

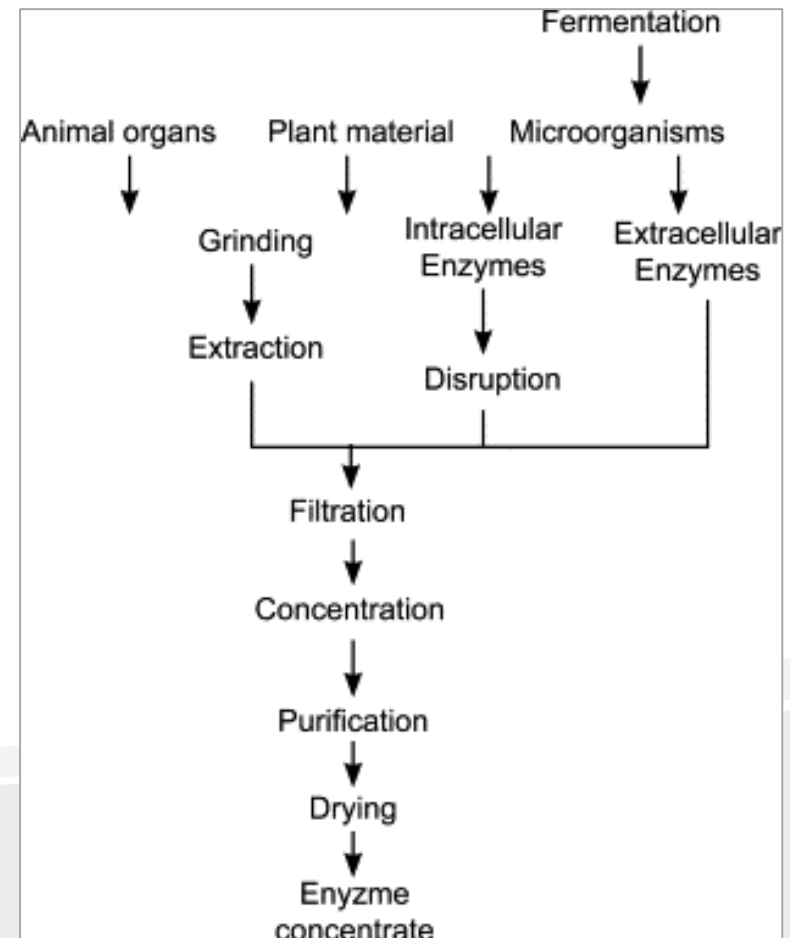


Jenis Substrat Fermentasi, Optimasi Proses, &  
Produksi Metabolit (Protein Sel Tunggal)

**Reza Fadhillah, S. TP, M. Si**

# Deskripsi

- Fermentasi → metabolisme dari enzim mikroba untuk melakukan oksidasi, reduksi, hidrolisis, → terjadi perubahan kimiawi substrat organik → produk
- Proses enzimatik bekerja dalam keadaan ter-isolasi/ dipisahkan dari selnya atau masih terikat dalam sel
- Reaksi enzim bekerja dalam sel (intraselular) dan luar sel (ekstraselular)
- Enzim pemecah makromolekul umum bersifat ekstraselular → diproduksi dalam sel, dikeluarkan dari sel ke substrat di sekelilingnya.
- Contoh: makromolekul pati dipecah amilase → glukosa, masuk ke dalam sel untuk metabolisme sel



## Fermentasi Medium Padat & Cair

- Produk fermentasi → produk fermentasi khamir, produk fermentasi kapang, produk fermentasi bakteri, produk fermentasi campuran
- Jenis medium fermentasi: fermentasi medium padat dan medium cair
- Fermentasi medium padat: fermentasi yang substratnya tidak larut, tidak mengandung air bebas, tapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba.
- Produk hasil fermentasi medium padat: glukosa, etanol, asam sitrat, produk tradisional seperti tempe
- Substrat fermentasi medium padat: biji-bijian sereal, kacang-kacangan, sekam gandum, bahan ↑ lignoselulosa, limbah pertanian
- Limbah pertanian (dedak, ampas kelapa, kulit nanas) → sebagai media karena mengandung karbohidrat ↑ sumber energi mikroba
- Fermentasi tujuan untuk menghasilkan enzim, antibiotik, etanol
- Media merupakan faktor yang mempengaruhi fermentasi oleh mikroba → biomassa, pemeliharaan sel, produk

- Fermentasi media padat → fermentasi yang substratnya tidak larut dan tidak mengandung air bebas tapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba.
- Media berfungsi sebagai sumber karbon, nitrogen, energi
- Dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam (submerged)
- Medium kultur permukaan → medium padat, semi padat, cair
- Medium kultur terendam → medium cair menggunakan bioreaktor
- Contoh: media padat industri berupa jenis hasil pertanian dan limbahnya

## Substrates Used in SSF



Sugar Cane Bagasse



Tea Waste



Wheat Bran



Saw Dust



Apple Pomace



Coconut oil Cake

## Kombucha tea



# Perbedaan Spesifik Fermentasi Medium Padat & Cair

<b>Faktor</b>	<b>Fermentasi media cair</b>	<b>Fermentasi media padat</b>
Substrat	Media cair dengan nutrisi larut air	Media padat dengan nutrisi larut dan tidak larut air
Higienitas kondisi	Harus steril dan aseptis	Tidak harus steril
Konsumsi air	Lebih tinggi	Lebih rendah
Panas yang dihasilkan	Lebih merata	Kurang merata
Penggunaan aerasi buatan	Mutlak	Tidak mutlak
Pengendalian pH	Lebih mudah	Lebih sukar
Pengocokan	Diperlukan	Tidak diperlukan
Konsentrasi produk	Lebih rendah	Lebih tinggi
Homogenitas kultur	Lebih baik	Kurang baik

