

PRODUKSI L-LISIN OLEH GALUR MUTAN *Corynebacterium glutamicum* DENGAN MEMANFAATKAN MOLASE

L-LYSINE PRODUCTION BY MUTANT STRAINS OF *Corynebacterium glutamicum* USING MOLASSES

Budiatman Satiawihardja¹, Erliza Noor², dan Ahmad Haryo Oktamto³

¹ Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta-IPB

² Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fateta-IPB

³ Alumni Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fateta-IPB

ABSTRACT

The objective of this study was to obtain fermentation process for producing L-lysine using two mutants of *Corynebacterium glutamicum*. The process used a low cost natural raw material molasses as a carbon source which underwent a special treatment before its application for fermentation medium. Strain *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 produced higher L-lysine as compared to *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513. ATCC strain 21543 produced using a 10.98 g/l L-lysine modified basal B medium containing molasses which was equivalent to 20% of original molasses in terms of its sugar content.

PENDAHULUAN

L-lisin adalah salah satu asam amino esensial yang diperlukan oleh tubuh manusia maupun hewan. Kebanyakan pakan berbasis sumber pati seperti umbi-umbian atau serelia kekurangan asam amino L-lisin. Keseimbangan kandungan asam amino merupakan salah satu indikator nilai gizi pakan maupun pangan (Satiawihardja, 1994).

Teknologi fermentasi menghasilkan L-lisin sebagai suplemen asam amino pada bahan pangan maupun pakan telah mengalami kemajuan. Ada bahan pangan, L-lisin dapat ditambahkan pada roti untuk meningkatkan nilai gizinya. Selain itu L-lisin juga dipergunakan sebagai suplemen pada pakan di beberapa negara maju seperti Jepang, Australia dan Taiwan. Keuntungannya L-lisin dapat meningkatkan bobot dari hewan ternak seperti kambing dan ayam. Sementara itu di Indonesia, L-lisin belum banyak diaplikasikan sebagai suplementasi pada bahan pangan maupun pakan. Oleh karena itu teknologi proses produksi L-lisin dalam skala industri pada saat ini menggunakan sintesis secara mikrobiyal atau teknologi fermentasi. Secara mikrobiyal, bakteri yang biasa digunakan adalah *Corynebacterium sp* dan *Brevibacterium sp* (Nakayama, 1973). Untuk meningkatkan produksi L-lisin telah banyak digunakan perbaikan sifat genetik dari bakteri tersebut dengan manipulasi metabolisme dan rekayasa genetika (Nakayama, 1985). Selain itu untuk meningkatkan produksi L-lisin secara komersial telah pula digunakan sumber karbon dan nitrogen yang murah dan mencukupi untuk pertumbuhan bakteri (Inuzuka, et al., 1981). Salah satu sumber karbon yang berpotensi adalah molase yang diperoleh limbah industri pengolahan gula.

Molase telah digunakan sebagai sumber karbon dalam fermentasi asam amino seperti asam

L-glutamat, L-triptofan, L-fenil-alinin, dan L-lisin (Satiawihardja, 1992). Akan tetapi penggunaan molase sebagai sumber karbon perlu mengalami perlakuan pendahuluan sebelum digunakan, karena masih mengandung logam-logam berat seperti Pb dan As.

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan salah satu limbah industri pengolahan gula yaitu molase sebagai sumber karbon dan memilih galur unggul penghasil L-lisin yaitu *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 atau *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Medium kultivasi yang digunakan adalah Nutrien Agar (NA), Nutrien Broth (NB), Medium Kaya (MK), Medium Basal A dan Medium Basal B. Komposisi dari medium kultivasi adalah sebagai berikut :

Medium Kaya : Glukosa 10 g/l, pepton 10 g/l, yeast ekstrak 10 g/l dan NaCl 2,5 g/l

Medium Basal A : Glukosa 100-200 g/l; CaCl₂ · 2H₂O 1 g/l; (NH₄)₂SO₄ 20 g/l; MgSO₄ · 7H₂O 0,4 g/l; NaCl 0,05 g/l; FeSO₄ · 7H₂O 0,01 g/l; MnSO₄ · H₂O 0,01 g/l; L-serine 0,1 g/l; biotin 500 µg/l; thiamin · HCl 200 µg/l; yeast ekstrak 1 g/l, pepton 1 g/l; KH₂PO₄ 0,5 g/l; dan K₂HPO₄ 0,5 g/l (Satiawihardja, 1990)

