairan (D) 0.05 per jam. Penghasilan bioetanol secara selanjur telah berjaya diselenggarakan pada keadaan tidak 100% anaerobik. Pengudaraan yang terbaik untuk produktiviti bioetanol dalam keadaan seimbang pertumbuhan sel dan penghasilan bioetanol ialah pada 0.003 vvm.*

*Kata kunci: bioetanol; Saccharomyces cerevisiae; sel terperangkap*

### ABSTRACT

*Stability of cell growth was achieved continuously at a steady state in a packed-bed bioreactor. The highest productivity of ethanol was achieved (0.02 g/L/h) when 0.003 vvm was employed. The productivity of bioethanol increases when dilution rate increases. The highest production of 0.037 g/L/h was recorded when the dilution rate (D) was at 0.05 per hour. The production of bioethanol was successfully maintained in a non 100% anaerobic condition. The best aeration for the continuous production of bioethanol in a condition of steady state growth was at an aeration rate of 0.003 vvm.*

*Keywords: Bioethanol; entrapped cell; Saccharomyces cerevisiae*

### PENDAHULUAN

Bioetanol merupakan bahan tenaga yang boleh diperbaharui untuk ganti petroleum sebagai campuran 5% di bawah pempiawaian kualiti EU EN 228 tanpa pengubahsuaian enjin kereta. Dengan pengubahsuaian enjin, bioetanol dapat digunakan pada aras yang lebih tinggi iaitu, E85 (85% bioetanol). Oleh itu, teknik memegunkan sel yis telah dibangunkan untuk sistem kultur selanjur skala makmal (Nedovic et al. 1997; Pilkington et al. 1998; Varkajarvi & Pohjala 2000) untuk meningkatkan penghasilan bioetanol berbanding teknik sel terampai kerana ketumpatan sel diperolehi lebih tinggi. Kaedah yang biasa digunakan untuk memegun sel ialah dengan memerangkapkan sel dalam agar seperti 'karagen' dan 'kalsium alginat' (Godin et al. 1987; Diass et al. 1982). Walaupun demikian, dawai kalis karat dengan upaya pelekatan sel yang lebih tinggi telah dicadangkan oleh Atkinson et al. (1979). Menurut Najafpour et al. (2004) dan Baptista et al. (2006), sel yang pegun memberi produktiviti etanol lebih tinggi berbanding sel tidak pegun. Selain itu, bioreaktor padat juga boleh dioperasi pada pencairan kritikal yang berlaku 'washout' untuk meningkatkan produktiviti. Semasa fermentasi alkohol, pengudaraan merupakan salah satu faktor kritikal. Justeru, dalam kultur kelompok, penghasilan bioetanol menurun apabila kepekatan sel menurun kerana

kekurangan oksigen. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, kultur selanjur telah dikaji untuk menyelenggara operasi penghasilan bioetanol dalam keadaan seimbang pertumbuhan sel dan sintesis bioetanol. Penambahan oksigen pada kepekatan oksigen yang rendah sahaja (5-10 mg/L) dilaporkan memadai menampung pertumbuhan sel (Sablayrolles et al. 1996). Selain itu, pertumbuhan yis dilaporkan memerlukan penambahan oksigen untuk sintesis lipid (Andreasen & Stier 1953; 1954). Oleh itu, adalah penting untuk mengkaji titik keseimbangan di mana sel dapat membiak dan pada masa yang sama berupaya menghasilkan bioetanol secara selanjur.