# Fermentasi Medium Padat Oleh Kapang

- Prosedur fermentasi medium padat mampu  $\uparrow$  kadar protein 2,5  $\rightarrow$  18%
- Sumber nitrogen dan fosfat dibutuhkan kapang dalam jumlah  $\uparrow$  (komponen makromolekul). sumber nitrogen dari urea (ammonium sulfat), sumber fosfat (kalium orto fosfat)
- Kapang butuh unsur N untuk menyusun asam nukleat dan koenzim dalam selnya, dan unsur P untuk menyusun asam nukleat, fosfolipid dan koenzim
- Peran enzim diperlukan untuk mendegradasi komponen-komponen karbohidrat dan lemak, sehingga dapat digunakan mikroba setelah gula habis
- Proses konversi bahan  $\rightarrow$  biomasa sel berprotein pada PST dimulai saat sintesis enzim-enzim yang disekresikan mikroba

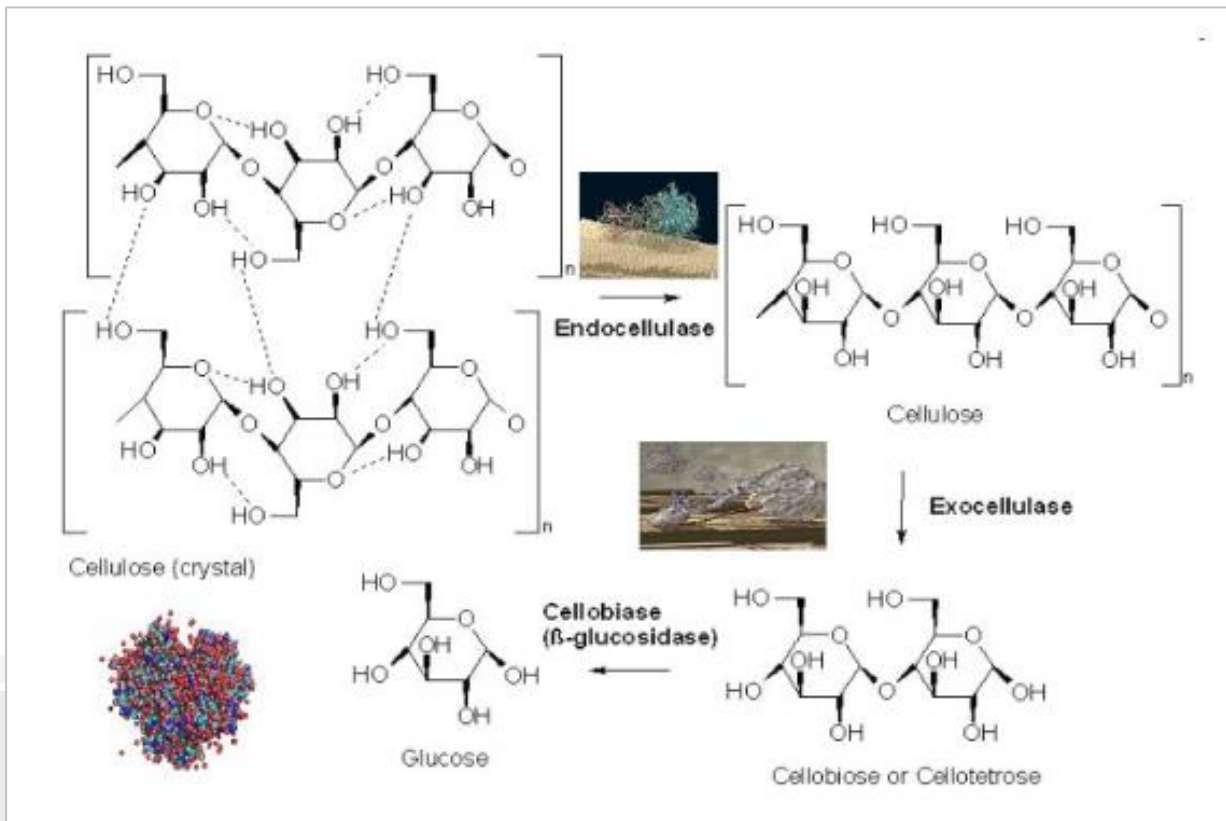
**Average composition of the main groups of micro-organisms  
(% dry weight)**

**TABLE : 1**

	Fungi	Algae	Yeasts	Bacteria
Protein	30-45	40-60	45-55	50-65
Fat	2-8	7-20	2-6	1.5-3.0
Ash	9-14	8-10	5-9.5	3-7
Nucleic Acids	7-10	3-8	6-12	8-12

# Mekanisme Kerja Selulose

- Selulase enzim pendegradasi → selulosa, lipase → lemak, amilase → pati, peroksidase → lignin
- Selulase → tiga enzim:
  - ✓ endo- $\beta$ -1, 4-glucanase (endocellulase/carboxymethyl cellulase/ Cx cellulase)
  - ✓ exo- $\beta$ -1, 4-glucanase (cellobiohydrolase/ avicelase/ C1 cellulase)
  - ✓  $\beta$ -1, 4-glucosidase (cellobiase)



# Pemilihan Mikroba Media Padat

- Mikroba fermentasi media padat: khamir, kapang, bakteri. Kapang paling baik ditumbuhkan pada substrat padat
- Kapang: organisme eukariotik heterotrof, memproduksi seksual dengan cara plasmogami dan karyogami, maupun aseksual dengan menghasilkan spora
- Sifat hidup heterotrof → kapang banyak terdapat dalam bentuk simbiosis dengan organisme lain secara mutualisme maupun parasitisme.
- Kapang memiliki hifa → serabut berdinding sel yang melingkupi sitoplasma, hifa membentuk jaring-jaring → miselium. Pola pertumbuhan hifa kapang mampu menembus dalam media padat