Medium Basal B : Glukosa 100-150 g/l; MgSO₄ · 7H₂O 1 g/l; FeSO₄ · 7H₂O 0,01 g/l; KH₂PO₄ 1 g/l; MnSO₄ · 7H₂O 0,01 g/l; nicotinamid 0,5 g/l; biotin 500 µg/l; thiamin · HCl 200 µg/l; pepton 15 g/l dan (NH₄)₂SO₄ 40 g/l (Shiratsuchi et al., 1995)

Medium Modifikasi Basal B : Molase 20 % (b/v), KH₂PO₄ 1 g/l, Pepton 10 g/l, (NH₄)₂SO₄ 20 g/l, nicotinamid 0,5 g/l, thiamin · HCl 200 µg/l, biotin 500 µg/l.

Galur mikroba yang digunakan adalah *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 (Hom⁻, Leu⁻, Pen^r) dan *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 (Hom⁻, Leu⁻ dan AEC^r) dari American Type Culture Collection (Amerika).

Sedangkan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah fermentor Biostat-M kapasitas 2 liter, Spektrotometer (merk Shimadzu), Sentrifuse (merk Eppendorf), Sentrifuse (merk Hettich), autoklaf (merk ALP), orbital shaker (merk orbit shaker), pH meter, vortex dan alat-alat gelas.

Metode Penelitian

Pada percobaan pendahuluan dilakukan proses fermentasi pada labu erlenmeyer untuk menentukan medium basal terbaik, selanjutnya hasil terbaik ini diproduksi pada fermentor 2 liter. Produksi L-lisin dilakukan dengan menggunakan dua basal medium yaitu medium basal A dan medium Basal B dengan konsentrasi glukosa yang berbeda yaitu 50 g/l dan 100 g/l. Selanjutnya digunakan molase pada konsentrasi 10 dan 20% (b/v).

Produksi L-lisin dalam labu erlenmeyer

Medium Kaya yang digunakan ditetapkan pH nya+7 sebelum dilakukan proses sterilisasi. Sebanyak 10 ml medium yang ditempatkan pada labu erlenmeyer 250 ml, diinokulasi dengan koloni bakteri yang berasal dari agar miring NA dengan jarum ose sebanyak dua loop. Kemudian diinkubasi selama 1 hari (24 jam) pada shaker orbital dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C.

Sebanyak 5 ml inokulum diinokulasikan ke dalam medium yang berisi medium basal A atau B sejumlah 50 ml dalam erlenmeyer 500 ml. Medium basal telah ditetapkan pH + 7 sebelum sterilisasi dan telah diberikan CaCO₃ sebanyak 1% dari medium. Kemudian diinkubasi dengan menggunakan shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C. Pengambilan sampel sebanyak 4 ml dilakukan setiap 24 jam sekali yaitu pada jam ke 0,24,48, dan 72. Pada setiap sampling dilakukan pemeriksaan terhadap pH agar pertumbuhan bakteri tetap optimum. Bila pH kurang dari 7 maka dilakukan penambahan NH₄OH 10 %.

Produksi L-lisin dalam Fermentor Biostat - M 2L

Medium berasal dari Medium Kaya sebanyak 10 ml dalam labu erlenmeyer 250 ml yang telah ditetapkan pada pH+7 sebelum sterilisasi, diinokulasi dengan koloni bakteri yang berasal dari agar miring dengan jarum ose sebanyak dua loop. Kemudian diinkubasi selama 1 hari pada shaker orbital dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C. Inokulum sejumlah 5 ml diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 500 ml yang berisi medium basal sebanyak 50 ml. Inokulum kedua merupakan basal medium A atau B berbasis glukosa 50 g/l yang telah ditetapkan pH + 7 dan ditambahkan dengan CaCO₃ sebanyak 10 % dari inokulum. Inokulum kedua diinkubasi selama 2 hari

