



Studi Pengaruh Konsentrasi Glukosadan Laju Aerasi terhadap Produksi Asam Glukonat oleh *Aspergillus niger*

Akbarningrum Fatmawati

Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Surabaya

*E-mail: akbarningrum@staff.ubaya.ac.id

Abstract

Chemical production through fermentation offers advantage in the safe condition used. One of such useful chemical products is gluconic acid, which can be produced by mold *Aspergillus niger*. This chemical is an interesting product and has various applications. This research studied the effect of initial glucose concentration and aeration rate on the growth of *Aspergillus niger* FNCC 6098 and its gluconic acid production through fermentation in a batch reactor. The reaction temperature and pH was controlled at 30°C and 6.5, respectively. Initial glucose concentration was varied as 150, 200 and 250 g/L while aeration rate was varied as 1.5, 2, and 2.5 vvm. The concentration of the mold mycelium, gluconic acid product and remaining glucose substrate are presented as function of time. The result of varying initial glucose concentration at fixed aeration showed that the 200 g/L glucose produced the highest yield of gluconic acid. Meanwhile the highest yield of gluconic acid at fixed initial glucose concentration was resulted at aeration rate of 2 vvm.

Keywords: Fermentation, Gluconic Acid, *Aspergillus niger*

Pendahuluan

Asam glukonat merupakan salah satu zat kimia yang penting dan memiliki banyak aplikasi seperti pada industri makanan dan minuman, pakan hewan, deterjen, farmasi, pengolahan kulit serta semen (Mukhopadhyay dkk, 2005; Ramachandran dkk, 2006; Ma dkk, 2015; Zhang dkk, 2016). Bahkan asam glukonat dapat digunakan untuk memproduksi surfaktan (Abert dkk, 2002). Kegunaan yang luas ini terkait dengan sifat-sifatnya antara lain tidak korosif, tidak volatile, tidak toksik dan merupakan *chelating agent* yang lebih kuat daripada EDTA. Selain itu rasanya asam yang menyegarkan. Asam ini dihasilkan dari oksidasi grup aldehida pada glukosa menjadi grup karboksilat (Ramachandran dkk, 2006). Oksidasi glukosa menjadi asam glukonat dapat dijalankan secara kimiamenggunakan katalis logam seperti Au, Pt dan Pd (Abbadi dan Bekkum, 1995; Onda dkk 2011; Witónska dkk 2011; Komanoya dkk 2013; Deng dkk 2014; Sakurai dkk 2015; Eblagon dkk 2016; Zhang dkk, 2016), elektrokimia (Bin dkk 2014) maupun secara biokimia baik menggunakan katalis enzim maupun sel yang disebut dengan metode fermentasi. Gabungan metode elektrokimia dan enzimatis juga telah dilakukan (Varničić dkk 2015).

Fermentasi merupakan proses yang telah dipraktikkan secara alamiah sejak sebelum masehi terutama untuk makanan dan minuman. Proses biokimia ini telah dilakukan dari skala kecil sampai besar untuk menghasilkan berbagai zat kimia yang sangat berguna bagi kehidupan sehari-hari mulai dari bahan makanan atau minuman, pelarut, pupuk sampai bahan bakar serta plastic yang mudah terurai di lingkungan. Mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi glukosa menjadi asam glukonat bervariasi dari bakteri dan kapang. Mikroorganisme yang telah dilaporkan dapat menghasilkan asam glukonat melalui fermentasi glukosa tersebut antara lain *Gluconobacter oxydans* (Velizarov dan Beschkov, 1998;), *Zymomonas mobilis* (Silveira dkk, 1999), *Acetobacter* (Mounir dkk, 2016) serta *Aspergillus niger* (Sankpal dkk, 1999; Sankpal dan Kulkarni, 2002; Klein dkk, 2003; Liu dkk, 2003; Znad dkk, 2004; Ikeda dkk, 2006; Sharma dkk 2008; Zhang dkk, 2016). Crognale dkk (2008) menggunakan *Penicillium variable* untuk memproduksi asam glukonat dengan fermentasi glukosa secara fed-batch. Mikroorganisme yang digunakan tersebut bisa dalam bentuk sel bebas maupun terimobilisasi. Fermentasi menggunakan enzim glucose oxidase terimobilisasi dalam reactor air-lift juga telah dilakukan (Nakao dkk, 1997).

