

BEBERAPA GEN PADA BAKTERI YANG BERTANGGUNG JAWAB TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL

Eny Ida Riyanti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975, 8339793, Faks. (0251) 8338820, E-mail: bb_biogen@litbang.deptan.go.id, enyir2@yahoo.com.au.

Diajukan: 16 Juni 2010; Diterima: 15 November 2010

ABSTRAK

Harga minyak mentah dunia yang berfluktuasi dan cadangan minyak yang makin menipis telah mendorong penggunaan *biofuel* sebagai bahan bakar alternatif dan mengintensifkan penelitian bioetanol dengan menggunakan mikroba. Identifikasi dan karakterisasi gen-gen yang bertanggung jawab dalam produksi bioetanol (etanologen) dan ekspresinya pada beberapa inang telah dilakukan untuk meningkatkan produksi bioetanol oleh mikroba. Tulisan ini mengulas sumber-sumber gen bioetanol (*pdc* dan *adh*) dan ekspresinya pada beberapa bakteri inang sebagai gen yang berdiri sendiri maupun sebagai operon dalam memproduksi bioetanol. Piruvat dekarboksilase (*pdc*) dan alkohol dehidrogenase (*adh*) adalah gen-gen yang bertanggung jawab dalam produksi bioetanol yang ditemukan pada bakteri mesofilik *Zymomonas mobilis* dan ragi *Saccharomyces cerevisiae*. Sumber gen *pdc* lebih terbatas dibandingkan dengan gen *adh*. Gen *pdc* belum ditemukan dalam jaringan hewan maupun bakteri termofilik. Manipulasi genetik beberapa bakteri dengan *pdc* dan *adh* yang diisolasi dari beberapa bakteri telah dilakukan untuk meningkatkan produksi bioetanol dari sumber karbon yang murah, yaitu biomassa. Ekspresi etanologen telah berhasil dilakukan pada bakteri mesofilik, baik gram-positif maupun gram-negatif. Namun, ekspresi etanologen pada bakteri termofilik perlu penelitian lebih lanjut untuk mencapai keberhasilan yang tinggi.

Kata kunci: Bakteri, alkohol dehidrogenase, piruvat dekarboksilase, bioetanol

ABSTRACT

Several genes in bacteria responsible for bioethanol production

The fluctuation of crude oil price and depletion of new oil sources has been increasing the demand for alternative biofuels such as bioethanol, and also intensifying research on bioethanol production using microbes. Identification and characterization of genes responsible for bioethanol production (ethanologenes) from various sources as well as expression in various promising hosts have been conducted for increasing production level of microbes being used. This paper reviewed the sources of ethanologenic genes (*pdc* and *adh*) and their expression in various bacterial hosts as a single gene and as an operon for bioethanol production. Pyruvate decarboxylase (*pdc*) and alcohol dehydrogenase (*adh*) were genes that responsible in bioethanol production firstly known in mesophilic bacterium *Zymomonas mobilis* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The source of *pdc* gene was limited compared to the *adh* gene. *pdc* was not found in animal tissue or thermophilic bacteria. Genetic manipulation of these bacteria using *pdc* and *adh* have been conducted to improve bioethanol production using cheap carbon sources, biomass. Expression of ethanologenes has been successfully done in mesophilic bacteria both gram-positive and gram-negative. However, ethanologen expression on thermophilic bacteria needs further investigations for gaining success.

Keywords: Bacteria, alcohol dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, bioethanol

Ketersediaan bahan bakar fosil yang makin menipis dan harga bahan bakar fosil yang berfluktuasi telah mendorong penggunaan bioetanol sebagai bahan bakar alternatif. Bioetanol merupakan bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan (John 2004; Schubert 2006). Produksi bioetanol dunia terus

meningkat dengan laju yang lebih tinggi dibandingkan dengan bahan bakar hayati (*biofuel*) lainnya, seperti biodiesel, karena bersifat ramah lingkungan (Henning dan Zeddies 2006).

Hasil penelitian produksi bioetanol melalui fermentasi telah banyak dipublikasi di luar negeri dengan menggunakan ber-

bagai strain mikroorganisme, seperti bakteri, ragi (*yeast*), dan jamur dengan sumber karbon yang berbeda (Dien *et al.* 2003; Desai *et al.* 2004; Demain *et al.* 2005; Chinn *et al.* 2006; Stephanopoulos 2007; Riyanti dan Rogers 2009a). Penelitian terbaru produksi bioetanol telah dilakukan melalui rekayasa genetik dengan

menggunakan gen-gen penyandi bio-etanol, yaitu piruvat dekarboksilase (*pdh*) dan alkohol dehidrogenase (*adh*) dari mikroba dengan menggunakan bahan baku yang murah, seperti biomassa lignoselulosa dengan menambahkan gen pemecah selulosa menjadi gula sederhana.