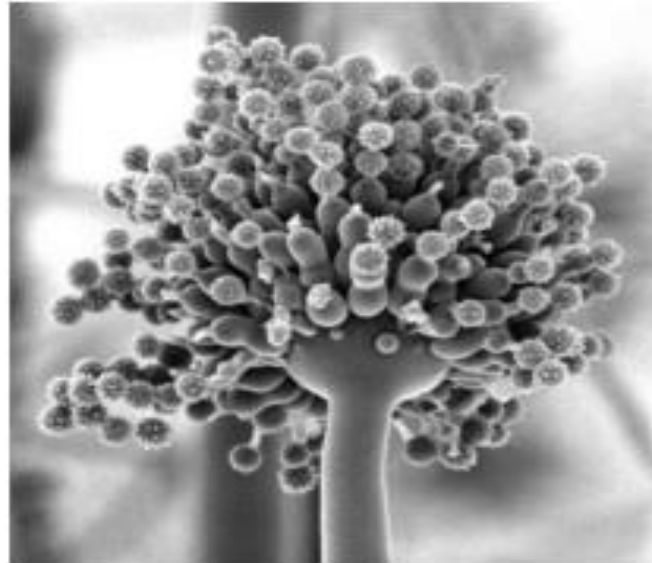


# Pemilihan Mikroba

- Teknik fermentasi media padat: enzim hidrolitik yang disekresikan pada ujung hifa tidak mengalami pengenceran seperti pada fermentasi media cair → sehingga frekuensi interaksi enzim dengan substrat ↑ dan penyebaran enzim menjangkau ke dalam substrat
- Jenis kapang potensi: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, jenis algae: *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus*, *Synechococcus*, *Spirulina*.
- Alasan penggunaan kapang: pertumbuhannya mudah dan cepat, kadar asam nukleat ↓, pertumbuhannya mudah diamati dari serabut

# *Aspergillus niger*

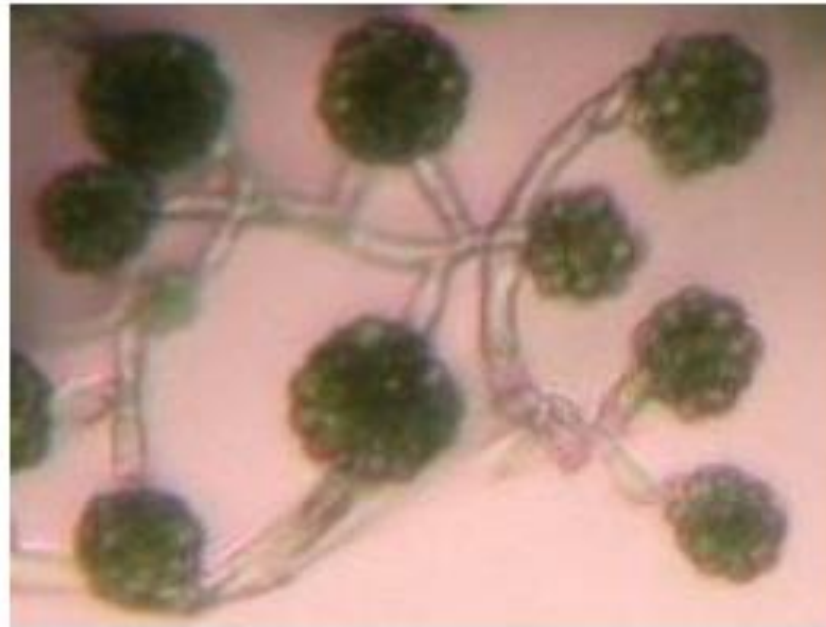
- Kapang anggota genus *Aspergillus*, famili Eurotiaceae, ordo Eutiales, sub-klas Plectomycetidae, kelas Ascomycetes, sub-divisi Ascomycotina, divisi Amastigmycota.
- *A. niger*: punya kepala pembawa konidia besar, bulat, hitam coklat, bagian hifa berseptat, spora bersifat aseksual, tumbuh memanjang di atas stigma, sifat aerobik, mikroba mesofilik suhu 35–37°C, pH 2 – 8,8 (optimum asam)
- *A. niger* → penghasil asam sitrat, aniline, pektinase, selulase,  $\beta$ -1,4-glikan hidrolase, protease,  $\alpha$ -amilase, glukamilase, maltase,  $\beta$ -galaktosidase,  $\alpha$ -glukosidase, asam glukonat, glukosa oksidase, asam oksalat, fosfodiesterase, ribonuklease, pupulan 4-glukonahidrolase,  $\beta$ -xilosidase, xilanase, lipase.



kepala konidia *A. niger*

## *Trichoderma viride*

- Kapang *Trichoderma viride* mampu memanfaatkan selulosa untuk pertumbuhan, karena menghasilkan enzim selulitik.
- *Trichoderma viride* dapat ↑ kadar protein dan daya cerna jerami, ampas kulit nanas.
- Morfologi *Trichoderma viride* tua berwarna hijau terang, konidia saling melekat, terdapat di tanah dan aktif dalam proses amonifikasi dan dekomposisi selulosa, ↑ konsentrasi  $\text{NH}_3$ , pencernaan bahan kering, organik
- suhu optimum pertumbuhan 25–36°C, pH 1.5–9, optimum 5–5.5



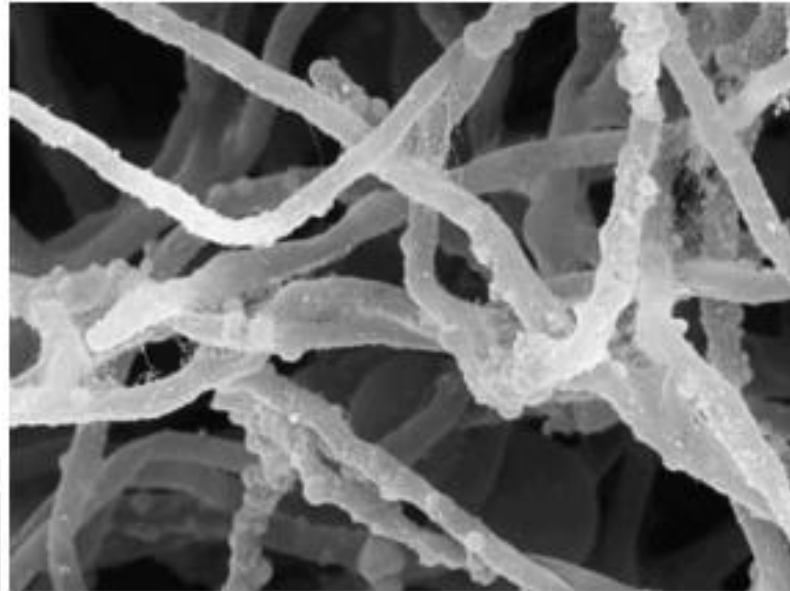
## *Rhizopus Oligosporus*

- *R. oligosporus*: kapang genus Rhizopus, famili mucoraceae, ordo mucorales, sub-divisi zygomycotina, divisi eumycota. Kapang digunakan dalam pembuatan tempe, banyak ditemukan di alam
- *R. oligosporus* → penghasil enzim amilase, lipase, glukamilase, mesophilik, suhu 25–37°C, optimum 30°C
- *R. oligosporus* → ↑ kadar protein kasar (campuran limbah kelapa sawit + hidrolisat tepung kepala udang), 12.74–27.21%, inkubasi enam hari.
- Peningkatan kadar protein ampas tapioka, kondisi optimum pada kadar air substrat 65% dengan pH 6, ↑ kadar protein ampas tapioka 1.06 → 19.63%