Oksidasi glukosa menjadi asam glukonat melalui proses fermentasi tampaknya lebih menguntungkan dilihat dari kondisi proses yang lebih aman serta lebih ekonomis. Fermentasi glukosa menjadi asam glukonat sangat aerobic oleh sebab itu laju aerasi sangat mempengaruhi. Pada penelitian ini dipelajari pengaruh konsentrasi awal asam glukonat dan laju aerasi dalam kinerja fermentasi glukosa menjadi asam glukonat secara aerobic.





Metode Penelitian

Mikroorganisme dan Persiapan Inokulum

Produksi asam glukonat dari glukosa pada penelitian ini menggunakan kapang *Aspergillus niger* FNCC 6098 yang diperoleh dari PAU UGM. Kapang dibiakkan dalam media *potato dextrose agar* (PDA) steril, diinkubasi pada suhu 30°C selama 4 hari selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C. Inokulum fermentasi didapatkan dengan menumbuhkan kapang biakan dalam media sintesis steril yang mengandung glukosa 150 g/liter, KCl 0,25 g/liter, KH₂PO₄ 0,25 g/liter, MgSO₄·7H₂O 0,25 g/liter, Ca(NO₃)₂·4H₂O 1 g/liter, (NH₄)₂SO₄ 0,59 g/liter, yeast extract 3 g/liter, peptone 2 g/liter (Znad, dkk, 2004). Sterilisasi media garam dilakukan terpisah dari larutan glukosa. Sterilisasi media garam dilakukan pada 121°C sedangkan larutan glukosa pada suhu 105°C. Pertumbuhan inokulum dilakukan secara aerobik dengan melakukan penggoyangan di atas shaker dengan kecepatan 120 rpm.

Fermentasi

Produksi asam glukonat dilakukan pada fermenter berpengaduk mekanik *aplikon Bio Console ADI 1025* dengan volume total 1,25 liter. Pengendalian kondisi selama fermentasi menggunakan *Bio Controller ADI 1010*. Dalam penelitian ini, fermentasi dilakukan dua tahap yaitu tahap *growth* dan *non-growth* serta dua variasi yaitu variasi konsentrasi glukosa awal pada tahap *non-growth* dan variasi laju aerasi.

Pada variasi konsentrasi glukosa awal, kondisi fermentasi *growth* dilakukan dengan pada pH 6,5, suhu 30°C, pengadukan 320 rpm, konsentrasi glukosa 150 g/l dan aerasi 1 vvm (0,9 l/menit) selama 15 jam. Kemudian mycelium yang dihasilkan pada fermentasi *growth* dipisahkan dengan filtrasi membran selulosa nitrat 0,45 μm untuk diinokulasikan pada fermentasi *non-growth*. Fermentasi *non-growth* dilakukan pada pH 5,5 serta kondisi lain yang sama dengan kondisi fermentasi *growth* tetapi konsentrasi glukosa awal divariasi sebesar 150, 200 dan 250 g/l.

Pada variasi laju aerasi, kondisi fermentasi *growth* dilakukan dengan menjaga fermentasi pada pH 6,5, suhu 30°C, pengadukan 320 rpm, konsentrasi glukosa 200 g/l dan aerasi 1 vvm (0,9 l/menit) selama 26 jam. Mycelium dari fermentasi *growth* digunakan untuk inokulasi fermentasi *non-growth*. Fermentasi *non-growth* dilakukan pada pH 5,5 serta kondisi lain yang sama dengan kondisi fermentasi *growth* tetapi laju aerasi divariasi sebesar 1,5; 2,0 dan 2,5 vvm atau 1,35; 1,8 dan 2,25 l/menit.