(48 jam) pada shaker orbital dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C. Setelah dua hari maka inokulum dapat diinokulasikan ke dalam fermentor. Sebanyak 100 ml inokulum diinokulasikan ke dalam fermentor yang berisi medium sebanyak 1,1 liter dan telah diatur kondisi optimumnya yaitu pada pH 7 dan suhu 30°C. Kecepatan agitasi pada 12 jam pertama adalah 300 rpm kemudian ditingkatkan kecepatan agitasinya secara teratur sampai mencapai 600 rpm. Fermentasi dilakukan selama 4 hari (96 jam). Pada setiap jam tertentu dilakukan pengambilan sampel pada fermentor secara aseptis.

Analisis

Analisis yang dilakukan selama fermentasi adalah analisis L-lisin (Chinard dan Work, 1957), glukosa (Miller, 1959), biomassa (Satiawihardja, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi galur penghasil L-lisin

Seleksi galur dalam labu

Hasil seleksi yang dilakukan terhadap galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 pada medium Basal A dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Parameter bioproses produksi L-lisin oleh galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 dalam medium basal A

Glukosa awal	Galur	L-lisin HCL (g/l)	Y_{ps} (g/g)
50	ATCC 21513	8.4	0.246
	ATCC 21543	10.49	0.251
100	ATCC 21513	8.77	0.222
	ATCC 21543	10.40	0.228

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa penggunaan medium basal A sebagai medium produksi L-lisin oleh *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 memproduksi L-lisin yang tidak berbeda jauh.

Konsentrasi glukosa tidak berpengaruh banyak terhadap peningkatan produksi L-lisin yang dihasilkan oleh bakteri, karena pada konsentrasi glukosa awal 100 g/l masih tersisa banyak glukosa pada akhir proses fermentasi. Dengan kadar glukosa yang tinggi yaitu 100 g/l maka diharapkan L-lisin yang dihasilkan akan bertambah sesuai dengan kenaikan substrat. Hal ini mungkin disebabkan karena medium basal A tidak sesuai dengan bakteri yang digunakan. Medium basal A tidak mengandung cukup nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya terutama kandungan asam aminonya. Produksi L-lisin dengan menggunakan mutan penghasil L-lisin membutuhkan L-leusin dalam jumlah tertentu. Terutama untuk mutan memiliki sifat genetik leusin auksotrof seperti *Corynebacterium glutamicum*

ATCC 21513 dan ATCC 21543. Menurut Inuzuka et al., (1976), penambahan kaldu leusin yang berasal dari mutan penghasil leusin dapat meningkatkan produksi leusin yang dihasilkan. Medium basal A tidak mengandung leusin yang cukup karena jumlah pepton yang ditambahkan hanya 1 g/l. Pepton merupakan sumber asam amino yang ditambahkan pada medium basal A. Oleh karena *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 tidak dapat menghasilkan L-lisin secara optimal.

Parameter bioproses galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 dalam medium basal B dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Parameter bioproses produksi L-lisin oleh galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 dalam medium basal B

Glukosa awal	Galur	L-lisin HCl (g/l)	$Y_{p/s}$ (g/g)
50	ATCC 21513	19.04	0.751
	ATCC 21543	19.59	0.672
100	ATCC 21513	21.13	0.303
	ATCC 21543	11.46	0.184

Produksi L-lisin oleh *Corynebacterium glutamicum* pada medium Basal B menunjukkan kenaikan yang cukup tinggi dibandingkan dengan medium Basal A. Sehingga medium ini dipilih dalam memproduksi L-lisin.

