

KINETIKA PRODUKSI L-LISIN DALAM "KULTUR FED-BATCH" MENGUNAKAN STRAIN *Brevibacterium lactofermentum*

Oleh : I Made Artika *)

ABSTRAK

Parameter kinetika produksi L-lisin secara mikrobial dalam "kultur fed-batch" menggunakan strain *Brevibacterium lactofermentum* (BL-1 M44 dan BL-1 M76) telah ditentukan. Fermentasi dilakukan menggunakan fermentor LH bervolume 2 liter. Strain umumnya ditumbuhkan dalam medium dengan konsentrasi glukosa 150 g/l.

Optimasi kondisi kultur dan komposisi medium juga dilakukan. Terbukti bahwa produksi L-lisin dapat ditingkatkan dengan cara menumbuhkan strain yang digunakan dengan teknik "kultur fed-batch". Selanjutnya ditemukan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak ragi dan pepton memperpendek waktu fermentasi sekaligus meningkatkan produktivitas. Konsentrasi L-lisin relatif tinggi (62.3 g/l) tercapai pada fermentasi yang menggunakan medium dengan konsentrasi glukosa 200 g/l serta diberi sumber nitrogen organik secara berlebihan. Namun, pada kondisi ini laju spesifik produksi L-lisin serta produktivitas yang dicapai lebih rendah.

ABSTRACT

Kinetic parameters of microbial L-lysine production in fed-batch culture using two strains of *Brevibacterium lactofermentum* (BL-1 M44 and BL-1 M76) have been determined. Fermentations were conducted using a 2 liter LH fermentor. In most cases, the strains were cultured in medium containing 150 g/l glucose.

Optimization of culture conditions as well as medium composition has also been carried out. It was evident that L-lysine production could be improved by growing the strain under fed-batch conditions. An increase in both the concentration of yeast extract and peptone was found to significantly reduce fermentation time and in turn to increase productivity. Relatively high L-lysine concentration (eg. 62.3 g/l) could be obtained by increasing total glucose from 150 g/l to 200 g/l in medium supplemented with excess organic nitrogen. For this condition, however, the specific L-lysine production rate as well as the productivity were found to be lower.

*) Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA IPB

PENDAHULUAN

L-lisin umumnya dianggap sebagai asam amino yang paling defisien baik pada makanan maupun pada pakan hewan penghasil daging (Anonim, 1985). Untuk itu, L-lisin sering ditambahkan pada pakan yang berbahan pokok sereal guna meningkatkan laju pertumbuhan ternak (Rogers *et al.*, 1986).

Sebelum tahun 1965, L-lisin yang dipasarkan sebegini besar diperoleh dari hidrolisat protein (Anonim, 1985), akan tetapi saat ini L-lisin sebagian besar diproduksi dengan cara fermentasi.

Meskipun untuk tujuan komersial, L-lisin umumnya diproduksi dalam "kultur batch" berskala besar (Ackerson *et al.*, 1989), namun kini mulai diteliti kemungkinan penggunaan "Kultur fed-batch" terutama guna mengatasi pengaruh inhibisi substrat dan represi katabolit (Rogers *et al.*, 1986).

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kinetika produksi L-lisin dalam "kultur fed-batch" dan membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil dari "kultur batch". Penelitian ini juga bertujuan untuk mengoptimalkan komposisi medium "kultur fed-batch".

TINJAUAN PUSTAKA

A. Karakteristik "Kultur Fed-batch"

Istilah "kultur fed-batch" pertama kali digunakan oleh Yoshida *et al.* (1973) untuk menggambarkan pengoperasian "kultur batch" yang secara bertahap atau terus menerus ditambahi nutrisi tanpa adanya pemanenan hasil hingga proses fermentasi berakhir (Stanbury dan Whitaker, 1984). Adanya penambahan nutrisi mengakibatkan volume kultur terus meningkat.

Ciri penting lain dari "kultur fed-batch" adalah adanya keleluasaan untuk mengatur konsentrasi nutrisi tertentu di dalam kultur selama proses berlangsung, yaitu dengan memanipulasi laju penambahannya (Yamane dan Shimizu, 1984; Minihane dan Brown, 1986). Oleh karena itu, kultur "fed-batch" umumnya lebih unggul dibandingkan "kultur batch" konvensional khususnya pada proses fermentasi yang produktivitasnya dapat ditingkatkan melalui manipulasi konsentrasi nutrisi medium.