Analisis

Konsentrasi sel dianalisa menggunakan mengukur berat sel kering per ml sampel. Konsentrasi glukosa dianalisa menggunakan reagen dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959). Konsentrasi asam glukonat dengan reagen enzimatis yang diperoleh dari Megazyme International, Irlandia (no catalog K-GATE). Untuk analisis konsentrasi sel, terlebih dahulu dilakukan pemisahan mycelium dengan filtrasi membran selulosa nitrat 0,45 μm kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam. Konsentrasi glukosa dianalisa dengan mereaksikan glukosa dan DNS kemudian menguji absorbansinya pada spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh Konsentrasi Glukosa Awal

Hasil fermentasi untuk produksi asam glukonat dari glukosa oleh *Aspergillus niger* FNCC 6098 dengan variasi konsentrasi glukosa awal ditampilkan pada Gambar 1 sampai Gambar 2. Pada Gambar 1, konsentrasi glukosa sisa dan konsentrasi sel ditampilkan sebagai fungsi waktu fermentasi. Pada gambar tersebut tampak bahwa konsentrasi glukosa awal sedikit mempengaruhi konsentrasi sel maksimum. Semakin tinggi konsentrasi glukosa awal maka konsentrasi sel maksimum yang dihasilkan juga semakin tinggi. Tetapi dari gambar tampak bahwa fermentasi semakin melambat dengan meningkatnya konsentrasi glukosa awal. Hal ini tampak pada harga laju pertumbuhan spesifik maksimum yang semakin mengecil dengan meningkatnya konsentrasi glukosa awal seperti tampak pada Tabel 1.

Yield sel terhadap substrat glukosa ($Y_{x/s}$) semakin tinggi dengan meningkatnya konsentrasi glukosa awal, tetapi peningkatan ini tidak signifikan bila dibandingkan konsentrasi glukosa awal 200 g/liter dan 250 g/liter. Sedangkan yield asam glukonat terhadap sel ($Y_{p/x}$) tertinggi dicapai pada konsentrasi glukosa awal 200 g/L. Harga laju pertumbuhan maksimum, yield sel terhadap substrat dan yield asam glukonat terhadap sel diperoleh dengan mencocokkan data hasil fermentasi dengan system persamaan differensial berikut (Fatmawati dan Agustriyanto, 2009):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad (1)$$