Optimasi Produksi L-lisin Dalam Fermentor 2 L

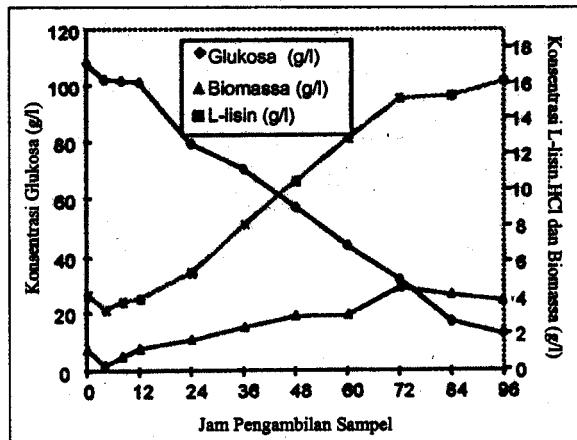
Fermentasi untuk memproduksi L-lisin dalam fermentor dilakukan secara batch. Pada tahap ini digunakan fermentor dengan skala produksi 2 liter. Sumber karbon yang digunakan masih glukosa. Produksi L-lisin oleh galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 dalam fermentor dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Parameter bioproses produksi L-lisin oleh galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 dan ATCC 21543 dalam medium fermentor 2 L

Glukosa awal	Galur	L-lisin HCl (g/l)	$Y_{p/s}$ (g/g)
115	ATCC 21513	5.74	0.061
108	ATCC 21543	16.06	0.169

Pada fermentasi ini dapat dilihat bahwa galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 dalam fermentor memproduksi L-lisin dengan konsentrasi 16.06 g/l ($Y_{p/s} = 0.169$ g/g) lebih tinggi dibandingkan dengan *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513. Dengan demikian dapat diambil kesimpulan bahwa galur yang akan digunakan dalam produksi L-lisin menggunakan molase adalah *Corynebacterium*

glutamicum ATCC 21543. Profil bioproses galur ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Profil bioproses galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 menggunakan medium basal B berbasis glukosa 108 g/l didalam fermentor 2 L.

Fermentasi dengan sumber karbon molase Penentuan konsentrasi molase

Sebagai sumber karbon dalam fermentasi L-lisin, maka perlu diketahui terlebih dahulu konsentrasi molase yang baik untuk pertumbuhan bakteri. Pemilihan konsentrasi yang sesuai dilakukan terlebih dahulu dalam labu untuk menentukan pada konsentrasi dimana L-lisin dihasilkan lebih tinggi.

Medium basal yang digunakan dalam fermentasi ini adalah medium modifikasi Basal B yang dibuat berdasarkan perlakuan molase yang telah dilakukan Ratnaningsih (1997). Perlakuan molase yang dilakukan untuk mengurangi kandungan logam berat yang terdapat pada molase.

Fermentasi dalam labu menggunakan medium basal B dengan konsentrasi 10 dan 20 % (b/v). Fermentasi dilakukan selama 72 jam.

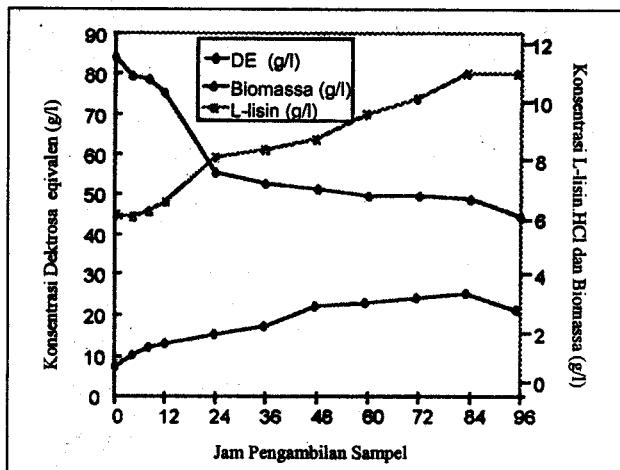
Tabel 4. Parameter bioproses produksi L-lisin oleh galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 menggunakan konsentrasi molase 10 dan 20 % (b/v).

Konsentrasi molase	L-lisin.HCl (g/l)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{p/x}$ g/g
10 %	8.96	0.588	2.987
20 %	11.21	0.429	3.705

Dengan membandingkan parameter bioproses produksi L-lisin oleh *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543, maka konsentrasi molase yang akan digunakan dalam proses fermentasi adalah konsentrasi 20 % (b/v).

