

# PENGARUH LIMITASI NUTRIEN PADA FERMENTASI ASAM SITRAT BIAK-RENDAM, SECARA 2-TAHAP DENGAN *Aspergillus niger* ATCC 11414

Milono Poesponegoro<sup>1)</sup> dan Oei Ban Liang<sup>2)</sup>

1) Puslitbang Kimia Terapan - LIPI, Jl. Cisu-Sangkuriang, Bandung

2) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganeca 10, Bandung

## INTISARI

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan jenis nutrisi dan tingkat limitasinya untuk merangsang akumulasi asam sitrat yang tinggi oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414. Penelitian mencakup percobaan laboratorium untuk mempelajari pengaruh konsentrasi substrat, limitasi nutrisi dan pengaruh konsentrasi miselium kapang pada akumulasi asam sitrat.

Fermentasi asam sitrat dilakukan dengan proses 2-tahap, dimana tahap pertumbuhan kapang dan tahap produksi asam sitrat dilakukan secara terpisah, dengan teknik labu-kocok atau dengan fermentor bejana-aduk. Proses fermentasi diikuti dengan jalan memantau perubahan yang terjadi di dalam medium untuk nilai pH, konsentrasi gula-pereduksi total, biomassa dan asam sitrat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa limitasi nutrisi menghambat pertumbuhan selular kapang, dan dapat menjadi faktor yang sangat penting dalam merangsang akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414. Didapatkan, limitasi fosfor merupakan faktor yang paling efektif dalam merangsang akumulasi asam sitrat, daripada limitasi nutrisi lainnya yang diuji. Penelitian ini juga menunjukkan adanya hubungan yang erat antara limitasi fosfor, konsentrasi miselium kapang dengan efisiensi produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414.

## ABSTRACT

The aim of the study was to determine the type and level of nutrient limitation for stimulation of citric acid accumulation by *Aspergillus niger* ATCC 11414. The study focused on the effects of substrate concentration, nutrient limitation and the concentration of pre-cultured mycelium on citric acid accumulation.

Citric acid fermentation was carried out by a 2-stage process, where the growth stage and citric acid production stage were done separately, either using shake-flask culture or stirred fermenter method. The fermentation process was followed by monitoring the changes in the pH value and in the concentrations of total reducing sugars, cellular biomass, and citric acid in the culture medium.

Results of the study showed that nutrient limitation inhibited the growth of mould and could be an important factor for stimulation of citric acid accumulation by *Aspergillus niger* ATCC 11414. Phosphorous limitation was found to be the most effective than the limitation of other nutrients tested, for stimulation of citric acid accumulation. The results also revealed that there was a relationship between phosphorous limitation, mycelium concentration and the efficiency of citric acid production by *Aspergillus niger* ATCC 11414.

## PENDAHULUAN

Penelitian fermentasi asam sitrat telah banyak dilakukan, akan tetapi fermentasi asam sitrat dianggap masih merupakan proses yang problematik karena dipengaruhi oleh banyak variabel yang pada saat ini tidak selalu dapat dikendalikan secara akurat, sehingga sering diperoleh hasil asam sitrat yang rendah. Hal ini mungkin disebabkan karena mekanisme regulasi dan faktor-faktor esensial yang mengontrol akumulasi asam sitrat di dalam *Aspergillus niger* masih belum diketahui dengan jelas [2, 3].

Fermentasi asam sitrat diketahui sangat sensitif terhadap perubahan dalam komposisi medium [4, 5, 6], dan pengaruh tersebut menjadi sangat menonjol di dalam proses fermentasi asam sitrat secara biak-rendam [3]. Kebutuhan *Aspergillus niger* terhadap fosfor, elemen-runut, dan nutrisi lainnya untuk merangsang akumulasi asam sitrat yang optimal sangat bervariasi [2]. Medium tetes-tebu yang mengandung lebih sedikit fosfat (0.07 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) telah dilaporkan dapat merangsang akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414 pada fermentasi dengan proses 1-tahap [7].

Pengaruh kondisi nutrisi pada akumulasi asam sitrat perlu diteliti untuk galur yang digunakan. Dicapainya kondisi limitasi nutrisi yang tepat, memungkinkan diperolehnya akumulasi asam sitrat yang tinggi oleh kapang *Aspergillus niger*. Jika kondisi untuk produksi asam sitrat optimum berbeda dari kondisi optimum untuk pertumbuhan selular *Aspergillus niger* [2, 3, 8, 9], maka fermentasi asam sitrat dapat dilakukan dengan proses 2-tahap. Dengan fermentasi 2-tahap, pengaruh negatif pH awal medium yang rendah (kurang dari 3.0) pada fasa pertumbuhan *Aspergillus niger* dapat dihindari [7].