Beberapa negara seperti Brasil, Amerika Serikat, Kanada, dan Australia telah menggunakan bioetanol sebagai bahan bakar untuk transportasi. Negara-negara tersebut sangat mendorong penggunaan bioetanol untuk meningkatkan kualitas udara dan menurunkan ketergantungan pada impor minyak. Brasil merupakan negara terbesar yang mengonsumsi dan memproduksi bioetanol sebagai bahan bakar. Program produksi bioetanol dimulai pada tahun 1975 dan pada tahun 1999 kapasitas produksinya mencapai 17 miliar liter/tahun dari 101 pabrik bioetanol (Zanin *et al.* 2000). Amerika Serikat merupakan negara terbesar kedua setelah Brasil yang memproduksi bioetanol. Kapasitas produksi bioetanol Amerika Serikat tumbuh 9% pada tahun 2002 sampai 2003, dari 10,4 miliar liter menjadi 11,4 miliar liter/tahun atau meningkat 1 juta liter/tahun (MacDonald *et al.* 2003). Jumlah pabrik bioetanol yang beroperasi meningkat dari 57 pada tahun 2001 menjadi 69 pada tahun 2003. Australia mempunyai kapasitas produksi bioetanol 80–100 miliar liter/tahun.

Bioetanol umumnya diproduksi dengan bantuan mikroorganisme jenis ragi dengan sumber karbon gula sederhana dari molase, jagung atau tebu. Brasil lebih banyak menggunakan bahan baku dari jus tebu dan molase, sedangkan Amerika Serikat menggunakan bahan baku dari jus jagung. Indonesia juga mulai menggunakan bioetanol sebagai bahan bakar substitusi. Namun, publikasi tentang penelitian rekayasa bakteri untuk produksi bioetanol di Indonesia masih sangat terbatas.

Sampai saat ini, produksi bioetanol secara komersial masih dilakukan dengan menggunakan ragi, sedangkan penggunaan organisme lain seperti bakteri dan organisme hasil rekayasa genetik belum sampai pada skala komersial. Rekayasa genetik untuk organisme penghasil bioetanol selain ragi, seperti bakteri mesofilik dan termofilik, dengan menggunakan gen *pdh* dan *adh* dari berbagai sumber mikroorganisme terus dilakukan untuk meningkatkan hasil bioetanol dan proses biokimia yang lebih ekonomis. Penelitian juga di-

arahkan untuk merencanakan mikroorganisme yang dapat menggunakan bahan baku murah, seperti biomassa agar tidak bersaing dengan kebutuhan untuk pangan dan pakan.

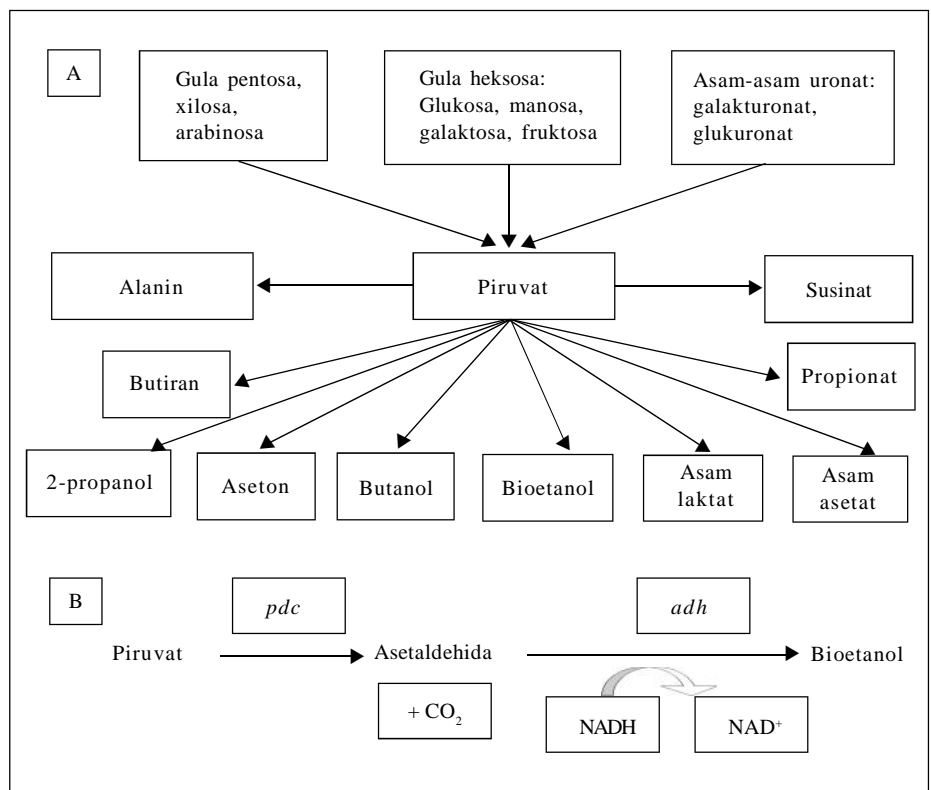
Tulisan ini mengulas sumber-sumber gen *pdh* dan *adh* untuk produksi bioetanol dari bakteri yang sudah dikarakterisasi dan ekspresinya pada beberapa bakteri inang. Informasi yang disajikan diharapkan bermanfaat dalam upaya memanipulasi bakteri untuk memproduksi bioetanol dengan menggunakan bahan baku murah, yaitu biomassa lignoselulosa.

PROSES PEMBENTUKAN BIOETANOL PADA BAKTERI

Pembentukan bioetanol dalam sistem biologi bakteri berawal dari bahan dasar gula heksosa dan pentosa yang akan dimetabolisme menjadi senyawa antara, yaitu asam piruvat, yang kemudian diubah menjadi produk fermentasi, antara lain bioetanol (Gambar 1A). Pembentukan bioetanol dapat melalui beberapa siklus, namun hanya ada dua tahapan siklus yang

mula-mula ditemukan pada ragi dan bakteri *Zymomonas sp.* dengan hasil berupa bioetanol dan karbondioksida (Gambar 1B). Gen-gen kunci yang bertanggung jawab dalam produksi bioetanol adalah *pdh* dan *adh*. Proses ini akan menguraikan berbagai sumber gen *pdh* dan *adh* yang telah diisolasi dan dikarakterisasi pada bakteri dan ekspresinya pada beberapa spesies bakteri.