Optimasi Produksi L-lisin Menggunakan Molase Dalam fermentor 2 L

Hasil dari penentuan konsentrasi molase akan digunakan dalam fermentor untuk melihat profil bioproses dari penggunaan molase. Medium yang digunakan adalah medium modifikasi basal B. Proses fermentasi dilakukan selama 96 jam. Profil bioproses galur ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Profil bioproses galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 menggunakan medium modifikasi basal B dengan konsentrasi molase 20% (b/v) dalam fermentor 2L.

Setelah fermentasi selama 96 jam dihasilkan L-lisin dengan konsentrasi 10.98 g/l, dengan parameter $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$ dan produktivitas masing-masing adalah 0.205 g/g, 3.950 g/g dan 0.114 g/l/j. Dengan gula yang masih tersisa adalah 44.33 g/l. Produksi L-lisin yang dihasilkan lebih rendah dari pada penggunaan dengan glukosa yang menghasilkan L-lisin sebanyak 16.06 g/l. Hal ini mungkin disebabkan kandungan sukrosa yang tinggi dalam molase tidak dapat langsung difermentasi oleh bakteri.

Kemungkinan bakteri tidak memiliki cukup enzim invertase yang dapat mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Menurut Satiawihardja (1990), penggunaan sukrosa sebagai sumber karbon dalam fermentasi L-lisin menghasilkan yield dan produktivitas yang rendah dibandingkan dengan glukosa.

KESIMPULAN

Galur *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21543 (*Hom*⁻, *Leu*⁻ dan *AEC*^r) dipilih untuk memproduksi L-lisin karena hasilnya lebih tinggi dari pada *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 (*Hom*⁻, *Leu*^r, *Pen*^r). Galur ini dapat memproduksi L-lisin dengan konsentrasi 11.46 g/l ($Y_{p/s} = 0.184$) dan 16.06 g/l ($Y_{p/s} = 0.169$) untuk produksi dalam labu dan fermentor 2L.

Molase dapat dipergunakan sebagai sumber karbon dalam memproduksi L-lisin dengan hasil yang lebih rendah daripada glukosa. Produk L-lisin yang dihasilkan adalah 11.21 g/l ($Y_{p/s} = 0.429$) dan 10.98 g/l ($Y_{p/s} = 0.276$) untuk produksi dalam labu dan fermentor 2L.

DAFTAR PUSTAKA

- Chinard, F.P. 1952. Photometric estimation of prolin and Ornithine. J. Biol. Chem, 199 : 91-95
- Inuzuka, K., dan Hamada, S. 1976. Process for the Production of L-lysine. U.S. Patent No 3,959,075.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem, 31 : 426 -428.
- Nakayama, K., Sagamihara dan Araki. 1973. Process for producing L-lysine. U.S. Patent No. 3,708,395.
- Nakayama, K. 1985. Lysine. Didalam : Blanch, W.H., Drew, S. dan Wang C.I.D.(ed). Comprehensive Biotechnology , The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology Industry, Agriculture and Medicine, hal 607. Pergamon Press Ltd, England.
- Ratnaningsih. 1997. Proses perlakuan terhadap molases sebagai medium kultivasi untuk produksi L-lisin, Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB
- Satiawihardja, B. 1990. Kinetics of L-lysine Productions by a Fluoropyruvat Sensitive Strain of *Brevibacterium lactofermentum*. PhD Thesis. Department of Biotechnology University of NSW, Sydney, Australia.
- Satiawihardja, B. 1992. dasar-dasar Biosintesis Asam-Asam Amino PAU Bioteknologi, IPB
- Satiawihardja, B. 1994. Menyingkap potensi bioagroindustri domestik untuk memproduksi konsentrat pakan Lisin sebagai produk pakan gaya baru. Agrotek, 1(2) : 4 -9.
- Siratsuchi, M., Kuronuma, H., Kawahara, Y., Yoshihara, Y., Harafumi, M. dan Nakamori, S. 1995. Simultaneous and high fermentative production of Lysine and Glutamic Acid using a strain *Brevibacterium Lactofermentum*. Bio. Schi, Biotech, Biochem., 59(1):83-86.
- Work, E. 1957. Reaction of ninhydrin in acid solution with straigth chain amino acids containing two amino groups and its application to the estimation of a-e-diaminopimelic acid. Biochem. J. 67:416-423.