B. Kegunaan "Kultur Fed-batch"

"Kultur fed-batch" sangat ideal diterapkan pada fermentasi yang pertumbuhan sel atau proses pembentukan produknya peka terhadap konsentrasi substrat pembatas (Minihane, 1986). Umumnya teknik ini efektif dalam mengurangi pengaruh inhibisi substrat. Selain itu, teknik ini juga dapat digunakan untuk menghasilkan konsentrasi sel yang tinggi, mengatasi kehilangan air akibat penguapan selama fermentasi serta untuk mempertahankan viskositas medium.

Setelah teknik ini terbukti berhasil diterapkan dalam proses produksi lagi, "kultur fed-batch" diterapkan pula dalam pembuatan antibiotika, asam amino, enzim, vitamin, protein sel tunggal serta dalam proses pembuatan berbagai pelarut organik yang diperdagangkan (Whitaker, 1980).

BAHAN DAN METODA

Mikroorganisme :

Strain yang digunakan adalah *Brevibacterium lactofermentum* (BL-1 M76 dan BL-1 M44). Strain BL-1 M76 bersifat sensitif terhadap fluoropiruvat dan merupakan turunan dari *B. lactofermentum*, BL-1 (ATCC 21798, AEC^r, ser⁻). Sedangkan strain BL-1 M44 bersifat sensitif terhadap polimiksin.

Medium :

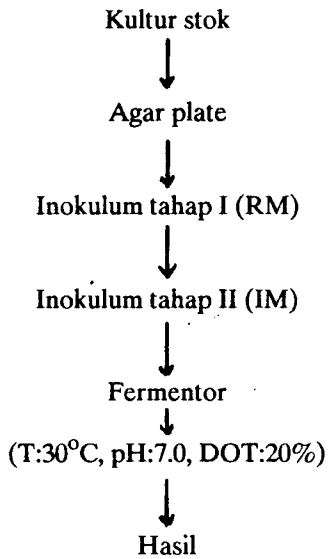
Medium yang digunakan adalah : 'rich medium" (RM), medium inokulum (IM), medium "kultur batch" dan medium "kultur fed-batch".

Fermentor :

Dalam penelitian ini digunakan fermentor LH berkapasitas 2 liter yang dilengkapi dengan alat pengontrol suhu, pH dan oksigen terlarut.

Prosedur Fermentasi :

Rangkaian proses fermentasi dimulai dengan menumbuhkan kultur stok dalam agar plate. Dari agar plate, diambil satu koloni (dalam keadaan fase log) untuk diinokulasikan pada medium inokulum tahap I. Selanjutnya, inokulum tahap I digunakan untuk menginokulasikan medium inokulum tahap II dan inokulum tahap II digunakan untuk menginokulasikan medium fermentasi. Bagan alir proses fermentasi disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir proses fermentasi L-lisin

Metoda Analisis :

Konsentrasi biomassa ditentukan dengan metode berat kering, konsentrasi glukosa ditentukan dengan alat pengukur kadar glukosa (Yellow Springs Instrument) dan kadar L-lisin ditentukan dengan menggunakan metode ninhidrin termodifikasi.

Evaluasi Parameter Kinetika

Rendemen biomassa (berdasarkan glukosa yang dikonsumsi) :

$$Y_{x/s} = \frac{\delta x}{\delta s} \text{ g/g}$$

Rendemen L-lisin (berdasarkan glukosa yang dikonsumsi) :

$$Y_{p/s} = \frac{\delta P}{\delta s} \text{ g/g}$$

Laju spesifik konsumsi glukosa :

$$q_s = \frac{1 \cdot \delta s}{x \delta t} \text{ g/(gh)}$$

Laju spesifik pembentukan L-lisin :

$$q_p = \frac{1}{x} \frac{\delta p}{\delta t} \text{ g/(gh)}$$

Produktivitas volumetrik :

$$Q_v = \frac{r_f}{t_f} \text{ g/(lh)}$$

Keterangan :