## *Phanerochaete chrysosporium*

- *P. chrysosporium*: filum Basidiomycota, divisi basidiomycetes ordo poliprales keluarga Phanerochaetacea genus Phanerochaete, tumbuh membentuk kumpulan miselia, berkembang biak aseksual dengan pembentukkan conidiospore dan basidiospore.
- *P. Chrysosporium* → kapang pelapuk putih, efektif degradasi lignin melalui sekresi peroksidase, optimum pertumbuhan 40°C, pH 4 -7, aerob.
- Kondisi ligninolitik → kapang mengeluarkan enzim peroksidase yang dapat mendegradasi lignin.
- *P. chrysosporium* mengeluarkan enzim hemeperoksidase → lignin peroksidase (LiP) dan mangan peroksidase (MnP)



# Kultur Campuran Sebagai Starter

- Pemilihan jenis kapang didasarkan pada karakteristik substrat yang digunakan:
  - ✓ Kapang amilolitik (penghasil amilase) → substrat berpati (amilosa)
  - ✓ Kapang selulitik (penghasil selulase) → substrat berselulosa
  - ✓ Kapang lignolitik (penghasil Ligninase) → substrat bahan lignoselulosa
- Beberapa jenis kapang dapat mensintesis enzim kompleks, tapi sebagian kapang spesifik pada enzim tertentu.
- *Aspergillus niger* mensekresi enzim yang kompleks → selulase, amilase, xilanase, lipase. *R. oligosporus* → amilase, lipase
- *Trichoderma viride* kapang spesifik dengan sekresi → enzim selulase.
- Penggunaan kultur campuran sebagai starter fermentasi memungkinkan degradasi bahan yang lebih kompleks dan simultan

- Pencampuran jenis kapang sebagai starter diharapkan dapat mendegradasi bahan lebih efektif karena komposisi kimia substrat tidak seragam
- Contoh: komposisi kimia ampas kulit nanas → bahan serat ↑ (lignoselulosa), lemak ↓, pati ↓ (0.72 mg/g BK kulit nanas).
- Penggunaan kultur tunggal → mengakibatkan pertumbuhan sel dan spesifikasi degradasi spesifik pada bahan tertentu → kurang optimal.

# Keuntungan Fermentasi Media Padat

- Menggunakan media alami yang sifatnya tunggal
- Kontrol terhadap kontaminasi relatif mudah
- Persiapan inokulum lebih sederhana
- Kondisi inkubasi hampir menyerupai yang alami
- Aerasi lebih mudah karena banyak ruang antara partikel dan media
- Tingkat produktivitas tinggi
- Biaya murah, kebutuhan energi rendah
- Limbah sedikit dan kontaminasi rendah.



# Fermentasi Media Cair

- Fermentasi media cair → proses fermentasi yang menggunakan media cair yang substratnya terlarut atau terdispersi dalam cairan, mikroba berada di bawah permukaan cairan pada kondisi aerob dengan bantuan aerasi + agitasi
- Keuntungan:
  - ✓ Jenis dan konsentrasi komponen-komponen medium dapat diatur
  - ✓ Kondisi optimum untuk pertumbuhan
  - ✓ Pemakaian medium lebih efisien