Siklus homoetanol pada bakteri *Zymomonas mobilis* terdiri atas dua aktivitas enzim kunci, yaitu piruvat dekarboksilase (PDC) dan alkohol dehidrogenase (ADH), yang masing-masing dikodekan oleh gen *pdh* dan *adh* (Conway *et al.* 1987a; 1987b). Sejak gen *pdh* ditemukan pada *Z. mobilis*, gen ini banyak digunakan sebagai sumber gen dalam rekayasa genetik pada mikroba untuk memproduksi bioetanol karena bakteri ini lebih efisien dalam menggunakan energi untuk mengonversi gula menjadi etanol (Stern *et al.* 1960). PDC merupakan enzim yang mengatalis piruvat secara tidak balik (*irreversible*) menjadi asetaldehida dan CO₂, yang selanjutnya enzim ADH akan mengatalis asetaldehida menjadi etanol (Conway *et al.* 1987b; Reyen dan Sahn 1988).



Gambar 1. Fermentasi mikroba; (A) produk mikroba hasil fermentasi gula dan (B) siklus homioetanol pada ragi dan bakteri *Zymomonas mobilis* (Ingram *et al.* 1999).

Beberapa jenis gen *pdC* telah dilaporkan pada sistem biologi ragi, yaitu gen *pdC1*, *pdC2*, *pdC3*, *pdC5*, dan *pdC6* (Schmitt *et al.* 1983; Scaaff *et al.* 1989; Wright *et al.* 1989; Hohmann dan Cederberg 1990; Hohmann 1991). Beberapa gen *pdC* dan *adh* dari berbagai sumber juga telah diisolasi dan dikarakterisasi (Conway *et al.* 1987a, 1987b; Coolbear *et al.* 1992; D'Auria *et al.* 1996; Raj *et al.* 2001; Talarico *et al.* 2001; Jeon *et al.* 2008). Ekspresi gen-gen tersebut secara individu maupun bersama sebagai operon telah dilakukan pada bakteri mesofilik gram-positif dan gram-negatif, serta pada bakteri termofilik (Talarico *et al.* 2001; Raj *et al.* 2001; 2002; Riyanti dan Rogers 2009b).

SUMBER GEN PADA BEBERAPA SPESIES BAKTERI

Sumber Gen *pdC*

Gen *pdC* dan *adh* berperan penting dalam produksi bioetanol pada bakteri mesofilik *Z. mobilis* ZM4. Sumber gen *pdC* dilaporkan ditemukan pada tanaman, ragi, dan beberapa bakteri mesofilik, termasuk *Z. mobilis* (Conway *et al.* 1987b), *Acetobacter pasteurianus* (Raj *et al.* 2001), *Sarcinia ventriculi* (Talarico *et al.* 2001), dan *Zymobacter palmae* (Raj *et al.* 2002) (Tabel 1). Pada sistem bakteri, gen *pdC* yang telah diisolasi dan dikarakterisasi masih terbatas pada bakteri mesofilik gram-negatif maupun gram-positif, sedangkan isolasi gen *pdC* pada bakteri termofilik belum pernah dilaporkan. Berdasarkan hal tersebut, bakteri termofilik penghasil etanol diperkirakan tidak memiliki gen *pdC* penyandi enzim PDC (Payton 1984). Gen-gen *pdC* dari beberapa bakteri yang sudah diisolasi dan dikarakterisasi dirangkum pada Tabel 1.

Sumber gen *pdC* lebih terbatas dibandingkan dengan gen *adh*. Meskipun gen *pdC* dijumpai pada tanaman, ragi, dan jamur, gen ini tidak terdapat pada hewan dan hanya terdapat pada bakteri tertentu, namun tidak terdapat pada bakteri termofilik (Ko"nig 1998). Gen *pdC* dari *Z. mobilis* merupakan sumber gen yang penting, yaitu sebagai biokatalis pada bakteri. Gen ini banyak digunakan dalam manipulasi bakteri untuk memproduksi bioetanol, sedangkan rekayasa pada bakteri gram-positif untuk produksi bioetanol masih sangat sedikit karena terbatasnya sumber gen yang sesuai. Sekuen gen pengode fungsional PDC dari sumber bakteri telah tersedia, termasuk dari bakteri gram-positif *S. ventriculi* dan bakteri gram-negatif *A. pasteurianus* dan *Z. palmae* (Talarico *et al.* 2001; Raj *et al.* 2001; 2002).

Indonesia merupakan daerah tropis dengan kondisi lingkungan yang beragam, baik suhu, salinitas, nutrisi, maupun kandungan air. Kondisi tersebut memungkinkan bakteri sebagai sumber gen *pdC* diisolasi dari berbagai wilayah Indonesia.

Sumber Gen *adh*

Gen *adh* adalah gen yang mengode enzim ADH yang merupakan enzim penting pada metabolisme prokariot maupun eukariot. Tidak seperti *pdC*, sumber gen *adh* sangat banyak, meliputi hewan, tanaman, ragi, bakteri, dan golongan *Archae* (Ammendola *et al.* 1992; Cannio *et al.* 1994; Burdete *et al.* 1997). Enzim ADH juga merupakan katalis penting untuk mensintesis alkohol khiral primer dan alkohol sekunder (Bradshaw *et al.* 1992a, 1992b) dan beberapa senyawa kimia (Coolbear *et al.* 1992; Suye *et al.* 2002).