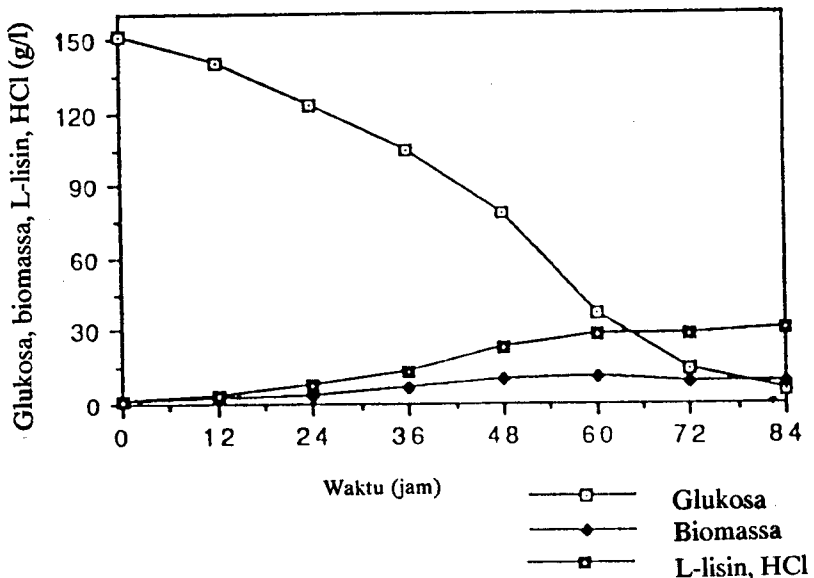
- x = konsentrasi biomassa (g/l)
- p = konsentrasi L-lisin (g/l)
- s = konsentrasi glukosa (g/l)
- t = waktu (jam)
- t_f = waktu fermentasi (jam)
- r_f = konsentrasi L-lisin pada waktu t_f

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Produksi L-lisin Pada Medium Dengan Kandungan Ekstrak Ragi dan Pepton Masing-masing 1 g/l

A.1. Produksi L-lisin "Dalam Kultur Batch"

Sebagai percobaan pendahuluan, strain BL-1 M44 ditumbuhkan dalam medium "kultur batch" yang mengandung 150 g/l glukosa. Hasil percobaan disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Data produksi L-lisin dalam "kultur batch"

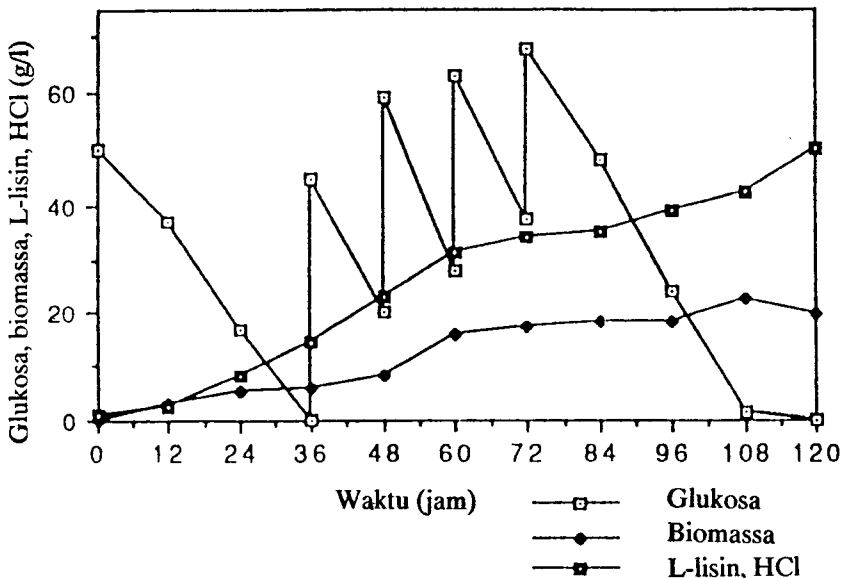
Konsentrasi akhir L-lisin sebesar 30.7 g/l tercapai setelah dilakukan fermentasi selama 84 jam dengan rendemen biomassa dan rendemen L-lisin masing-masing 0.07 g/g dan 0.21 g/g. Dari hasil analisis kinetika ditemukan laju spesifik konsumsi glukosa dan laju spesifik produksi L-lisin masing-masing sebesar 0.24 g/(gh) dan 0.05 g/(gh). Nilai ini menunjukkan bahwa tiap gram sel memakan 0.24 g glukosa serta menghasilkan 0.05 g L-lisin tiap jam.