### BAHAN DAN KAEDAH

#### MIKROORGANISMA, KOMPOSISI MEDIUM DAN PENKULTURAN

*S. cerevisiae* diperolehi dari SIRIM telah digunakan. Medium fermentasi mengandungi (g/L): 80 g Glukosa, 2.72 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.6 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g ekstrak yis, 1.5 g asid sitrat, 6 g Natrium Sitrat, 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg Tween 80 dan 0.42 mg  $\text{ZnCl}_2$  (Shen et al. 2003). Fermentasi dijalankan dalam bioreaktor padat dengan satu liter medium pada 30°C dan pH 7 dengan

menggunakan dawai kalis air sebagai bahan padat. Selepas penyenggaraan fasa kelompok selama 24 jam, medium kultur dialir keluar dan medium segar dibekalkan pada kadar pencairan (D) 0.03j<sup>-1</sup>. Pembekalan udara 0.0015, 0.0030, 0.0045, 0.0060 dan 0.0075 vvm diuji kesannya terhadap pertumbuhan sel yang berupaya menghasilkan bioetanol terbaik. Kadar pencairan yang berlainan juga diuji untuk meningkatkan produktiviti bioetanol.

PENYEDIAAN BIOREAKTOR PADAT

Bioreaktor padat diperbuat di UKM dengan kaca borosilikat yang dilengkapi 'water-jacketed' (diameter atas 5 cm, diameter bawah 3 cm dan ketinggian 30 cm) dan dipadatkan dengan dawai kalis karat. Suhu pengkulturan diselenggarakan pada 30 ± 0.2°C. Pam peristaltik (Watson-Marlow, England) diguna untuk membekal medium ke dalam reaktor. Pengeluaran dan persampelan kultur adalah secara graviti.

KAEDAH PENSAMPELAN DAN ANALISIS PENENTUAN KEPEKATAN GLUKOSA DAN PROTEIN BEBAS SEL

Kepekatan glukosa ditentukan dengan menggunakan kit reagen oksidase glukosa. Protein bebas sel diukur dengan menggunakan kaedah Lowry (Peterson 1977). Pengukuran kepekatan glukosa dan protein bebas sel dilakukan pada OD 500 nm dan 700 nm masing-masing.

PENENTUAN KEPEKATAN ETANOL

Kepekatan etanol ditentukan dengan gas kromatografi (HP5890) yang dilengkapi dengan 'flame ionisation detector' (FID). Analisis dilakukan dengan kolom kapilari jenis polar BP20 dan fasa bergerak adalah gas pengangkut helium.

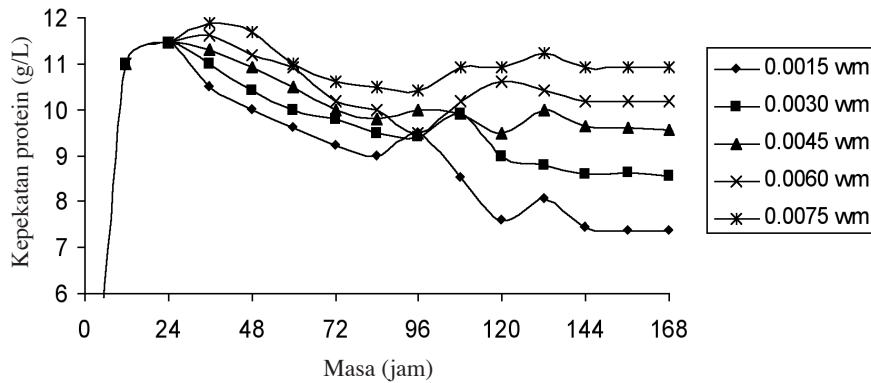
ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik telah digunakan untuk menjelaskan hubungan yang wujud antara faktor yang dikaji dengan penghasilan bioetanol. Data dianalisis dengan menggunakan program *Statistical Package of Social Sciences* (SPSS).