Di dalam tulisan ini dilaporkan hasil-hasil penelitian fermentasi asam sitrat secara biak-rendam yang telah dilakukan dengan kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414, pada medium racik-kimia (*chemically defined medium*). Tujuan penelitian ini terutama adalah untuk menentukan jenis nutrisi dan tingkat limitasinya untuk merangsang akumulasi asam sitrat yang tinggi. Fermentasi asam sitrat dilakukan secara biak-rendam dengan proses 2-tahap, dimana tahap-pertumbuhan dan tahap produksi asam sitrat masing-masing dilakukan secara terpisah, dengan teknik labu-kocok atau dengan metoda bejana-aduk.

Di dalam penelitian ini telah dipelajari pengaruh konsentrasi substrat, pengaruh limitasi nutrisi, serta pengaruh konsentrasi miselium kapang pada akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414.

## BAHAN DAN METODA

### Bahan kimia dan Organisme

Bahan-bahan kimia dengan mutu "pro-analisis", dan air bebas mineral (derajat resistensi 10 - 18 Megaohm-cm) telah digunakan dalam penelitian ini.

Organisme yang digunakan adalah kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414. Pembiakan dan pemeliharaan kapang dilakukan pada agar-miring dengan medium "Potato Dextrose Agar" (PDA) dari Difco Laboratories. Biak agar-miring hasil pembiakan (7 hari, 30°C) disimpan pada 4°C selama 1 - 2 bulan, sebelum dibiakkan kembali.

Suspensi spora kapang untuk inokulasi dibuat dengan menggunakan larutan 0.005% Tween-80 steril. Konsentrasi spora ditentukan dengan hemasitometer di bawah mikroskop. Inokulasi dengan suspensi spora ini dilakukan sebanyak  $10^3$  spora per-liter medium.

### Medium racik-kimia

**Medium-glukosa C:** Komposisi medium ini terdiri dari: glukosa (50 g/l), ammonium nitrat (1.5 g/l), potasium dihidrogen-fosfat (1.2 g/l), magnesium sulfat hepta-hidrat (0.5 g/l), ion-tembaga (5 ppm), besi (5 ppm), seng (5 ppm), dan mangan (5 ppb).

**Medium-pertumbuhan (medium G2):** Komposisi medium ini terdiri dari: glukosa (50 g/l), ammonium nitrat (2.06 g/l), potasium dihidrogen-fosfat (1.2 g/l), magnesium sulfat hepta-hidrat (0.5 g/l), ion-tembaga (5 ppm), besi (25 ppm), seng (25 ppm), dan mangan (25 ppb).

**Medium-fermentasi:** Komposisi medium-fermentasi yang digunakan pada fermentasi asam sitrat 2-tahap dalam penelitian ini, disajikan pada Tabel 1.

### Sterilisasi

Sterilisasi dengan otoklaf tegak dilakukan pada 121°C selama 15 menit untuk medium, atau selama 20 menit untuk alat fermentor.

### Fermentasi asam sitrat biak-rendam

Fermentasi asam sitrat dilakukan secara biak-rendam dengan proses 2-tahap. Tahap pertumbuhan kapang dilakukan dengan medium- pertumbuhan G2 yang mengandung 5% glukosa [10], pada 30°C selama 4 hari, kecuali dinyatakan lain. Miselium pra-biak yang diperoleh kemudian digunakan dalam tahap produksi asam sitrat, yang prosesnya dilakukan selama 7 hari pada 30°C, dengan medium- fermentasi yang mengandung 14% glukosa.

Fermentasi asam sitrat secara labu-kocok dikerjakan dengan Erlenmeyer 300-ml yang berisi 50 ml medium cair, pada goyangan-orbital 200 rpm. Fermentasi dengan bejana-aduk dikerjakan pada fermentor EYELA M-160, dengan 2.5 liter medium cair, laju aduk 700 rpm, dan aerasi 1 vvm.

Setelah disaring, miselium pra-biak dari medium-pertumbuhan G2, dicuci dengan medium-fermentasi yang akan digunakan, kemudian dikisatkan sebelum ditanamkan kedalam medium-fermentasi. Semua pekerjaan yang berkaitan dengan penyaringan, pencucian dan inokulasi dilakukan secara septis di dalam ruangan steril "laminar flow".

### Pengamatan hasil percobaan

Fermentasi asam sitrat dilakukan dengan dua replikasi, kecuali dinyatakan lain. Pada setiap inkubasi, disertakan satu set labu yang berisi medium tanpa diinokulasi, sebagai kontrol. Proses fermentasi diikuti dengan cara memantau perubahan yang terjadi di dalam cairan medium, terutama untuk nilai pH, konsentrasi gula-pereduksi total, konsentrasi biomassa kapang, dan konsentrasi asam sitrat.

Contoh cairan medium masing-masing disaring dengan krus gelas masir (ukuran No.3) guna memisahkan biomassa kapang dari cairan mediumnya.