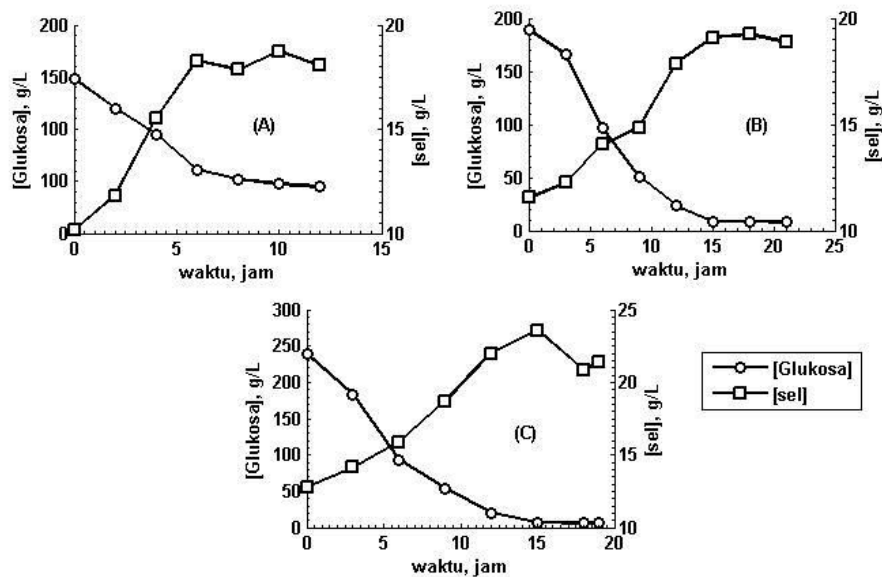


$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (2)$$

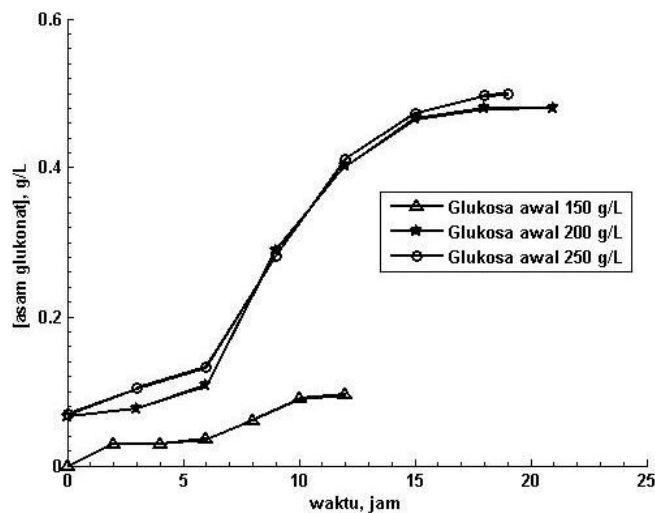
$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} + m_s X \quad (3)$$

Tabel 1. Perbandingan harga parameter fermentasi pada variasi konsentrasi glukosa (Fatmawati dan Agustriyanto, 2009)

Parameter	[Glukosa] awal 150 g/liter	[Glukosa] awal 200 g/liter	[Glukosa] awal 250 g/liter
μ_m	0,3768 1/jam	0,1400 1/jam	0,1626 1/jam
$Y_{x/s}$	0,1015 g/g	0,0416 g/g	0,0425 g/g
$Y_{p/x}$	0,0068 g/g	0,0396 g/g	0,0254 g/g



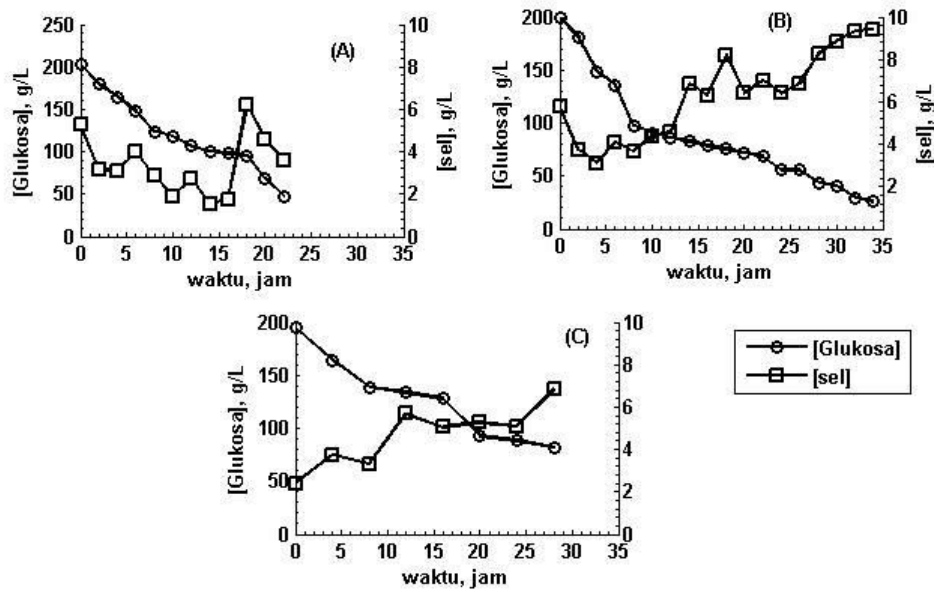
Gambar 1. Konsentrasi glukosa sisa dan sel selama fermentasi dengan variasi konsentrasi glukosa awal (A) Konsentrasi glukosa awal = 150 g/liter (B) Konsentrasi glukosa awal = 200 g/liter (C) Konsentrasi glukosa awal = 250 g/liter