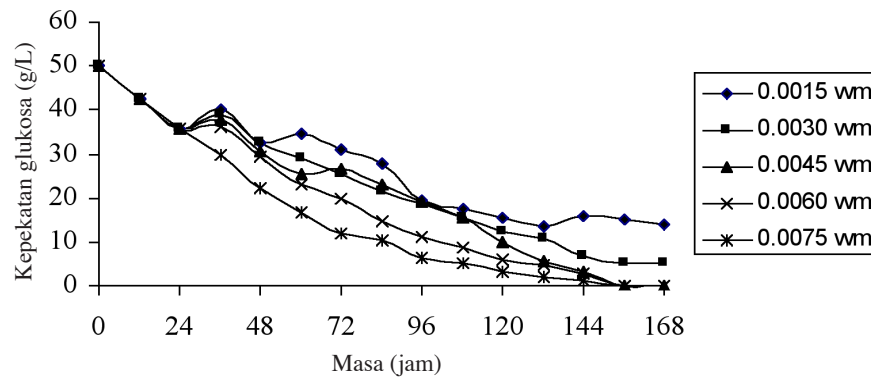
HASIL DAN PERBINCANGAN

Rajah 1 dan 2 menunjukkan jumlah kepekatan (g/L) protein bebas sel dan glukosa pada pengudaraan yang berlainan. Keadaan mantap paling cepat dicapai selepas 120 jam semasa pengudaraan sebanyak 0.0075 vvm. Pencapaian keadaan mantap paling lambat (>120 jam) dicapai apabila pengudaraan sebanyak 0.0015 dan 0.0030 vvm. Dengan itu, pencapaian produktiviti terbaik bergantung kepada tahap pengudaraan.

Pertumbuhan biojisim berdasarkan kepekatan protein didapati menurun apabila medium segar mula dibekalkan. Keadaan sebegini biasanya berlaku kerana berlaku pencairan dan keperluan penyesuaian



RAJAH 1. Kesan pengudaraan (vvm) terhadap kepekatan protein sel (g/L)



RAJAH 2. Kesan pengudaraan terhadap kepekatan glukosa (g/L)

pertumbuhan sel kepada keadaan pengkulturan selanjut sebelum mantap tercapai. Jelas pada Rajah 1, pencapaian keadaan mantap bergantung kepada pengudaraan. Apabila penurunan pengudaraan berlaku, keadaan aerobik semakin berkurangan menyebabkan keadaan mantap lambat dicapai. Keadaan ini jelas apabila pengudaraan diselenggarakan pada 0.0015 vvm. Aras kepekatan protein menunjukkan aras pertumbuhan dalam bioreaktor padat tertakluk kepada aras pengudaraan. Walau bagaimanapun, kesemuanya aras pengudaraan menghasilkan keadaan mantap pada jam ke-144. Berdasarkan Rajah 2, apabila pengudaraan semakin ditingkatkan, iaitu daripada 0.0015 hingga 0.0075 vvm, penggunaan glukosa semakin meningkat. Ini dapat ditunjukkan apabila kepekatan glukosa tidak dapat dikesan selepas jam ke-156 semasa pengudaraan sebanyak 0.0045, 0.0060 dan 0.0075 vvm. Produktiviti bioetanol yang dihasilkan semasa pengudaraan ditingkatkan daripada 0.0045 ke 0.0060 vvm semakin berkurangan sehingga bioetanol tidak lagi dihasilkan semasa pengudaraan sebanyak 0.0075 vvm. Ini dapat ditunjukkan dalam Jadual 1.

Pengudaraan melebihi atau pada 0.0045 vvm mengakibatkan keadaan anaerobik semakin kurang dan penghasilan bioetanol juga berkurangan. Sebaliknya semasa aras pengudaraan meningkat, penghasilan biojisim meningkat. Pemerhatian sebegini juga dilaporkan oleh Najafpour et al. (2004). Penghasilan bioetanol oleh *S. cerevisiae* tidak berlaku dalam keadaan 100% anaerobik kerana ketiadaan sel. Ujian statistik dengan menggunakan ujian t, menunjukkan nilai  $p=0.015$  iaitu  $p<0.05$ . Oleh itu, kesan pengudaraan mempengaruhi penghasilan bioetanol secara signifikan.