Penetapan kadar biomassa dilakukan dengan jalan penim-

Tabel 1. Komposisi medium-glukosa yang diuji sebagai medium-fermentasi untuk fermentasi asam sitrat biak-rendam dengan proses 2-tahap, secara labu-kocok.

Nutrien		Macam medium-fermentasi								
		GO	GN	GP	GMg	GCu	GFe	GZn	GP+	GCu+
Glukosa,	g/l	150	150	150	150	150	150	150	150	150
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ,	g/l	2.06	0.41	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	g/l	0.55	0.55	0.11	0.55	0.55	0.55	0.55	1.10	0.55
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O,	g/l	0.50	0.50	0.50	0.10	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Ion Cu <sup>2+</sup> ,	ppb	50	50	50	50	5	50	50	50	250
Ion Fe <sup>2+</sup> ,	ppb	30	30	30	30	30	3	30	30	30
Ion Zn <sup>2+</sup> ,	ppb	20	20	20	20	20	20	2	20	20
Ion Mn <sup>2+</sup> ,	ppb	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Ion Mo <sup>6+</sup> ,	ppb	10	10	10	10	10	10	10	10	10

bangun setelah miselium dikeringkan semalam pada 105°C di dalam oven pengering. Biomassa terlebih dahulu dicuci berturut-turut satu kali dengan 1 volum/volum air bebas mineral, satu kali dengan 1 volum/volum larutan 0.1 mol/l NaCl [11], dan kemudian dibilas satu kali dengan 1 volum/volum air bebas mineral.

Penetapan konsentrasi gula-pereduksi total ditentukan dengan metoda Shaeffer-Somogyi dari AOAC [12], setelah dilakukan "inversi" dengan HCl [13] terhadap cairan contoh yang dianalisis.

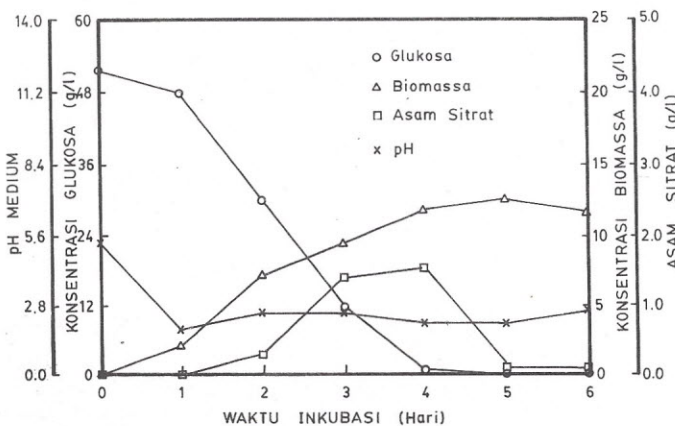
Sedangkan penetapan konsentrasi asam sitrat dilakukan dengan metoda kromatografi cair berkemampuan tinggi (HPLC), dengan menggunakan kolom  $\mu$  Bondapak, detektor dengan indeks refraksi 8 kali, serta larutan penyangga 2% (b/v)  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (pH 2.4 - 2.8). Penetapan dilakukan pada laju alir fase-gerak (metanol) 0.5 - 1.0 ml per-menit, dengan tekanan di dalam sistem 600 - 6000 psi. Sebelum disuntikkan pada alat HPLC, cairan contoh disaring terlebih dahulu dengan filter Sepak C<sub>18</sub> dari Waters.

## HASIL DAN DISKUSI

Dalam penelitian ini fermentasi asam sitrat telah dipelajari dengan menggunakan medium racik-kimia. Medium racik-kimia mudah dibuat dan mudah dikontrol komposisinya, sehingga cocok untuk digunakan dalam meneliti pengaruh nutrisi pada fermentasi asam sitrat.

### Pengaruh konsentrasi substrat pada fermentasi asam sitrat

Hasil pada Gambar 1 menunjukkan bahwa selama pertumbuhannya pada medium-glukosa C *Aspergillus niger* ATCC 11414 menghasilkan asam sitrat. Meskipun hasil asam sitrat di dalam medium yang mengandung 5% glukosa ini sangat rendah, pola perubahan konsentrasinya sangat menarik karena pada saat glukosa sudah tidak lagi tersedia di dalam medium, asam sitrat yang terakumulasi dikonsumsi kembali oleh kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414. Penggunaan kembali asam sitrat ternyata dapat dicegah apabila ke dalam medium dibubuhkan glukosa (Gambar 2).