Pada sistem bakteri, sumber gen *adh* ditemukan pada bakteri mesofilik maupun termofilik. Beberapa gen *adh* yang telah diidentifikasi disajikan pada Tabel 2,

termasuk *adh* termostabil yang berasal dari *Bacillus acidocaldarius* (D'Auria *et al.* 1996), *Geobacillus stearothermophilus* (Cannio *et al.* 1994), *Thermoanaerobacter etanolicus* (Burdete *et al.* 1996; Holt *et al.* 2000), *Thermoanaerobium brocii* (Peretz dan Burstein 1989), *Geobacillus thermoglucosidasius* M10EXG (Jeon *et al.* 2008), dan golongan *Archae* hipertermofilik *Sulfolobus solfataricus* (Contursi *et al.* 2003), *Pyrococcus furiosus* (Van Der Oost *et al.* 2001) dan dari spesies *Thermococcus* (Antoine *et al.* 1999).

Sumber gen *adh* dari bakteri termofilik telah diisolasi dan dikarakterisasi karena sifat termostabil dari enzim-enzimnya berguna untuk proses bioteknologi (D'Auria *et al.* 1996). Varian termostabil *adh* dari bakteri fermentasi obligat *Z. mobilis* telah diteliti (Rellos *et al.* 1998). Isolasi gen *adh* dari bakteri mesofilik gram-positif dan gram-negatif maupun dari bakteri termofilik di Indonesia sangat dimungkinkan karena gen *adh* bersifat umum pada sistem metabolisme bakteri.

EKSPRESI GEN *pdC* DAN *adh* UNTUK PRODUKSI BIOETANOL

Ekspresi Gen *pdC*

Ekspresi empat gen *pdC* pada bakteri mesofilik gram-negatif *Escherichia coli* telah dilaporkan. Enzim PDC dari bakteri mesofilik gram-negatif *Z. mobilis*, *A. pasteurianus*, dan *Z. palmae* diketahui bersifat termostabil, mempunyai aktivitas 60–100% setelah diinkubasi 30 menit pada suhu 60°C, sementara gen *pdC* dari bakteri gram-positif *S. ventriculi* terdenaturisasi pada suhu lebih dari 90°C (Raj *et al.* 2002).

Gen *pdC* dari bakteri mesofilik *Z. mobilis* dilaporkan telah diekspresikan pada sistem bakteri mesofilik gram-positif asam laktat dan bakteri gram-negatif *E. coli*. Hasil tingkat ekspresi menunjukkan bahwa ekspresi pada sistem bakteri mesofilik gram-positif 5–10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan sistem bakteri mesofilik gram-negatif (Nichols *et al.* 2003).

Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa ekspresi gen *pdC* pada bakteri mesofilik gram-negatif *E. coli* rekombinan menghasilkan tingkat ekspresi yang ber-

Tabel 1. Gen *pdC* dari berbagai bakteri yang sudah diisolasi dan dikarakterisasi.

Bakteri	Enzim	No. aksesori	Referensi
<i>Zymomonas mobilis</i>	ZmoPDCX	M15368	Neale <i>et al.</i> (1987)
	ZmoPDCA	M20667	Reyen dan Sahm (1988)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ApaPDC	AF368435	Raj <i>et al.</i> (2001)
<i>Sarcinia ventriculi</i>	SvePDC	AF354297	Talarico <i>et al.</i> (2001)
<i>Zymobacter palmae</i>	ZpaPDC	AF474145	Raj <i>et al.</i> (2002)

Tabel 2. Gen-gen adh yang telah diisolasi dan dikarakterisasi dari beberapa mikroorganisme.

Mikroorganisme	Enzim	No. akses	Referensi
Bakteri mesofilik			
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	ADHI	M32100, AA27682	Keshav <i>et al.</i> (1990)
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4	ADHII	P06758, M15394 AAA27683	Conway <i>et al.</i> (1987b)
Bakteri termofilik			
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> M10EXG	ADHT	AY494991	Jeon <i>et al.</i> (2008)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (NCA1503)	ADH-T	D90421, BAA14411	Sakoda dan Imanaka (1992)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (DSM2334)	ADH	Tidak tersedia*	Dowds <i>et al.</i> (1988) Sheehan <i>et al.</i> (1988) Cannio <i>et al.</i> (1994)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> LLD-R (NCIMB 12403)	ADHh-T	Z27089, CAA81612	
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	BaADH	tiak tersedia	D'Auria <i>et al.</i> (1996)
<i>Thermoanaerobacter etanolicus</i> JW200	AdhA	AF178965, AAG01186	Bryant <i>et al.</i> (1992) Holt <i>et al.</i> (2000)
<i>Thermoanaerobacter etanolicus</i> JW200	ADH	Tidak tersedia	Bryant <i>et al.</i> (1988)
<i>Thermoanaerobacter etanolicus</i> 39E (ATCC33223)	1*Adh	Tidak tersedia	Burdete dan Zeikus (1994)
<i>Thermoanaerobium brockii</i> HTD4	2*Adh	S71131, U49975, AAB06720	Burdete <i>et al.</i> (1996) Burdete <i>et al.</i> (1997)
Archae hipertermofilik			
<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT4 (DSM1617)	SSADH	Tidak tersedia	Rella <i>et al.</i> (1987) Ammendola <i>et al.</i> (1992)
<i>Pyrococcus furiosus</i> (DSM3638)	AdhA	Tidak tersedia	Ma dan Adam (1999) Van Der Oost <i>et al.</i> (2001)
<i>Pyrococcus furiosus</i> (DSM3638)	AdhB	AAC25557	Holt <i>et al.</i> (2000)
<i>Thermococcus litoralis</i> (DSM5473)	ADH	AAB30263	Ma <i>et al.</i> (1994)
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	ADH	Y14015, CAA7434	Antoine <i>et al.</i> (1999)
<i>Thermococcus strains</i> ES-1	ADH	AAB35052	Ma <i>et al.</i> (1994)
<i>Thermococcus strains</i> AN-1	ADH	U72646, AAB63011	Li dan Stevenson (1997)