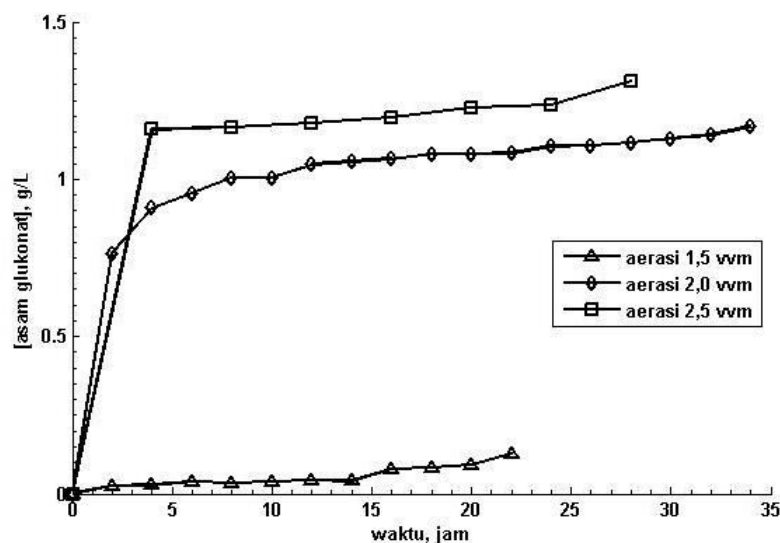
Gambar 2. Konsentrasi asam glukonat pada berbagai variasi konsentrasi glukosa awal

Pengaruh Laju Aerasi

Gambar 3 dan 4 menjelaskan hasil fermentasi glukosa menjadi asam glukonat dengan variasi laju aerasi. Pada fermentasi ini tampak bahwa konsentrasi sel fluktuatif terutama pada laju aerasi yang rendah yaitu 1,5 vvm walaupun memiliki kecenderungan untuk meningkat. Hal ini disebabkan dengan tingginya laju aerasi (> 1 vvm) dan konsentrasi glukosa awal (200 g/L), pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* sangat pesat dan hal ini menyebabkan distribusi sel yang kurang merata di seluruh bagian fermenter. Sedangkan glukosa tetap menurun karena dikonsumsi oleh sel kapang untuk tumbuh dan menghasilkan produk asam glukonat. Pada Gambar 4, terlihat bahwa semakin tinggi laju aerasi pada konsentrasi glukosa awal yang sama, konsentrasi asam glukonat yang dihasilkan juga semakin tinggi.



Gambar 3. Konsentrasi glukosa sisa dan sel selama fermentasi dengan variasi laju aerasi (A) laju aerasi = 1,5 vvm (B) laju aerasi = 2,0 vvm (C) laju aerasi = 2,5 vvm



Gambar 4. Konsentrasi asam glukonat pada berbagai variasi aerasi

Tabel 2 menampilkan harga-harga laju pertumbuhan spesifik (μ), $Y_{x/s}$ serta $Y_{p/x}$ pada laju aerasi yang bervariasi. Harga-harga tersebut diperoleh dari hubungan berikut:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \tag{1}$$

$$Y_{x/s} = - \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (2)$$

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (3)$$

Dapat dilihat di Tabel 2 tersebut bahwa laju pertumbuhan spesifik dan yield sel terhadap substrat ($Y_{x/s}$) meningkat dengan meningkatnya laju aerasi. Sedangkan yield produk terhadap sel tertinggi diperoleh pada laju aerasi 2 vvm. Apabila dibandingkan dengan fermentasi pada laju aerasi rendah (1 vvm) pada Tabel 1, jelas terlihat bahwa yield produk asam glukonat jauh lebih tinggi apabila dilakukan pada laju aerasi yang tinggi.