A.2. Produksi L-lisin Dalam "Kultur Fed-batch"

Pada percobaan ini, strain yang sama ditumbuhkan dengan teknik "kultur fed-batch" menggunakan medium dengan kandungan glukosa total setara dengan 150 g/l. Pada awalnya kultur bervolume 1 liter dengan konsentrasi glukosa sebesar 50 g/l. Selanjutnya secara bertahap ke dalam kultur ditambahkan 125 ml larutan glukosa (konsentrasi 350 g/l). Penambahan dimulai setelah fermentasi berlangsung selama 36 jam yaitu tatkala konsentrasi glukosa didalam medium lebih rendah dari 10 g/l. Hasil percobaan disajikan pada Gambar 3.

Konsentrasi biomassa sebesar 20 g/l dan konsentrasi L-lisin sebesar 50 g/l tercapai pada akhir proses fermentasi yang berlangsung selama 120 jam. Konsentrasi L-lisin ini sekitar 63% lebih tinggi dibandingkan dengan yang diperoleh dari "kultur batch". Rendemen biomassa dan rendemen L-lisin yang dicapai juga lebih tinggi yaitu masing-masing bernilai 0.13 g/g dan 0.33 g/g. Hasil ini didukung oleh Hadjsassi *et al.* (1988) yang berhasil meningkatkan produksi L-lisin sebesar 54% melalui penerapan teknik "kultur fed-batch".

Analisis kinetika menunjukkan bahwa baik laju spesifik konsumsi glukosa (0.20 g/(gh)), laju spesifik produksi L-lisin (0.06 g/(gh)) maupun produktivitas (0.44 g/(lh)) yang tercapai adalah hampir sama dengan yang didapat dari "kultur batch"



Gambar 3. Data produksi L-lisin dalam "kultur fed-batch"

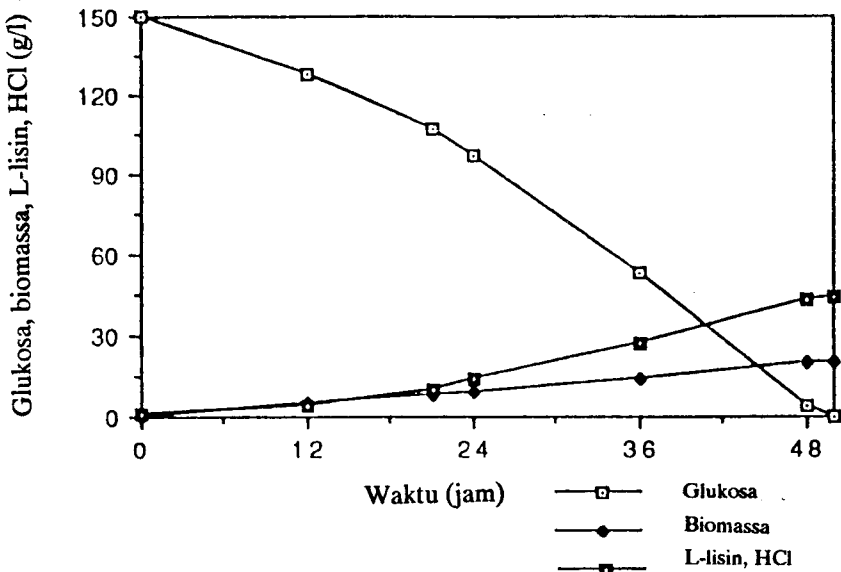
B. Produksi L-lisin Pada Medium yang mengandung masing-masing 2 g/l ekstrak ragi dan pepton

Rendahnya tingkat produktivitas yang tercapai pada percobaan terdahulu diduga disebabkan oleh rendahnya kandungan sumber nitrogen organik pada medium. Untuk itu, baik konsentrasi ekstrak ragi maupun konsentrasi pepton ditingkatkan dari 1 g/l menjadi 2 g/l pada medium untuk percobaan selanjutnya.

B.1. Produksi L-lisin Pada "Kultur Batch"

Pada percobaan ini strain BL-1 M76 ditumbuhkan pada medium "kultur batch" yang mengandung 150 g/l glukosa. Hasil percobaan diperlihatkan pada Gambar 4.

Salah satu perubahan ke arah perbaikan yang diamati adalah memendeknya waktu fermentasi. Fermentasi berlangsung hanya dalam waktu 50 jam. Setelah itu sel mati karena kehabisan glukosa di dalam medium.