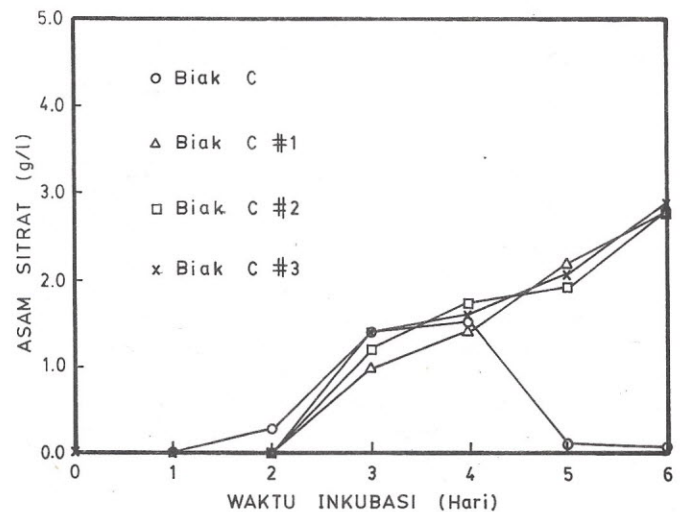


Gambar 1. Perubahan kimia selama kultivasi *Aspergillus niger* ATCC 11414 pada medium glukosa (medium C).

Pembubuhan glukosa steril ke dalam biak *Aspergillus niger* ATCC 11414 (6 - 9 g per 50ml biak) pada hari kedua inkubasi dapat mencegah penurunan konsentrasi asam sitrat di dalam medium, sehingga konsentrasi asam sitrat yang terakumulasi

terus meningkat sesudahnya. Perbedaan dalam pembubuhan glukosa hingga mencapai konsentrasi 140 - 190 g/l di dalam medium, ternyata menghasilkan laju produksi spesifik asam sitrat yang hampir tak berbeda.

Pembubuhan glukosa hingga diperoleh konsentrasi akhir 141 g/l, 164 g/l dan 189 g/l, masing-masing menghasilkan asam sitrat dengan laju produksi spesifik 57 mg/g/hari, 53 mg/g/hari dan 55 mg/g/hari. Jika laju produksi spesifik tersebut merupakan indikator aktivitas metabolik miselium kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414 dalam memproduksi asam sitrat, berarti kemampuan kapang untuk memproduksi asam sitrat tidak terpengaruh oleh perbedaan konsentrasi glukosa di dalam medium dalam range 140 - 190 g/l tersebut. Hasil percobaan fermentasi dengan medium tetes- tetu [7] mengungkapkan bahwa konsentrasi gula-pereduksi total 15 - 20% adalah optimum untuk produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414.



Gambar 2. Pengaruh penambahan glukosa pada produksi asam sitrat, dalam kultivasi *Aspergillus niger* ATCC 11414 pada medium glukosa (medium C).

Biak C, biak tanpa penambahan glukosa; Biak C #1, biak dengan tambahan glukosa hingga konsentrasi akhir 141 g/l; Biak C #2, biak dengan tambahan glukosa hingga konsentrasi akhir 164 g/l; Biak C #3, biak dengan tambahan glukosa hingga konsentrasi akhir 189 g/l, pada hari ke-2 inkubasi.

Dari hasil tersebut disarankan bahwa konsentrasi substrat di dalam medium perlu di jaga tidak turun di bawah tingkat minimal (sekitar 1 g/l), agar asam sitrat yang terakumulasi tidak dikonsumsi kembali oleh kapang.

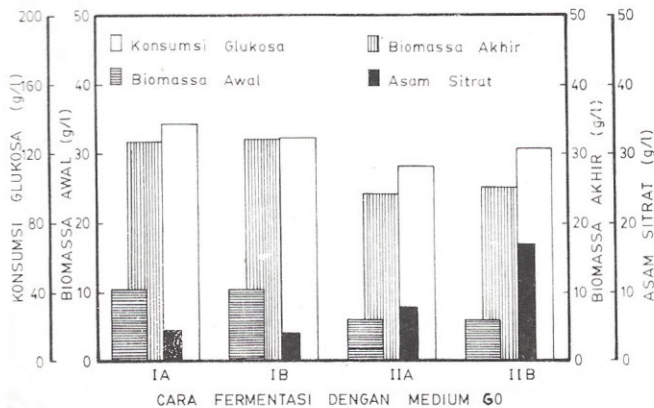
### Pengaruh limitasi nutrisi pada fermentasi asam sitrat

Nutrien yang limitasinya telah dilaporkan mempunyai pengaruh positif dalam merangsang akumulasi asam sitrat adalah: elemen-runut [14, 15, 16], fosfor [5, 17, 18, 19], dan nitrogen [20, 21]. Tingkat optimum limitasi suatu nutrisi untuk akumulasi asam sitrat sangat bervariasi karena ditentukan oleh galur kapang dan tingkat limitasi nutrisi lainnya di dalam medium [22]. Oleh karena itu kondisi optimum tersebut perlu ditentukan untuk setiap galur yang digunakan.

Hasil pada Gambar 3 memperlihatkan bahwa fermentasi asam sitrat 2-tahap pada medium fermentasi GO memberikan hasil asam sitrat yang rendah, baik pada pH awal 5.0 maupun 2.0. Produksi biomassa yang tinggi (21.1 - 21.5 g/l) dengan kon-

sumsi glukosa yang tinggi (139 - 147 g/l), memberi petunjuk bahwa kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414 tidak mengalami limitasi nutrisi sebagaimana yang diharapkan.