Berdasarkan Jadual 2, produktiviti bioetanol semakin meningkat sehingga 0.037 g/L/j semasa kadar pencairan 0.05 per jam. Selepas itu, produktiviti tidak meningkat lagi malah kekal pada tahap sama (0.037 g/L/j). Ini adalah kerana selepas kadar pencairan tertentu, glukosa yang dibekalkan tidak lagi sempat digunakan untuk pertumbuhan dan juga penghasilan etanol secara seimbang. Walau bagaimanapun, apabila kadar pencairan melepasi tahap kritikal, pembaziran substrat akan berlaku. Hal ini jelas berlaku pada kadar pencairan 0.06 dan 0.07 per jam.

JADUAL 1. Kesan pengudaraan terhadap produktiviti etanol

Pengudaraan (vvm)	Produktiviti etanol (g/L/j)
0.0015	0.019
0.003	0.02
0.0045	0.007
0.006	0.003
0.0075	0

JADUAL 2. Kesan kadar pencairan terhadap produktiviti etanol dan glukosa tertinggal dalam medium

Kadar pencairan (/j)	Produktiviti etanol (g/L/j)	Glukosa tertinggal dalam medium (g/L)
0.02	0.0078	0
0.03	0.02	0
0.04	0.0287	0
0.05	0.037	1
0.06	0.037	3.5
0.07	0.037	6

#### KESIMPULAN

Pengudaraan terbaik untuk produktiviti bioetanol dalam keadaan seimbang dengan pertumbuhan ialah pada 0.003 vvm. Manakala kadar pencairan yang terbaik untuk produktiviti bioetanol adalah 0.037 g/L/j pada kadar pencairan 0.05 per jam.

#### PENGHARGAAN

Jutaan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia dan Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi atas dana penyelidikan universiti (UKM-ST-02-FRGS 0021-2006).

#### RUJUKAN

- Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 41: 23-36.
- Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. 1954. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 43: 271-281.
- Atkinson, B., Black, G., Lewis, P. & Pinches, A. 1979. Biological particles of given size, shape and density for use in biological reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 21: 193-200.
- Baptista, C.M.S.G., Coias, J.M.A., Oliveira, A.C.M., Oliveira, N.M.C., Rocha, J.M.S., Dempsey, M.J., Lannigan, K.C. & Benson, P.S. 2006. Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* 78: 321-330.
- Dias, S.M.M., Novais, J.M. & Cabral, J.M.S. 1982. Immobilization of yeast on titanium activated inorganic supports. *Biotechnology Letter* 4: 203-208.
- Godin F., Casas C., Castello B. & Sola C. 1987. Immobilized cells: behaviour of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology* 26: 342-346.
- Najafpour, G., Younesi, H. & Ku Ismail, K.S. 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 92: 251-260.

- Nedovic, V.A., Pesic, R., Leskosek-Cukalovic, L., Laketic, D. & Vunjak-Novakovic, G. 1997. Analysis of liquid axial dispersion in an internal loop bioreactor for beer fermentation with immobilized yeast cells. *Proceedings of European Conference on Fluids 2*: 627-634.
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83: 346-356.
- Pilkingston, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. & Russell, I. 1998. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation. A review. *Journal of Institute Brewing* 104: 19-31.
- Sablayrolles, J.M., Salmon, J.M. & Barre, P. 1996. Carences nutritionnelles des mou^ts. Efficacite' des ajouts combine's d'oxyge`ne et d'azote ammoniacal. *Revue Franc-aise d'Oenologie* 159: 25-32.
- Shen, H.Y., Moonjai, N., Verstrepen, K.J. & Delvaux, F.R. 2003. Impact of attachment immobilization on yeast physiology and fermentation performance. *Journal of American Society Brewing Chemists* 61(2): 79-87.
- Virkajarvi, I. & Pohjala, N. 2000. Primary fermentation with immobilized yeast: Some effect of carrier materials on the flavor of the beer. *Journal of Institute Brewing* 106: 311-318.

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi  
Fakulti Sains dan Teknologi  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 UKM Bangi, Selangor D.E.  
Malaysia

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

Diserahkan: 12 Jun 2008  
Diterima: 6 Julai 2009