Gambar 4. Data produksi L-lisin dalam "kultur batch"

Konsentrasi akhir biomassa dan konsentrasi akhir L-lisin masing-masing sebesar 20 g/l dan 43.5 g/l. Kedua nilai ini lebih tinggi dari nilai serupa yang diperoleh dari percobaan "kultur batch" sebelumnya. Rendemen biomassa dan rendemen L-lisin masing-masing sebesar 0.13 g/g dan 0.29 g/g.

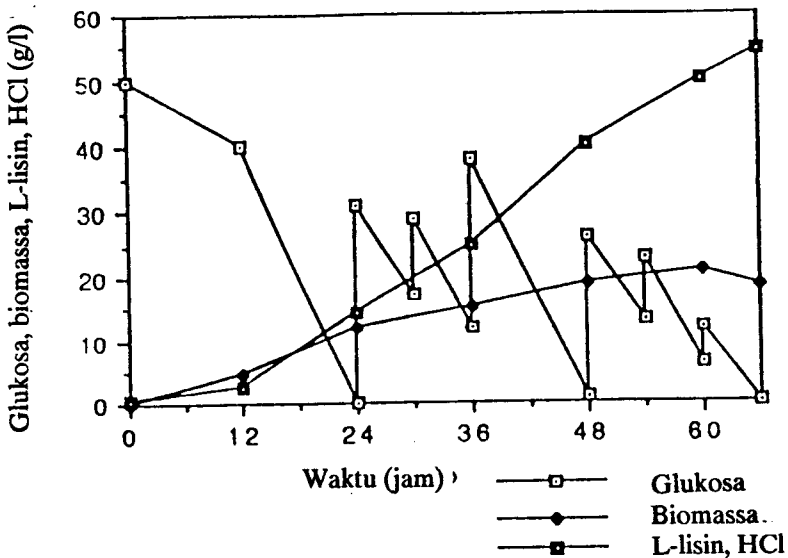
Selanjutnya ditemukan bahwa baik laju spesifik konsumsi glukosa (0.13 g/(gh)) maupun laju spesifik pembentukan L-lisin (0.09 g/(gh)) juga meningkat. Memendeknya waktu fermentasi mengakibatkan adanya peningkatan produktivitas secara nyata. Tingkat produktivitas yang dicapai bernilai 0.73 g/(lh).

B.2. Produksi L-lisin Dalam "Kultur Fed-batch"

Selain peningkatan konsentrasi sumber nitrogen organik, pada percobaan "kultur fed-batch" ini juga dilakukan peningkatan volume awal kultur menjadi 1.25 l. Hal ini dimaksudkan untuk mengurangi kepekatan konsentrasi mineral pada awal proses fermentasi yang diduga sebagai penyebab terjadinya pengendapan serta menghambat pertumbuhan sel. Sebagai penambah substrat digunakan larutan glukosa berkonsentrasi 650 g/l. Hasil percobaan disajikan pada gambar 5.

Waktu fermentasi (66 jam) ternyata konsisten yaitu jauh lebih pendek dari waktu fermentasi "kultur fed-batch" terdahulu (120 jam). Walaupun konsentrasi biomassa yang dicapai hampir sama (18.2 g/l) namun jumlah L-lisin yang terakumulasi meningkat (54.2 g/l). Nilai rendemen biomassa dan rendemen L-lisin masing-masing adalah sebesar 0.12 g/g dan 0.36 g/g.

Pada percobaan ini diperoleh laju konsumsi glukosa sebesar 0.23 g/(gh) dan laju spesifik produksi L-lisin sebesar 0.08 g/(gh) dengan tingkat produktivitas cukup tinggi yaitu 0.75 g/(lh).