Perlakuan kultivasi miselium pra-biak dengan medium H selama 1 hari pada 30°C, ternyata menyebabkan fermentasi pada medium GO dapat menghasilkan produksi asam sitrat yang lebih tinggi, terutama pada pH 2.0 (16.95 g/l setelah 7 hari fermentasi). Percobaan yang sama dengan miselium pra-biak yang tidak mengalami perlakuan kultivasi dengan medium H hanya menghasilkan asam sitrat sebesar 4.08 - 4.53 g/l.



Gambar 3. Pengaruh cara fermentasi pada hasil fermentasi asam sitrat dari glukosa secara 2-tahap, dengan medium fermentasi GO. IA, fermentasi dilakukan pada pH awal 5 serta dengan miselium pra-biak tanpa perlakuan kultivasi dengan medium H; IB, sama seperti pada IA tetapi dengan pH awal 2; IIA, fermentasi dilakukan pada pH awal 5 serta dengan miselium pra-biak yang telah mengalami perlakuan kultivasi dengan medium H; IIB, sama seperti pada IIA akan tetapi dengan pH awal 2.

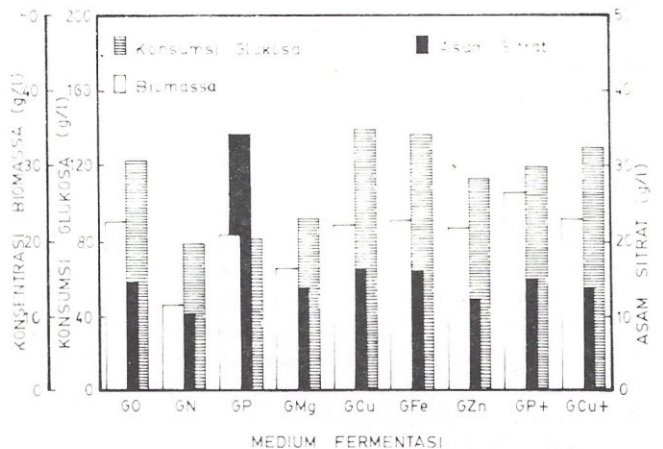
Hal ini diduga erat kaitannya dengan penggunaan sisa-sisa mineral yang terbawa dari medium-pertumbuhan G2 oleh kapang selama perlakuan tersebut. Akibatnya medium GO dapat terjaga komposisinya, sehingga limitasi nutrisi dapat terjadi. Medium H adalah medium yang hanya mengandung larutan 5% glukosa, tanpa mineral. Kultivasi selama 1 hari pada 30°C dengan medium H menyebabkan miselium kapang meningkat dari 3.7 g/l menjadi 6.0 g/l, dan hanya sedikit bertambah sesudahnya.

Berdasarkan hasil fermentasi asam sitrat pada medium GO ini, kemudian dipelajari pengaruh limitasi berbagai nutrisi pada akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414. Nutrien yang dipelajari pengaruh limitasinya adalah nitrogen (medium GN), fosfor (medium GP), magnesium (medium GMg), ion tembaga (medium GCu), ion besi (medium GFe), dan ion seng (medium GZn). Komposisi media fermentasi yang digunakan tersebut disajikan pada Tabel 1.

Tabel 2 dan Gambar 4 menunjukkan bahwa limitasi fosfor (medium GP) merupakan faktor yang paling efektif dalam merangsang akumulasi asam sitrat. Medium GP dengan limitasi fosfor (0.11 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) memberikan produksi asam sitrat yang lebih tinggi daripada yang diperoleh dari medium GO ataupun dari medium fermentasi dengan limitasi nutrisi lain yang diuji.

Laporan dari Lockwood [17] serta Shu and Johnson [18, 5] juga menunjukkan pentingnya peranan limitasi fosfor untuk akumulasi asam sitrat. Meskipun demikian, terdapat anggapan

dikalangan peneliti [22, 17, 9, 3] bahwa pengaruh limitasi fosfor hanya efektif apabila konsentrasi elemen-runut di dalam medium fermentasi berada pada tingkat yang berlebihan.



Gambar 4. Hasil fermentasi asam sitrat dari glukosa dengan proses 2-tahap, pada berbagai medium-fermentasi.

Sebagaimana ditunjukkan oleh hasil penelitian pada Tabel 2 dan Gambar 4, limitasi nutrisi dengan konsentrasi elemen-runut hingga sepersepuluh dari tingkat yang ada di dalam medium GO (Tabel 1) ternyata tidak memberikan hasil asam sitrat yang tinggi, meskipun konsentrasi elemen-runut tersebut berada di bawah tingkat optimum yang disarankan dalam kepustakaan [2, 3].