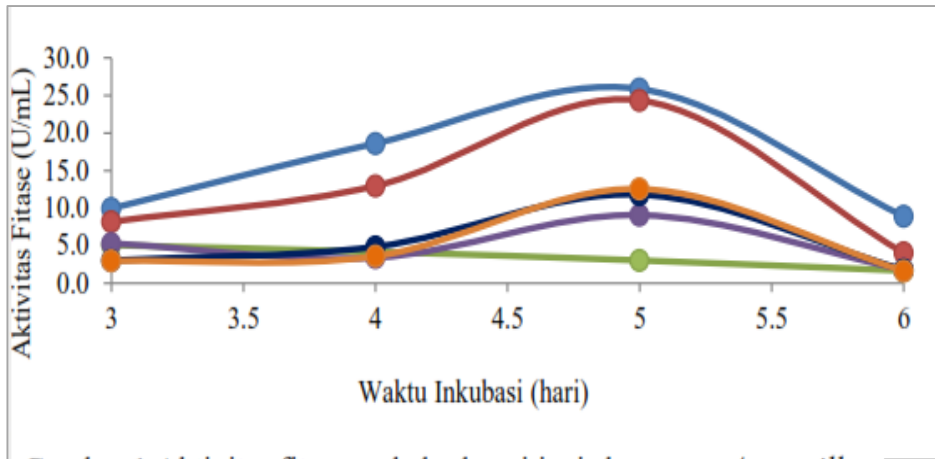
**Example . .**

# Produksi Enzim Fitase

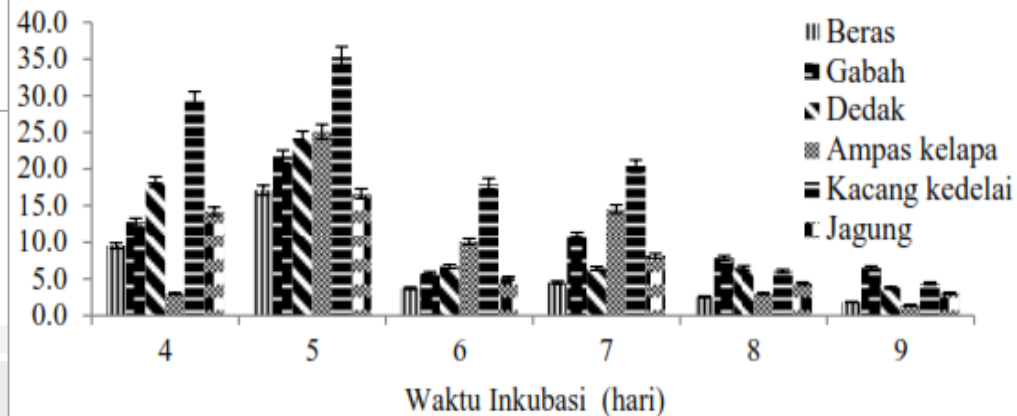
- Fitase → enzim pemecah senyawa fitat menjadi mioinositol dan fosfor anorganik (asam fosfat), terdapat dalam biji-bijian dan pada mikroba
- Mikroba sintesis fitase: *Enterobacter*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*
- Contoh produksi fitase → media padat beras, gabah, dedak, jagung, kedelai, ampas kelapa. Inokulan: *A. Niger*
- Serealia → bahan pakan untuk ternak monogastrik (unggas, ikan, sapi), tapi ↑ asam fitat (mioinositol heksakisfosfat) → mengikat fosfor, asam amino, mineral (Ca, Fe, Zn dan Mg)
- Karena tidak ada enzim fitase pada alat pencernaan, menyebabkan unsur fosfat ↓, → produktivitas ternak ↓, pertumbuhan ternak terhambat

# Produksi Fitase

- Hasil penelitian: media kedelai menghasilkan aktivitas tertinggi fitase, sebesar 25.289 U/mL untuk *A. Niger* str 3
- Kedelai → media paling baik untuk menghasilkan fitase, karena memiliki kandungan asam fitat 1.4 % dari bobot kering. Kandungan asam fitat inilah yang mampu menginduksi produksi fitase



Gambar 1 Aktivitas fitase pada berbagai jenis kapang. ● *Aspergillus niger* str 3 ● *Aspergillus niger* str 2 ● *Trichoderma viridae* ● *Mucor circinelloides* ● *Neurospora crassa* ● *Rhizopus oryzae*



Gambar 3 Aktivitas fitase inokulan *A. niger* str3 pada berbagai jenis media menggunakan fermentasi fase padat

# Limbah Kulit Nanas

- Ampas kulit nanas → serat tinggi, penyusun selulosa, lignin, hemiselulosa.
- Selulosa: komponen utama penyusun dinding sel tanaman, berikatan dengan lignin dan hemiselulosa → membentuk lignoselulosa.
- Butuh kapang pendegradasi serat → kapang dengan sifat selulitik
- Ampas kulit nanas: limbah proses pengupasan (peeling) buah nanas pada tahapan produksi nanas kaleng, limbah ampas pengempaan (pressing) kulit buah nanas untuk diambil air buah
- Satu industri → 140 ton ampas kulit nanas, kadar air 85%
- Ampas kulit nanas → bahan organik ↑ serat, potensial diolah → bahan pakan ternak, bahan baku pupuk hayati, medium mikroba, produk pangan
- Pemanfaatan potensial → bahan baku pakan ternak ruminansia, terkendala kadar protein ampas kulit nanas ↓ → tidak mencukupi nutrisi ternak
- Dibutuhkan peningkatan kualitas ampas kulit nanas, khususnya kadar protein



## Contoh Produksi Metabolit Fermentasi

- Upaya untuk ↑ kadar protein bahan → dengan membudidayakan sel mikroba pada ampas kulit nanas sebagai sumber protein → protein sel tunggal (PST)
- PST → sumber protein asal khamir, kapang, bakteri, alga
- Peningkatan kadar protein bahan dilakukan dengan fermentasi → menumbuhkan mikroba pada media tak larut air, tidak mengandung air bebas, tapi cukup untuk metabolisme sel
- Kapang → mikroba potensial sebagai sumber protein sel, karena memiliki kemampuan tumbuh baik pada media padat dibanding lainnya

# Protein Sel Tunggal (PST)

- Protein sel tunggal → sumber protein asal mikroba seperti kapang, bakteri, khamir dan alga
- PST → sumber alternatif protein masa depan, tapi masih sulit karena masalah pada aroma, rasa, kandungan RNA PST terlalu tinggi.
- Produksi PST saat ini berkembang sebagai kebutuhan nutrisi ternak
- Keuntungan penggunaan PST sebagai sumber protein konvensional:
  - ✓ Laju pertumbuhan sel/produksi protein tinggi dibanding tumbuhan / hewan
  - ✓ Kandungan protein sel yang tinggi (40–80 % per sel)
  - ✓ Mampu menggunakan substrat beragam
  - ✓ Tidak butuh tempat besar dan tidak tergantung kondisi iklim.

Efficiency of protein production of several protein sources in 24 hours <sup>(16)</sup>

TABLE : 3

Organism (1,000 kg)	Amount of Protein
Beef Cattle	1.0 kg
Soybeans	10.0 kg
Yeast	100.0 tn
Bacteria	100x10,000,000 tn

## Nitrogen and Protein contents of microbial cells compared with selected foods of animal and plant origin

TABLE : 5

Source	Nitrogen (%)	Crude Protein (%)
Filamentous fungi	5-8	31-50
Algae	7.5-10	47-63
Yeast	7.5-8.5	47-53
Bacteria	11.5-12.5	72-78
Milk	3.5-4.0	22-25
Beef	13-14.4	81-90
Egg	5.6	35
Rice	1.2-1.4	7.5-9.0
Wheat Flour	1.6-2.2	9.8-13.5
Corn meal	1.1-1.5	7.0-9.4

## Problem of Nucleic Acids

- About 70-80% of the total cell nitrogen is represented by amino acids while the rest occurs in nucleic acids.
- This concentration of nucleic acids is higher than other conventional proteins and is characteristic of all fast growing organisms.
- The problem which occurs from the consumption of proteins with high concentration of nucleic acids (78 g/100 g protein dry weight) is the high level of uric acid in the blood, sometimes resulting in the disease gout.
- Uric acid is a product of purine metabolism.

## Problem of Nucleic Acids

- Most mammals, reptiles and molluscs possess the enzyme uricase, and the end product of purine metabolism is allantoin.
- Man, birds and some reptiles lack the enzyme uricase and the end product of purine degradation is uric acid.
- The removal or reduction of nucleic acid content of various SCP's is achieved with one of the following treatments: chemical treatment with NaOH; treatment of cells with 10% NaCl; thermal shock.
- These methods aim to reduce the RNA content from about 7% to 1% which is considered within acceptable levels.