1*: Primer, 2*: Sekunder.

variasi, bergantung pada sumber gen, dengan tingkat ekspresi yang berasal dari *S. ventriculi* lebih rendah dibandingkan dengan sumber gen yang lain (Talarico *et al.* 2001; Raj *et al.* 2001, 2002). Penurunan ekspresi PDC dari *S. ventriculi* dipengaruhi oleh adanya gen-gen *tRNA asesory* (Talarico *et al.* 2001; Raj *et al.* 2002). Dengan demikian dapat dikatakan sumber gen *pdh* memengaruhi tingkat ekspresi protein pada *E. coli*. Hal ini diduga karena pengaruh penggunaan kodon dalam pekerayaan ekspresi enzim PDC pada bakteri.

Gen *pdh* dari bakteri gram-positif *S. ventriculi* (*Svpdh*) dilaporkan telah diekspresikan pada bakteri gram-positif *Lactobacillus brevis* ATCC367 secara individu, tetapi tidak meningkatkan produksi bioetanol (Liu *et al.* 2007).

Gen-gen *pdh* dari bakteri dan ragi juga telah diekspresikan pada bakteri mesofilik gram-positif *Bacillus megaterium*. Aktivitas enzim dan tingkat ekspresi masing-masing sumber gen diamati. Selain itu, tingkat spesifik mRNA transkrip dari PDC dan stabilitas rekombinan protein dianalisis. Hasil analisis menunjukkan bahwa gen *pdh* dari bakteri gram-positif *S. ventriculi* menghasilkan enzim PDC paling tinggi pada bakteri gram-positif.

Ekspresi gen *pdh* pada bakteri termofilik belum menunjukkan keberhasilan karena beberapa faktor, seperti sistem manipulasi genetik pada bakteri termofilik yang belum berkembang, serta tidak adanya sumber gen *pdh* yang diisolasi dari bakteri termofilik itu sendiri (Riyanti 2006).

Ekspresi Gen *adh*

Ekspresi gen *adh* pada bakteri mesofilik gram-negatif seperti *E. coli* telah banyak dilakukan. Gen-gen *adh* dari berbagai sumber, baik bakteri mesofilik gram-positif dan gram-negatif maupun bakteri termofilik dapat diekspresikan pada sistem mesofilik *E. coli*. Termostabil *adh* yang diisolasi dari bakteri termofilik *G. thermoglucosidasius* M10EXG telah diisolasi dan diekspresikan secara heterologus pada bakteri gram-negatif *E. coli* DH5 (NF303) (Jeon *et al.* 2008).

Gen *adhB* dari bakteri termofilik *Thermoanaerobacter ethanolicus* E39 telah diklon dan diekspresikan pada bakteri mesofilik gram-negatif *E. coli*. Gen dengan ukuran 1.056 bp ini menghasilkan enzim rekombinan homotetrametrik 37,7

kDa subunit yang termostabil sampai suhu > 90°C dengan waktu paruh 1,7 jam pada suhu 90°C (Burdete *et al.* 1996).

Gen *adhA* dari *Corynebacterium glutamicum* R. mengodekan enzim ADH sebesar 345 asam amino, yang bersifat homodimer. Mutan tanpa gen ini menyebabkan bakteri tidak dapat menggunakan bioetanol atau n-propanol sebagai sumber karbon. Hal ini karena transkripsi *adhA* diinduksi oleh kedua substrat tersebut, selain dipengaruhi oleh represi glukosa.

Ekspresi gen *adh* pada sistem bakteri mesofilik gram-positif juga telah dilaporkan. Gen *adh* dari bakteri gram-positif *Lactobacillus brevis* ATCC367 telah diisolasi dan diekspresikan pada *L. brevis* bbc04 dan menghasilkan protein sebesar 28kDa (brADH) (Liu *et al.* 2007). Bakteri gram-positif asam laktat juga telah digunakan untuk mengekspresikan gen *adhB* dari bakteri *Z. mobilis* (Nichols *et al.* 2003).

Ekspresi gen pada sistem bakteri termofilik *Thermus thermophilus* HB27 dari gen *adhI* yang berasal dari bakteri termofilik *G. thermoglucosidasius* M10EXG dilaporkan dapat meningkatkan level enzim ADH (Riyanti dan Rogers 2009b).