Laporan dalam kepustakaan [17] yang menyatakan bahwa penggunaan ion tembaga dalam konsentrasi yang tinggi (sebagai antagonis terhadap ion besi) dapat merangsang akumulasi asam sitrat, tidak terbukti dalam penelitian ini. Peningkatan konsentrasi ion tembaga dari 50 ppb menjadi 250 ppb (medium GCu+) tidak meningkatkan hasil asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414. Demikian pula peningkatan fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) hingga menjadi 1.10 g/l (medium GP+) hanya merangsang pertumbuhan *Aspergillus niger* ATCC 11414 tanpa meningkatkan hasil asam sitrat yang diperoleh.

Limitasi fosfor (0.11 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) menyebabkan pertumbuhan *Aspergillus niger* ATCC 11414 terhambat (14.6 g/l biomassa), tetapi merangsang akumulasi asam sitrat (34.2 g/l) dengan laju produksi spesifik 1633 mg/g. Fosfor juga dilaporkan mempunyai pengaruh yang besar pada metabolisme kapang [23, 24].

Restriksi pertumbuhan kapang ternyata bukan merupakan kondisi yang esensial untuk merangsang akumulasi asam sitrat, karena restriksi pertumbuhan *Aspergillus niger* ATCC 11414 akibat adanya limitasi nitrogen (medium GN) maupun limitasi magnesium (medium GMg) tidak merangsang akumulasi asam sitrat.

Hasil penelitian ini mendukung konsep defisiensi fosfat dari Molliard-Perquin [17] yang menekankan pentingnya limitasi fosfor dalam merangsang akumulasi asam-asam organik oleh *Aspergillus niger*. Konsep defisiensi fosfat juga telah diterapkan oleh Szucs [19] pada proses yang telah dipatenkan untuk produksi asam sitrat.

#### Pengaruh konsentrasi miselium kapang pada fermentasi asam sitrat 2-tahap

Medium GP kemudian digunakan untuk meneliti pengaruh konsentrasi miselium *Aspergillus niger* ATCC 11414, mengingat

Tabel 2. Hasil fermentasi asam sitrat dari glukosa secara biak- rendam dengan proses 2-tahap, pada berbagai medium- fermentasi dengan *Aspergillus niger* ATCC 11414

Macam medium-fermentasi	pH Medium		Konsentrasi gula tersisa, (g/l)		Biomassa (g/l)		Produksi asam sitrat (g/l)	Efisiensi produksi asam sitrat		
	Awal	Akir	Awal	Akhir	Awal	Akhir		Y <sub>p</sub>	dP/X	
	GO	4.70	1.70	166.25	43.76	5.17	22.64	17.47	14.61	0.119
GN	5.15	1.70	155.08	75.78	4.16	11.81	7.65	10.56	0.133	894.2
GP	4.5	1.70	155.70	74.16	6.34	20.96	14.62	34.23	0.420	1633.1
GMg	5.10	1.65	156.32	63.95	5.17	16.65	11.48	13.84	0.150	809.6
GCu	5.00	1.70	167.49	27.95	4.89	22.28	17.39	16.39	0.117	735.6
GFe	5.15	1.75	168.19	32.05	4.63	22.88	18.25	16.31	0.120	712.9
GZn	5.15	1.85	143.03	29.62	4.63	21.91	17.28	12.22	0.108	557.7
GP+	5.95	2.00	155.70	36.52	5.20	26.47	21.27	15.03	0.126	567.7
GCu+	5.05	1.75	156.20	26.80	4.18	23.05	18.87	14.01	0.108	607.8

**Keterangan:**

- 1) Data merupakan hasil rata-rata dari percobaan fermentasi dengan 3 replikasi;
- 2) Y<sub>p</sub>, produksi asam sitrat per-unit gula yang dikonsumsi (g/g); dP/X, produksi asam sitrat per-unit biomassa (mg/g)

bahwa asam sitrat merupakan produk dari miselium kapang. Kepustakaan [2, 25] menunjukkan adanya hubungan langsung antara berat kering miselium kapang dan produksi asam sitrat, baik pada fermentasi asam sitrat dengan proses 1-tahap maupun 2-tahap.