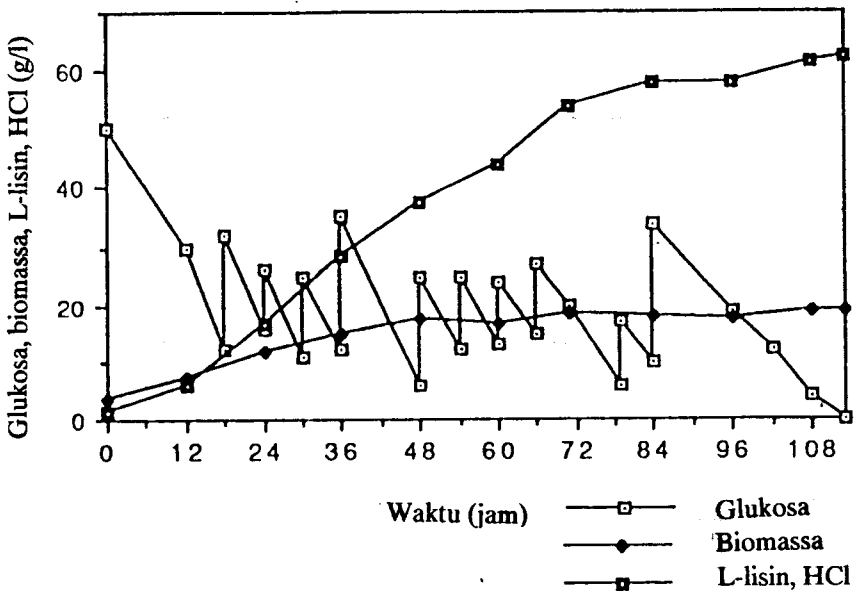


Gambar 5. Data produksi L-lisin dalam "kultur fed-batch"

B.3. Produksi L-lisin Dalam "Kultur Fed-batch" dengan 200 g/l Glukosa

Sehubungan pada dua percobaan terakhir glukosa diduga bertindak sebagai nutrisi pembatas, maka dinilai perlu untuk menumbuhkan strain penghasil L-lisin ini pada medium dengan kandungan glukosa lebih tinggi. Pada percobaan ini strain yang BL-1 M76 ditumbuhkan pada "kultur fed-batch" dengan konsentrasi glukosa total 200 g/l. Hasil percobaan ini disajikan pada Gambar 6.

Dari hasil percobaan terlihat bahwa walaupun konsentrasi akhir biomassa yang tercapai hampir sama namun terjadi peningkatan konsentrasi akhir L-lisin menjadi 62.3 g/l. Akan tetapi produktivitas menurun terutama karena meningkatnya waktu fermentasi. Rendemen biomassa dan rendemen L-lisin juga menurun. Satiawihardja (1990) menemukan hal serupa dalam percobaan "kultur batch", yaitu rendemen dan produktivitas L-lisin menurun sewaktu konsentrasi glukosa awal ditingkatkan dari 150 g/l menjadi 200 g/l.



Gambar 6. Data produksi L-lisin dalam "kultur fed-batch" dengan 200 g/l glukosa

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa teknik "kultur fed-batch" berskala besar dapat dijadikan sebagai teknik alternatif guna meningkatkan produksi L-lisin. Mengingat pengoperasian "kultur fed-batch" membutuhkan waktu yang relatif lama, maka waktu fermentasi perlu dioptimalkan khususnya dalam penerapan teknik ini untuk tujuan komersial.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackerson, M.D., E.C. Clausen dan J.L. Gaddy (1989). Lysine production in continous culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20/21, 511-528
- Anonim (1985). Advances in the biotechnology of lysine production. *Nutrition Review*, 43, 88-89
- Hadjsassi, A., M.P. Queric, A.M. Deschamps dan J.M. Labeault (1988). Optimisation of L-lysine production by *Corynebacterium sp.*, In fed-batch cultures. *Biotechnol Letters*, 8, 583-586
- Minihane, B.J. dan D.E. Brown (1986). Fed-batch culture technology. *Biotech. Adv.*, 4, 207-218
- Rogers, P.L., R.G. Cail, D.F. Midgley dan C. Fryer (1986). The prospects for L-lysine production in Australia. *Food Technol. Australia*, 38, 514-518
- Satiawihardja, B. (1990). Kinetics of L-lysine Production by a Fluoropyruvate Sensitive Strain of *Brevibacterium lactofermentum*. PhD Thesis. Department of Biotechnology The University of New South Wales
- Stanbury, A. dan A. Whitaker (1984). *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press. Sydney.
- Whitaker, A. 91980). Fed-batch culture. *Proc. Biochem.*, 15, 10-15
- Yamane, T. dan S. Shimizu (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. In *Advances in Biochemical Bioengineering/Biotechnology*, A. Fiechter (ed). Springer-Verlag, 30, 147-194