## Waktu Peggandaan Sel

- Mikroba butuh waktu singkat untuk berkembangbiak, → protein sel lebih cepat diproduksi dibanding protein sumber hewan dan tanaman

Organisme	Waktu Peggandaan sel
Bakteri dan khamir	20 -120 menit
Kapang dan algae	2 – 6 jam
Rumput dan tanaman lain	1 – 2 minggu
Ayam	2 – 4 minggu
Babi	4 – 6 minggu
Sapi	1 – 2 bulan

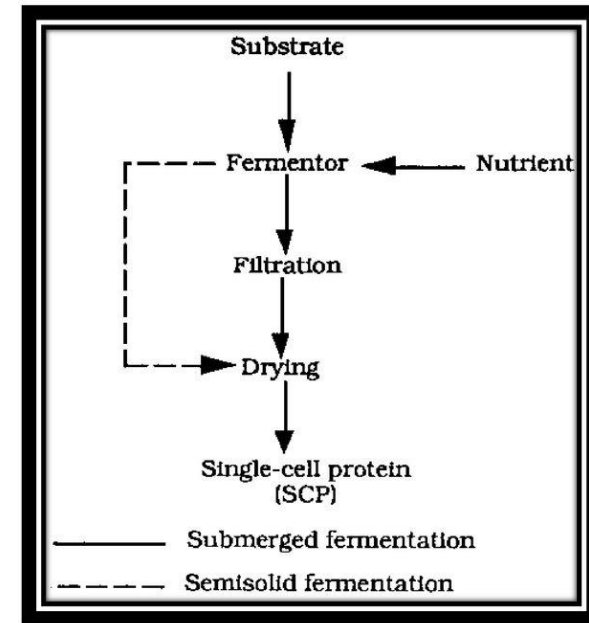
- Produk mikrobial → PST (Protein Sel Tunggal), Produk Biomassa Mikrobial (PBM)
- Bila mikroba yang digunakan bercampur dengan masa substratnya maka → PBM, sedang bila mikroba dipisah dari substratnya → PST

# Production Of SCP:

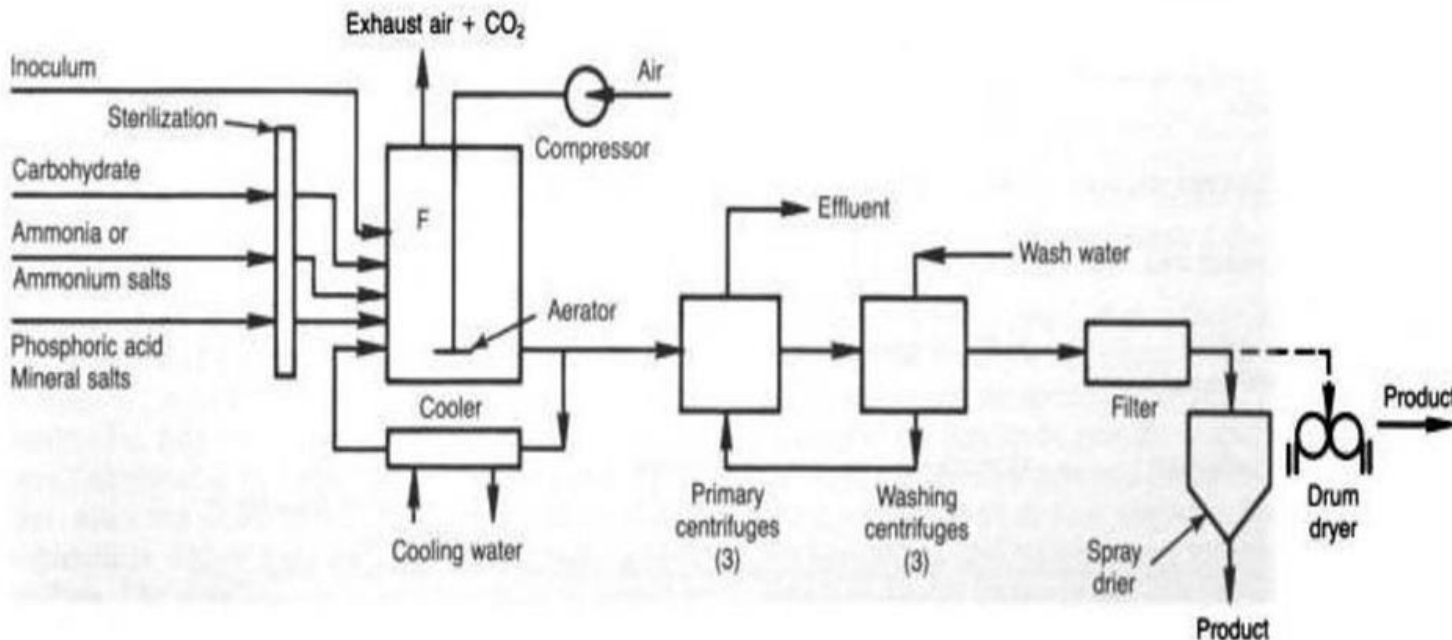
• Production of SCP involves following steps:

1. Selection of Strain of microbe and Substrate
2. Fermentation
3. Harvesting
4. Post harvest treatment
5. Processing of SCP

## Basic Steps of SCP production:



## General process for production of SCP



# Harvesting

- For the producing and harvesting of microbial proteins cost is a major problem.
- There are many methods available for concentrating the solutions like filtration, precipitation, centrifugation and the use of semi-permeable membranes.
- The equipment used for these methods of de-watering is expensive and so would not be suitable for small scale productions and operations.
- Single cell proteins need to be dried to 10% moisture or they can be condensed and denatured to prevent spoilage.

## Post-harvesting Fermentation:

- Isolated microbial colonies are subjected to various differential techniques.
- E.g. Centrifugation, Washing, Drying etc.
- Produced protein contain impurities in it e.g. carbohydrates, nucleic acids, lipid contents, salts etc
- Pure protein isolation can be done by disrupting the cell wall through crushing, crumbling, cycles of freezing & thawing, grinding & thermal shocks.
- Nucleic acid can be remove by:
  1. By treatment with NaCl 10%
  2. By Chemicals e.g. NaOH
  3. Thermal shocks
  4. Enzymes Treatment e.g. ribonucleases



# APPLICATIONS

## 1. As protein supplemented food-

- Also source of vitamins, amino acids, minerals, crude fibers, etc.
- Supplemented food for undernourished children.