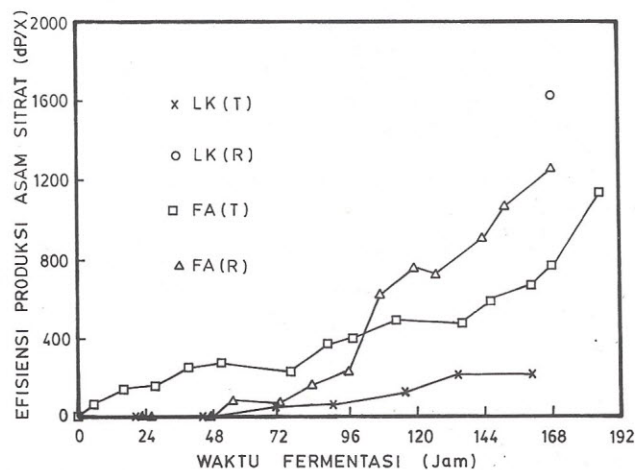
Sebagaimana diperlihatkan oleh Gambar 5, fermentasi asam sitrat dengan miselium pra-biak yang tinggi (lebih dari 10 g/l) cenderung menurunkan efisiensi pembentukan asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414, terutama untuk fermentasi yang dilakukan dengan labu kocok. Untuk fermentasi dengan konsentrasi awal miselium yang rendah (6.3 g/l) diperoleh asam sitrat 34.2 g/l setelah 7 hari fermentasi (30°C). Pada kondisi yang sama, fermentasi dengan konsentrasi awal miselium yang tinggi (18.0 g/l) hanya diperoleh asam sitrat 9.9 g/l. Hasil penelitian menunjukkan bahwa miselium yang banyak tidak selalu memberikan hasil asam sitrat yang tinggi.

Laju produksi asam sitrat spesifik dilaporkan mencapai harga maksimum pada konsentrasi miselium kapang sekitar 9 - 12 g/l [2]. Peningkatan konsentrasi biomassa kapang dapat menyebabkan menurunnya tingkat oksigen terlarut [26], dan berkurangnya laju absorpsi oksigen oleh mikroorganisme [2, 27, 28] di dalam medium, berkenaan dengan meningkatnya viskositas medium.

Sebagaimana ditunjukkan oleh hasil penelitian ini, perbedaan hasil asam sitrat berkenaan dengan adanya perbedaan dalam tingkat miselium awal yang digunakan, ternyata jauh lebih kecil pada fermentasi dengan bejana-aduk. Hal ini mungkin disebabkan karena fermentasi dengan fermentor bejana-aduk mempunyai aerasi yang lebih baik, daripada fermentasi dengan labu-kocok.

Hasil penelitian ini mengungkapkkan bahwa pengaruh positif limitasi fosfor pada akumulasi asam sitrat hanya efektif untuk tingkat konsentrasi oksigen terlarut yang tinggi. Karow and Waksman [14] serta Shu and Johnson [18] juga menunjukkan bahwa oksigen merupakan faktor pembatas untuk akumulasi asam sitrat.

Tampaknya fosfor dan oksigen terlarut di dalam medium secara bersama-sama mempunyai peranan amat penting yang terkait pada mekanisme pengendali akumulasi asam sitrat di dalam *Aspergillus niger*. Oksigen terlarut juga telah ditemukan oleh Uchida dkk. [29] mempunyai kaitan dengan peranan fosfor pada produksi antibiotika *maridomycin* oleh *Streptomyces*.



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi awal miselium pra-biak pada efisiensi produksi asam sitrat secara 2-tahap, dengan medium-fermentasi GP.

dP/X, produksi asam sitrat per-unit biomassa; LK(R), fermentasi pada labu-kocok dengan konsentrasi awal miselium pra-biak yang rendah (6.34 g/l); LK(T), fermentasi pada labu-kocok dengan konsentrasi awal miselium pra-biak yang tinggi (17.98 g/l); FA(R), fermentasi pada fermentor bejana-aduk dengan konsentrasi awal miselium pra-biak yang rendah (4.70 g/l); FA(T), fermentasi pada fermentor bejana-aduk dengan konsentrasi miselium pra-biak yang tinggi (18.93 g/l).