Gen *pdC* dari bakteri gram-positif *S. ventriculi* (*Svpdc*) telah diekspresikan pada bakteri gram-positif *L. brevis* ATCC367 secara individu, tetapi tidak meningkatkan produksi bioetanol. Namun setelah diklon di belakang gen *Svpdc* dan menghasilkan operon *pdC/adh*, gen *adh* dari *L. brevis* (Braadh) dapat meningkatkan produksi bioetanol pada bakteri gram-positif *S. ventriculi*. Bakteri gram-positif ini dapat menggunakan gula pentosa sehingga dapat digunakan untuk produksi bioetanol dari bahan biomassa. Bakteri mesofilik gram-positif *L. brevis* ATCC367 juga dapat digunakan untuk mengekspresikan gen *pdC* dan *adh* dalam suatu operon dengan menggunakan

promoter bakteri gram-positif untuk menghasilkan bioetanol (Liu *et al.* 2007).

Gen *pdC* dari *S. ventriculi* dipilih untuk transkripsi bersama dengan gen *adh* dari *G. stearothermophilus* dalam satu operon. Etanol yang dihasilkan dari produk operon pada bakteri gram-positif ini mempunyai tingkat ekspresi yang tinggi pada *B. megaterium*, dan mengatalis piruvat menjadi bioetanol (Talarico *et al.* 2005).

Operon yang mengandung gen *pdC* dan *adhB* dari bakteri mesofilik gram-negatif *Z. mobilis* telah diekspresikan untuk menghasilkan bioetanol pada sistem bakteri mesofilik gram-positif asam laktat. Ekspresi ini 5–10 kali lebih tinggi dibanding tingkat ekspresinya pada bakteri mesofilik gram-negatif *E. coli* (Nichols *et al.* 2003).

Seiring dengan keunggulan sistem termofilik, penelitian produksi bioetanol banyak dilakukan pada sistem termofilik (Chinn *et al.* 2006; Riyanti dan Rogers 2009a), begitu pula penelitian gen pengode bioetanol serta ekspresinya pada sistem ini. Namun, penelitian rekayasa genetik dengan etanologen pada sistem termofilik belum memberi hasil yang memuaskan. Pembuatan operon etanologen dari gen *pdC* mesofilik dari *Z. mobilis* ZM4 dan gen termostabil *adh* dari bakteri termofilik *G. thermoglucosidasius* M10EXG telah pula dilaporkan dengan menggunakan termostabil *promoter* dengan kerangka *shuttle vector* untuk bakteri mesofilik dan termofilik (Riyanti dan Rogers 2009b). Kedua gen *pdC* dan *adh* terekspresi secara individu pada *E. coli* JM109, begitu pula produk operon berupa bioetanol. Namun, operon ini tidak terekspresi pada bakteri termofilik *T. thermophilus* HB27. Hal ini disebabkan oleh beberapa hal, antara lain vektor ekspresi belum banyak tersedia dan belum efisien, serta biosintesis etanol pada sistem termofilik belum diketahui.

Hasil rekayasa mikroba untuk produksi bioetanol masih pada tahap penelitian dan belum diaplikasikan pada skala komersial di negara produsen maupun pengguna bioetanol. Rekayasa bakteri penghasil etanol untuk efisiensi produksi dan penggunaan bahan baku yang murah sangat diperlukan karena Indonesia merupakan negara agraris dengan limbah pertanian yang berlimpah.

KESIMPULAN

Gen *pdC* dan *adh* merupakan gen penting dalam produksi etanol pada sistem bakteri mesofilik. Gen-gen ini telah diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai sumber. Gen *pdC* dilaporkan terdapat pada bakteri mesofilik gram-negatif maupun gram-positif. Ekspresi gen-gen ini secara individu telah dilakukan pada bakteri gram-positif maupun gram-negatif. Enzim yang dihasilkan oleh gen *pdC* dari bakteri mesofilik gram-negatif bersifat termostabil, sedangkan yang berasal dari bakteri gram-negatif tidak memiliki sifat tersebut.

Gen *adh* ditemukan hampir pada setiap organisme, termasuk bakteri mesofilik dan termofilik. Gen-gen etanologenik dalam suatu operon telah diekspresikan pada beberapa sistem bakteri mesofilik, sedangkan ekspresinya pada sistem bakteri termofilik masih jauh dari harapan. Hal ini kemungkinan karena kesesuaian sumber gen dan bakteri yang direkayasa, seperti kesesuaian kodon antara sumber gen dan bakteri yang direkayasa. Dengan adanya manipulasi genetik dengan gen *pdC* dan *adh* maka arah perbaikan genetik mikroorganisme untuk produksi bioetanol dengan kemampuan produksi lebih tinggi dapat dilakukan dengan menggunakan bahan baku yang murah, yaitu biomassa.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammendola, S., C.A. Raia, C. Caruso, L. Camardella, S. D'Auria, M. de Rosa, and M. Rossi. 1992. Thermostable NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*: Gene and properties sequence determination and relationship to other alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 31: 12514–12523.
- Antoine, E., J.L. Rolland, J.P. Raffin, and J. Dietrich. 1999. Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene encoding NADPH group III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus hydrothermalis*. *Eur. J. Biochem.* 264: 880–889.
- Bradshaw, C.W., H. Fu, G.J. Shen, and C.H. Wong. 1992a. A *Pseudomonas* sp. alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity and unusual stereospecificity for organic synthesis. *J. Org. Chem.* 57: 1526–1532.
- Bradshaw, C.W., W. Humme, and C.H. Wong. 1992b. *Lactobacillus* kefir alcohol dehydrogenase: A useful catalyst for synthesis. *J. Org. Chem.* 57: 1533–1536.
- Bryant, F.O., J. Wiegel, and L.G. Ljungdahl. 1988. Purification and properties of primary and secondary alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(2): 460–465.