## 2. As health food-

- Controls obesity
- Provides instant energy .
- Example- Spirulina- part of diet of US Olympic team.



## MEDICINAL USES OF SPIRULINA

- Strengthen and improve immune system
- Phycocyanins build blood cells
- Increase antiviral activity
- Exhibits anti cancer activity
- The US Olympic teams take spirulina tablet as a source of instant energy.
- Studies showed that spirulina consumption of 4 weeks reduced serum cholesterol level in human beings by 4.5% and significantly reduced body weight by  $1.4 \pm 0.4$  kg after 4 weeks.
- There is no changes in clinical parameters (Blood Pressure) or in biochemical variables (haemoglobin, blood cells, sedimentation rate) and absence of adverse effects.



# Protein Kasar

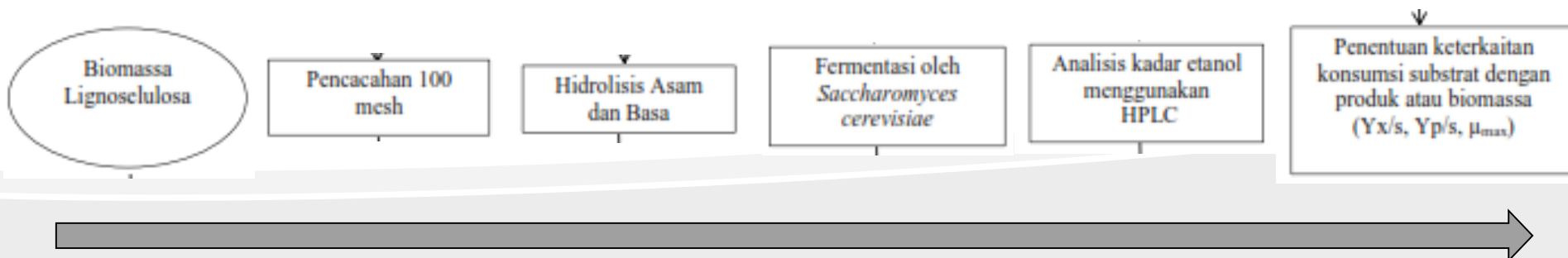
- Protein kasar → persentase unsur N pada suatu bahan
- Komposisi kimia sel kering mikroba → 50% unsur C, 20% unsur O, 14% unsur N, lainnya (H, P, S)
- Semakin banyak sel berkembang (indikator keberhasilan produksi PST) → kandungan protein makin ↑
- Setiap jenis mikroba miliki kandungan unsur N, karakteristik kebutuhan proses, substrat dan ukuran sel yang berbeda-beda.

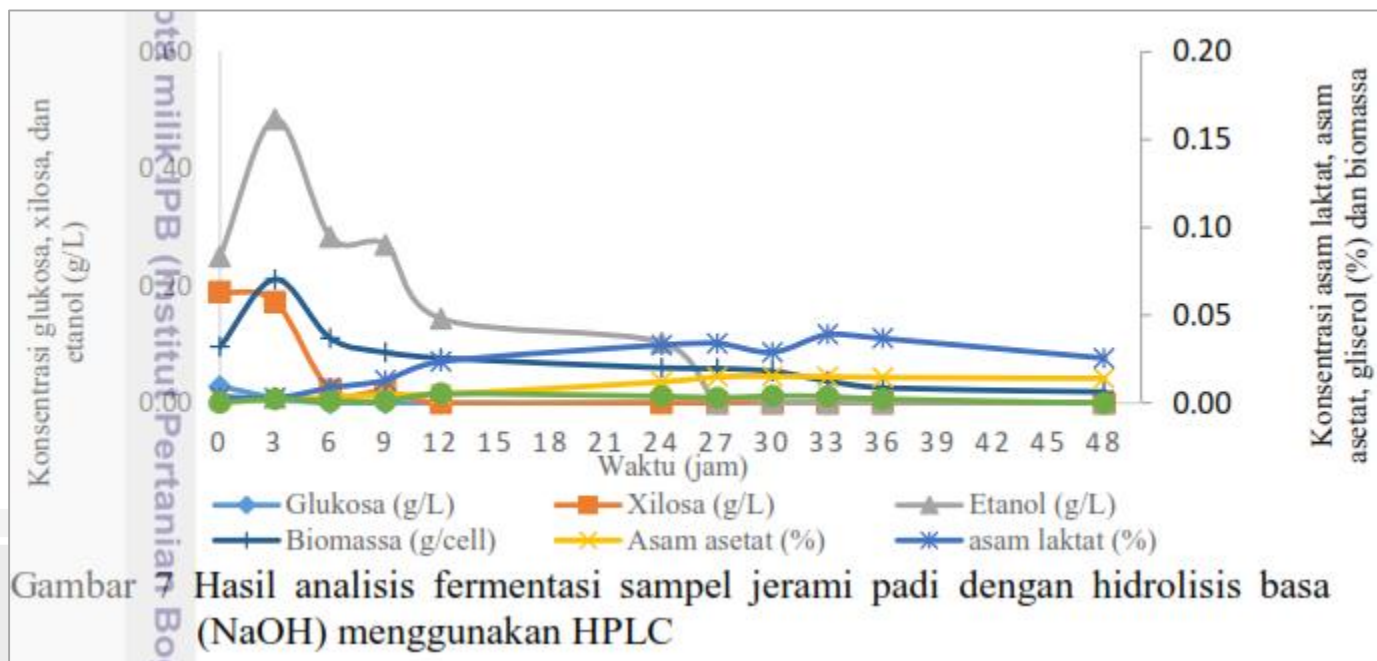
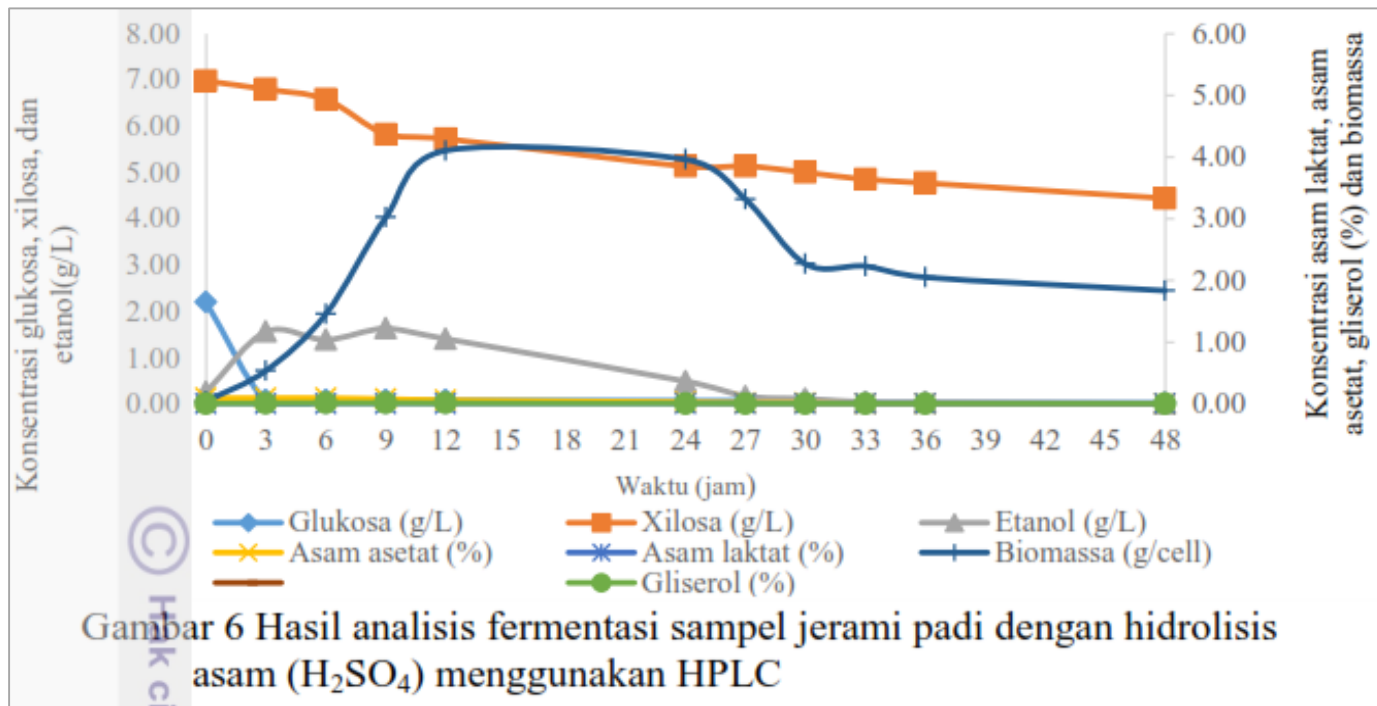
Mikroorganisme	Protein (% BK)
Alga	47 – 63
Bakteri	50 – 83
Khamir	45 - 55
Kapang	31 – 55