Tabel 2. Perbandingan harga parameter fermentasi pada variasi laju aerasi

Parameter	Aerasi 1,5 vvm	Aerasi 2,0 vvm	Aerasi 2,5 vvm
μ	0,0092 1/jam	0,02785 1/jam	0,03028 1/jam
$Y_{x/s}$	0,0089 g/g	0,021 g/g	0,0394 g/g
$Y_{p/x}$	0,0882 g/g	0,3199 g/g	0,2957 g/g

Kesimpulan

Dari hasil penelitian terlihat bahwa konsentrasi substrat awal dan laju aerasi mempengaruhi pembentukan asam glukonat. Konsentrasi glukosa awal meningkatkan yield asam glukonat terhadap sel. Penggunaan laju aerasi yang tinggi juga lebih jauh lagi meningkatkan produksi dan yield asam glukonat terhadap sel. Dari variasi kondisi yang dilakukan dalam penelitian ini terlihat bahwa konsentrasi glukosa awal 200 g/L dan laju aerasi 2 vvm menghasilkan yield asam glukonat terhadap sel tertinggi walaupun aerasi 2,5 vvm menghasilkan konsentrasi asam glukonat akhir yang lebih tinggi dalam waktu fermentasi yang sama.

Daftar Notasi

m_s	= koefisien maintenance [1/jam]
P	= konsentrasi produk fermentasi [g/L]
S	= konsentrasi substrat fermentasi [g/L]
t	= waktu fermentasi [jam]
X	= konsentrasi sel [jam]
$Y_{p/x}$	= yield produk fermentasi terhadap sel [g/g]
$Y_{x/s}$	= yield sel terhadap substrat [g/g]
β	= konstanta pembentukan produk non-growth [1/jam]
μ	= laju pertumbuhan spesifik [1/jam]
μ_m	= laju pertumbuhan spesifik maksimum [1/jam]
[asam glukonat]	= konsentrasi asam glukonat [g/L]
[Glukosa]	= konsentrasi glukosa [g/L]
[sel]	= konsentrasi sel [g/L]

Daftar Pustaka

- Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, and Larroche C. Gluconic Acid : Properties , Applications and Microbial Production. Food Technol. Biotechnol. 2006;44(2):185–195.
- Mukhopadhyay R, Chatterjee S, Chatterjee B. P, Banerjee P.C, and Guha A. K. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. Int. Dairy J. 2005; 15(3): 299–303.
- Ikeda Y, Park E. Y, and Okuda N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. 2006; 97(8):1030–1035.
- Znad H, Markoš J, and Baleš V. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: Growth and non-growth conditions. Process Biochem. 2004; 39(11): 1341–1345.
- Velizarov S and Beschkov V. Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: Substrate and product inhibition situations. Process Biochem. 1998; 33(5):527–534.
- Nakao K, Kiefner A, Furumoto K, and Harada T. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. Chem. Eng. Sci. 1997; 52:4127–4133.
- Onda A, Ochi T, and Yanagisawa K. New direct production of gluconic acid from polysaccharides using a bifunctional catalyst in hot water. Catal. Commun. 2011; 12 (6): 421–425.