- Bryant, F.O., J. Wiegel, and L.G. Ljungdahl. 1992. Comparison of alcohol dehydrogenases from wild-type and mutant strain, JW200 Fe4, of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 490–495.
- Burdete, D.S. and J.G. Zeikus. 1994. Purification of acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E and characterization of the secondary-alcohol dehydrogenase (2^o Adh) as a bifunctional alcohol dehydrogenase acetyl-CoA reductive thioesterase. *Biochem. J.* 302 (Part1): 163–170.
- Burdete, D.S., C. Vieille, and J.G. Zeikus. 1996. Cloning and expression of the gene encoding the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E secondary-alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Biochem. J.* 316: 115–122.
- Burdete, D.S., F. Secundo, R.S. Philips, J. Dong, R.A. Scott, and J.G. Zeikus. 1997. Biophysical and mutagenic analysis of *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary-alcohol dehydrogenase activity and specificity. *Biochem. J.* 326: 717–724.
- Cannio, R., M. Rossi, and S. Bartolucci. 1994. A few acid substitutions are responsible for the higher thermostability of a novel NAD⁺-dependent bacillary alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 222: 345–352.
- Chinn, M.S., E.E. Nokes, and H.J. Strobel. 2006. Screening of thermophilic anaerobic bacteria for solid substrate cultivation on lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Prog.* 22: 53–59.
- Contursi, P., R. Cannio, S. Prato, G. Fiorentino, M. Rossi, and S. Bartolucci. 2003. Development of a genetic system for hyper-thermophilic Archaea: Expression of a moderate thermophilic bacterial alcohol dehydrogenase gene in *Sulfolobus solfataricus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218: 115–120.
- Conway, T., G.W. Sewell, Y.A. Osman, and L.O. Ingram. 1987a. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 169(6): 2591–2567.
- Conway, T., Y.A. Osman, J.I. Konnan, E.M. Hoffmann, and L.O. Ingram. 1987b. Promoter and nucleotide sequences of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Bacteriol.* 169(3): 949–954.
- Coolbear, T., R.M. Daniel, and H.W. Morgan. 1992. The enzyme from extreme thermophiles: Bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 45: 57–98.
- D'Auria, S., F. La Cara, F. Nazzaro, N. Vespa, and M. Rossi. 1996. A thermophilic alcohol dehydrogenase from *Bacillus acidocaldarius* not reactive towards ketones. *J. Biochem.* 120: 498–504.
- Demain, A.L., M. Newcomb, and J.H.D. Wu. 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(1): 124–154.
- Desai, S.G., M.L. Guerinot, and L.R. Lynd. 2004. Cloning of L-lactate dehydrogenase and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 600–605.
- Dien, B.S., M.A. Cotta, and T.W. Jeffries. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 258–266.
- Dowds, B.C.A., M.C. Sheehan, C.J. Bailey, and D.J. McConnel. 1988. Cloning and characterization of the gene for methanol-utilizing alcohol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Gene* 68: 11–22.
- Henning and Zeddies. 2006. Bioengineering and agriculture: Promises and challenges. International Food Policy Research Institute. <http://www.ifpri.org/2020/focusfocus14/focus1409.pdf>. [25 April 25 2006].
- Hohmann, S. 1991. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173: 7963–7969.
- Hohmann, S. and H. Cederberg. 1990. Autoregulation may control the expression of pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5. *Eur. J. Biochem.* 188: 615–621.
- Holt, P.J., R.E. Williams, K.N. Jordan, C.R. Lowe, and N.C. Bruce. 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the primary alcohol dehydrogenase gene from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200. *FEMS Microbiol. Lett.* 190: 57–62.
- Ingram, L.O., H.C. Aldrich, A.C.C. Borges, T.B. Causey, A. Martinez, F. Morales, A. Saleh, S.A. Underwood, L.P. Yomano, S.W. York, J. Zaldivar, and S. Zhou. 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel bioethanol production. *Biotechnol. Prog.* 15: 855–866.
- Jeon, Y.J., J.G.N. Fong, E.I. Riyanti, B.A. Neilan, P.L. Rogers, and C.J. Svenson. 2008. Heterologous expression of the alcohol dehydrogenase (*adhI*) gene from *Geobacillus thermoglucosidasius* strain M10EXG. *J. Biotechnol.* 135: 127–133.
- John, T. 2004. Biofuels for transport. <http://www.task39.org/>. [27 September 2009].
- Keshav, K.F., L.P. Yomano, H.J. An, and L.O. Ingram. 1990. Cloning of the *Zymomonas mobilis* structural gene encoding alcohol dehydrogenase I (*adhA*): Sequence comparison and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172(5): 2491–2497.
- Ko'ning, S. 1998. Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochem. Biophys. Acta.* 1385: 271–286.
- Li, D. and J. Stevenson. 1997. Purification and sequence analysis of a novel NADP (H) dependent type III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus* strain AN1. *J. Bacteriol.* 179: 4433–4437.
- Liu, S., B.S. Dien, N.N. Nichols, K.M. Bischoff, S.R. Hughes, and M.A. Cotta. 2007. Co-expression of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes in *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 274(2): 291–297.
- Ma, K., F.T. Robb, and M.W.W. Adams. 1994. Purification and characterization of NAPP specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 562–568.
- Ma, K. and M.W. Adam. 1999. An unusual oxygen-sensitive, iron- and zinc-containing alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 181(4): 1163–1170.
- MacDonald, T., G. Yowell, M. McCormack, and M. Bouvier. 2003. Bioethanol supply outlook for California. California Energy Commission. p. 1–27.
- Neale, A.D., R.K. Scopes, R.E.H. Wattenhall, and N.J. Hoogenraad. 1987. Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene in *Zymomonas mobilis*. *Nucleic Acids Res.* 15(4): 1753–1761.
- Nichols, N.N., B.S. Diens, and R.J. Bothas. 2003. Engineering lactic acid bacteria with pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes for bioethanol production from *Zymomonas mobilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 315–321.
- Payton, M. 1984. Production of bioethanol by thermophilic bacteria. *Trends Biotechnol.* 2(6): 153–158.
- Peretz, M. and Y. Burstein. 1989. Amino acid sequence of alcohol dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermoanaerobacterium brockii*. *Biochemistry* 28: 6549–6555.
- Raj, K.C., L.A. Talarico, L.O. Ingram, and J.A. Maupin-Furlow. 2002. Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (*pdc*) and comparison to bacterial homologues. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 2869–2876.
- Raj, K.C., L.O. Ingram, and J.A. Maupin-Furlow. 2001. Pyruvate decarboxylase: A key enzyme for the oxidation metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Archives of Microbiol.* 176(6): 443–451.
- Rella, R., C.A. Raia, M. Pensa, F.M. Pisani, A. Gambacorta, M. De Rosa, and M. Rossi. 1987. A novel archaeobacterial NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 167: 475–476.
- Rellos, P., L. Pinheiro, and R.K. Scopes. 1998. Thermostable variants of *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase obtained using PCR-mediated random mutagenesis. *Protein Expression and Purification* 12: 61–66.
- Reyen, M. and H. Sahn. 1988. Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains. *J. Bacteriol.* 170(7): 2210–2213.