# Biomassa Lignoselulosa (Jerami Padi) → Bioetanol

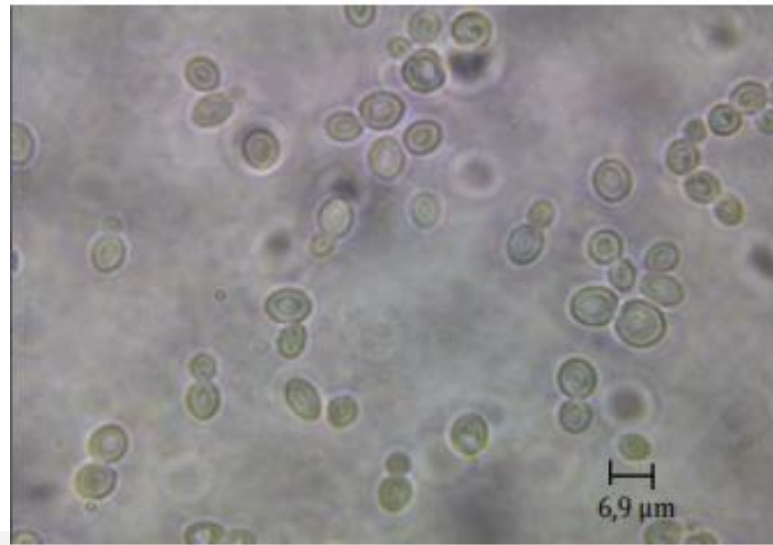
- Pemanfaatan biomassa lignoselulosa biomassa jerami padi sebagai alternatif bioenergi → bioetanol
- Lignoselulosa → komponen utama lignin, selulosa, hemiselulosa
- Biomassa jerami padi → 39% selulosa, 27% hemiselulosa, 12% lignin
- Biomassa lignoselulosa jerami padi digiling dengan disk mill → 100 mesh, menghasilkan kadar selulosa besar 72.70%
- Hidrolisis → dengan asam sulfat  $H_2SO_4$  0.5% dan basa  $NaOH$  1%, pada tekanan tinggi waktu singkat
  - ✓  $H_2SO_4$  → polisakarida selulosa dan hemiselulosa → glukosa dan xilosa
  - ✓  $NaOH$  → efektif solubilisasi lignin (kurang efektif mendegradasi selulosa dan Hemiselulosa)
  - ✓  $NaOH$  → kadar lignin turun dari 55–20%





# Isolat *Saccharomyces cerevisiae*

- Kamir *S. cerevisiae* menghidrolisis polisakarida → monosakarida, monosakarida → etanol
- *S. cerevisiae* → enzim invertase dan zimase. Invertase → polisakarida yang belum terhidrolisis → monosakarida (glukosa). enzim zimase → monosakarida → etanol.
- Batas toleransi *S. cerevisiae* terhadap etanol cukup tinggi → 12–18% v/v, dan tahan terhadap kadar gula tinggi
- Fermentasi dilakukan suhu 28°C dalam rotary shaker 150 rpm selama 2 hari atau 48 jam. Suhu optimum 20–30°C



Ukuran sel dari kultur *S. cerevisiae*



**End. .**