## KESIMPULAN

1. Asam sitrat yang terakumulasi cenderung dikonsumsi kembali oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414, kecuali apabila glukosa masih cukup tersedia di dalam medium.
2. Limitasi nutrisi menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414.
3. Hambatan pertumbuhan kapang dapat merangsang akumulasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 11414. Akan tetapi pengaruh positif hambatan pertumbuhan kapang pada akumulasi asam sitrat juga sangat ditentukan oleh macam dan konsentrasi nutrisi di dalam medium.
4. Limitasi fosfor merupakan faktor yang paling efektif dalam merangsang akumulasi asam sitrat.
5. Terdapat hubungan yang erat antara limitasi fosfor, konsentrasi miselium kapang, dengan efisiensi produksi asam sitrat oleh kapang *Aspergillus niger* ATCC 11414.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Milono Poesponegoro, Disertasi untuk Doktor, Institut Teknologi Bandung, Bandung, (1990).
2. Berry, D.R., A.R. Chmiel, and Z. Al Obaidi, "Citric acid production by *Aspergillus niger*", In "Genetics and physiology of *Aspergillus*" (Eds. J.E. Smith, and J.A. Patten), Academic Press, London, 1977, 405 - 426.
3. Kubicek, C. and M. Rohr, "Citric acid fermentation", *CRC Critical reviews in Biotech.* 3 : 331 - 374 (1968).
4. Ramakrishnan, C.V., R. Steel and C.P. Lentz, "Mechanism of citric acid formation and accumulation in *Aspergillus niger*", *Arch. Biochem. Biophys.* 55 : 270 - 273 (1955).
5. Shu, P. and M.J. Johnson, "The interdependence of medium constituents in citric acid production by sub-merged fermentation", *J. Bacteriol.* 56 : 577 - 585 (1948b).
6. Trumpy, B.H. and N.F. Millis, "Nutritional requirements of an *Aspergillus niger* mutant for citric acid production", *J. Gen. Microbiol.* 30 : 381 - 393 (1963).
7. Milono Poesponegoro dan Oei Ban Liang, "Fermentasi asam sitrat dari tetes-tebu, secara biak-rendam dengan *Aspergillus niger*", (Belum diterbitkan).
8. Kiel, H., K. Guvrin and Y. Henis, "Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* on low sugar concentrations and cotton waste", *Appl. Environment. Microbiol.* 42 : 1 - 4 (1981).
9. Rohr, M., C.P. Kubicek, and J. Kominek, "Citric acid", in "Biotechnology" Vol.3, (Ed. H. Dellweg), Verlag-Chemie, Weinheim, 1983, Chapter 3d.
10. Milono Poesponegoro and Oei Ban Liang, "Effects of trace metals and medium composition on the growth of *Aspergillus niger* ATCC 11414, in a submerged culture", (Belum diterbitkan).
11. Rohr, M., O. Zehentgruber and C.P. Kubicek, "Kinetics of biomass and citric acid production by *Aspergillus niger* on a pilot plant scale", *Biotech. Bioeng.* 1981.
12. American Official of Agricultural Chemists (AOAC), "Official Methods of Analysis of The Association of Official Agricultural Chemists" (Ed. W. Horwitz), 12<sup>th</sup> ed., A.O.A.C., Washington, 1975, pp. 574 - 575.
13. Vogel, I., "Elementary Practical Organic Chemistry", Part. 3: Quantitative Organic Analysis, 2<sup>nd</sup> ed., Longman Group Limited, London, 1958, Chapter 27.
14. Karow, E.O. and S.A. Waksman, "Production of citric acid in submerged culture", *Ind. Eng. Chem.* 39 : 821-825 (1974).
15. Choudhary, A.Q. and S.J. Pirt, "The influence of metal complexing agents on citric acid production by *Aspergillus niger*", *J. Gen. Microbiol.* 43 : 71-81 (1966).
16. Snell, R.L. and L.B. Schweiger, "Production of citric acid by fermentation", *U.S. Patent* No.2,492,667 (1949).
17. Lockwood, L.B., "Production of organic acids by fermentation", in "Microbial Technology", vol II (Eds. H.J. Pepler and D. Perlman), 2<sup>nd</sup> Ed., Chapter 11,
18. Shu, P. and M.J. Johnson, "Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*", *Ind. Eng. Chem.* 40 : 1202 - 1205 (1948a).
19. Szucs, J., "Citric acid production by fermentation", *U.S. Patent* No. 2,353,771 (1944).
20. Kristiansen, B. and C.G. Sinclair, "Production of citric acid in batch culture", *Bioetch. Bioeng.* 20 : 1711 - 1722 (1978).
21. Kristiansen, B. and C.G. Sinclair, "Production of citric acid in continuous culture", *Biotech. Bioeng.* 21 : 297 - 315 (1979).
22. Johnson, M.J., "The citric acid fermentation", in *Industrial fermentations*, vol.I (Eds. L.A. Underkofler and R.J. Hickey), Chemical Publishing Co Inc., New York, 1954, Chapter 13.
23. Beever, R.E. and D.J.W. Burns, "Phosphorous uptake, storage and utilization by fungi", *Adv. Botanic. Res.* 8 : 127 - 190 (1980).
24. Weinberg, E.D., "Biosynthesis of secondary metabolites. Role of trace metals", *Adv. Microbiol. Physiol.* 4 : 1 - 44 (1970).
25. Rohr, M. and C.P. Kubicek, "Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*", *Process Biochem.* 44 : 34-37 (1981).
26. Millis, N.F., "Physiological response to DOT", in "Microbial Physiology and Genetics of Processes" (Eds. N.F. Millis, and A.J. Pittard), University of Melbourne, Melbourne, 1982c, Chapter 8.
27. Brierley, N.R. and R. Steel, "Agitation-aeration in submerged fermentation. Part II. Effect of disperse phase on oxygen absorption in fermentation", *Applied Microbiol* 7 : 57 - 61 (1959).
28. Chain, E.B., P. Guelandi, and G. Morissi, "Aeration studies. Part IV", *Biotech. Bioeng.* 8 : 595 - 613 (1966).
29. Uchida, M., H. Sawada, T. Asai and M. Suzuki, "Effect of inorganic phosphate and dissolved oxygen on production of maridomycin", *J. Ferm. Technol.* 59 : 30 - 401 (1981).