- Riyanti, E.I. 2006. Genetic Manipulation of Thermophiles for Ethanol Production. PhD Thesis. The University of New South Wales, Sydney, Australia. 223 pp.
- Riyanti, E.I. and P.L. Rogers. 2009a. Kinetic evaluation of bioethanol-tolerant thermophile *Geobacillus thermoglucosidasius* M10EXG for ethanol production. *Indones. J. Agric. Sci.* 10(1): 34–41.
- Riyanti, E.I. and P.L. Rogers. 2009b. Construction and expression of pet operon using shuttle vector for mesophilic and thermophilic bacteria. *J. AgroBiogen* 5(1): 7–15.
- Sakoda, H. and T. Imanaka. 1992. Cloning and sequencing of the gene encoding for alcohol dehydrogenase of *Bacillus stearothermophilus* and rational shift of the optimum pH. *J. Bacteriol.* 174(4): 1397–1402.
- Scaaff, I., J.B.A. Green, D. Gozablo, and S. Hohmann. 1989. A deletion of the PDC1 gene for pyruvate decarboxylase of yeast cause a different phenotype than previously isolated point mutations. *Curr. Genet.* 15: 75–91.
- Schmitt, H.D., M. Ciriacy, and F.K. Zimmermann. 1983. The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. *Mol. Gene Genet.* 192: 247–252.
- Schubert, C. 2006. Can biofuels finally take center stage? *Nat. Biotechnol.* 24(7): 777–784.
- Sheehan, M.C., C.J. Bailey, B.C.A. Dowds, and D.J. McConnell. 1988. A new alcohol dehydrogenase, reactive towards bioethanol, from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J.* 252: 661–666.
- Stephanopoulos, G. 2007. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science* 315: 801–804.
- Stern, I.J., C.H. Wang, and C.M. Gilmour. 1960. Comparative catabolism of carbohydrates in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 79: 601–611.
- Suye, S.I., K. Kamiya, T. Kawamoto, and A. Tanaka. 2002. Efficient repeated use of alcohol dehydrogenase with NAD⁺ regeneration in an aqueous-organic two phase system. *Biocatalysis and Biotransformation* 20(1): 23–28.
- Talarico, L.A., L.O. Ingram, and J.A. Maupin-Furlow. 2001. Production of the Gram-positive *Sarcina ventriculi* pyruvate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Microbiology* 147: 2425–2435.
- Talarico, L.A., M.A. Gil, L.P. Yomano, L.O. Ingram, and J.A. Maupin-Furlow. 2005. Construction and expression of an bioethanol production operon in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 151: 4023–4031.
- Van der Oost, J., W.G.B. Voorhorst, S.W.M. Kengen, A.C.M. Geerling, V. Wittenhorst, Y. Gueguen, and W.M. de Vos. 2001. Genetic and biochemical characterization of a shortchain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* 268: 3062–3068.
- Wright, A.P.H., H.L. Png, and B.S. Hartley. 1989. Identification of a new gene required for full pyruvate decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet* 15: 171–175.
- Zanin, G.M., C.C. Santana, E.P.S. Bon, R.C.L. Giordano, F.F. de Moraes, S.R. Andrietta, C.C. de Carvalho Neto, I.C. Macedo, D.L. Fo, L.P. Ramos, and D.J. Fontana. 2000. Brazilian bioethanol program. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86(1–9): 1147–1161.