- Crognale S, Petruccioli M, Fenice M, and Federici F. Fed-batch gluconic acid production from *Penicillium variabile* P16 under different feeding strategies. *Enzyme Microb. Technol.* 2008; 42(5): 445–449.
- Sankpal N. V. and Kulkarni B. D. Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils. *Process Biochem.* 2002; 37(12): 1343–1350.
- Silveira M. M, Wisbeck E, Lemmel C, Erzinger G, Lopes Da Costa J. P, Bertasso M, and Jonas R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 1999; 75(2–3): 99–103.
- Varničić M, Vidaković-Koch T, and Sundmacher K. Gluconic Acid Synthesis in an Electroenzymatic Reactor. *Electrochim. Acta* 2015, 174: 480–487, 2015.
- Sankpal N. V, Joshi A. P, Sutar I. I, and Kulkarni B. D. Continuous production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on a cellulosic support: Study of low pH fermentative behaviour of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 1999, 35(3–4): 317–325.
- Zhang H, Zhang J, and Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresour. Technol.* 2016; 203: 211–219, 2016.
- Ma S, Li W, Zhang S, Ge D, Yu J, Shen, X. Influence of sodium gluconate on the performance and hydration of Portland cement. *Constr. Build. Mater.* 2015; 91: 138–144.
- Abert M, Mora N, Lacombe J M. Synthesis and surface-active properties of a new class of surfactants derived from D-gluconic acid. *Carbohydr. res.* 2002; 337: 997-1006.
- Abadi A, Bekkum H. V. Effect of pH in the Pt-catalyzed oxidation of D-glucose to D-gluconic acid. *J Mol Catal A-Chem.* 1995; 97: 111-118.
- Witńska I, Frajta M, Karski S. Selective oxidation of glucose to gluconic acid over Pd–Te supported catalysts. *Appl. Catal. A-Gen.* 2011; 401: 73– 82.
- Komanoya T, Kobayashi H, Hara K, Chun W. J, Fukuoka A. Simultaneous formation of sorbitol and gluconic acid from cellobiose using carbon-supported ruthenium catalysts. *Journal of Energy Chemistry.* 2013; 22: 290-295.
- Deng W, Zhang Q, Wang Y. Catalytic transformations of cellulose and cellulose-derived carbohydrates into organic acids. *Catal. Today.* 2014; 234: 31-41.
- Sakurai H, Koga K, Kiuchi M. Gold nanoparticles deposited on Amberlyst-15: Metal–acid bifunctional catalyst for cellobiose conversion to gluconic acid. *Catal. Today.* 2015; 251: 96-102.
- Eblagon K.M, Pereira M.F.R, Figueiredo J.L. One-pot oxidation of cellobiose to gluconic acid. Unprecedented highselectivity on bifunctional gold catalysts over mesoporous carbon by integrated texture and surface chemistry optimization. *Appl. Catal. B-Environ.* 2016; 184: 381-396.
- Bin D, Wang H, Li J, Wang H, Yin Z, Kang J, He B, Li Z. Controllable oxidation of glucose to gluconic acid and glucaric acid using an electrocatalytic reactor. *Electrochim Acta.* 2014; 130: 170-178.
- Mounir M, Shafiei R, Zarmehrkhorshid R, Hamouda A, Alaoui M.I, Thonart P. Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *J Biosci. and Bioeng.* 2016; 121(2): 166-171.
- Liu J. Z, Weng L. P, Zhang Q. L, Xu H, and Ji L.N. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* 2003; 14(2): 137–141.





Lembar Tanya Jawab
Moderator : Deddy Hermawan (UPN "Veteran" Yogyakarta)
Notulen : Andri Perdana (UPN "Veteran" Yogyakarta)

1. Penanya : Asifaksa
Pertanyaan : Penggunaan jenis *Aspergillus niger*? PDA mengapa tidak dengan lain?
Jawaban : Berdasarkan literatur, *A. niger* menghasilkan enzim glucose oxidasi paling tinggi. Fokus pada fermentasi gula. Tidak ingin produksi glukoamilasi.

2. Penanya : Deddy Hermawan (UPN "Veteran" Yogyakarta)
Pertanyaan : Penggunaan model matematika ? Penyelesaian menggunakan?
Jawaban : Persamaan digunakan untuk menentukan 3 parameter μ_m , Y_x/S . Y_p/x . Fitting dengan data dan model menggunakan Matlab.

