

## Obtención de ácido cítrico por fermentación con *aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (*musa aab simmonds*) maduro

### Obtaining of citric acid trough fermentation with *aspergillus niger* using substratum of ripe dominico hartón plantain (*musa aab simmonds*)

Velásquez, J. A.<sup>I,II</sup> Beltrán, D.<sup>I</sup> Padilla, L.<sup>I</sup> y Giraldo, G.<sup>III</sup>

**Resumen.** Los frutos de plátano Dominico Hartón (*Musa AAB Simmonds*) en estado maduro se utilizaron en la elaboración de un sustrato líquido a partir de la pulpa. Al sustrato se le determinó el contenido de Mn, Zn, Fe, Mg, Cu, N y P, para evaluar si la concentración de los metales estaba dentro de los rangos permitidos para los procesos metabólicos del *Aspergillus niger*, descartándose la adición o remoción de alguno de éstos. En el trabajo del que da cuenta este artículo se obtuvo ácido cítrico a partir de sustrato de pulpa de plátano Dominico Hartón en estado maduro, empleando la cepa del hongo *Aspergillus niger* (donada por la universidad EAFIT). Se utilizó un inóculo al 5% de suspensión de esporas (concentración aproximada de  $1.0 \times 10^7$  esporas/mL) para proceso de fermentación por lotes, se utilizó un volumen de 2 litros de sustrato de plátano al cual se le ajustaron el pH y la concentración de azúcares reductores, para alcanzar el mejor rendimiento en la obtención de ácido. En la evaluación de la eficiencia de producción se obtuvieron 13.5 g/L de ácido cítrico.

**Palabras clave:** Plátano, ácido cítrico, *Aspergillus niger*.

**Abstract.** Ripe Dominico Hartón plantain fruits (*Musa AAB Simmonds*) were used in the elaboration of a liquid substratum from the pulp. Contents of Mn, Zn, Fe, Mg, Cu, N and P in the substratum were determined, in order to evaluate if the concentration of the metals was among the appropriate ranges for the metabolic processes of *Aspergillus niger*, being discarded the addition or removal of some of these metals. In this paper we present some results of a work performed in order to obtain citric acid from substratum made with ripe Dominico Hartón pulp, using the stump of the *Aspergillus niger* fungus (donated by EAFIT university). It was used an inoculate to 5% of suspension of spores (approximate concentration of  $1.0 \times 10^7$  spores/mL) for the in-batch fermentation process. A volume of 2 liters of banana substratum was used,

- 
- I Laboratorio Diseño de Nuevos Productos, Universidad del Quindío. Calle 12 Norte Cra 15, Armenia, Colombia.  
II johnalexvelasquez@gmail.com  
III Director del Grupo de Investigación Agroindustria de Frutas Tropicales perteneciente a la Universidad del Quindío, Ingeniería de Alimentos.

whose pH and concentration of sugar reducers were adjusted, in order to reach the best yield in the acid obtaining. In the evaluation of the production efficiency 13.5 g/L of citric acid were obtained.

**Key words:** Plantain, citric acid, *Aspergillus niger*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico ha sido conocido como una sustancia natural de las plantas desde finales del siglo XIX, y desde 1893 los científicos saben que es producido por hongos filamentosos. En 1923 se inició la primera fermentación práctica para la producción de este ácido orgánico utilizando microorganismos que crecían sobre la superficie de los cultivos (1). En la actualidad el uso de hongos para la elaboración de importantes productos comerciales ha aumentado rápidamente en los últimos tiempos (2), instaurando un marco en el cual el ácido cítrico se ha posicionado como el mayor ácido orgánico producido por fermentación con *Aspergillus niger*, a la vez que es ampliamente usado en la industria de alimentos, bebidas, farmacéutica, química entre otras (3).

Los microorganismos capaces de producir y acumular ácido cítrico son las especies de los géneros *Aspergillus*, *Citromyces*, *Penicillium*, *Monilia*, *Candida* y *Pichia*, aunque para la producción comercial sólo se utilizan mutantes de *Aspergillus niger*. Comparados con las cepas de *Penicillium*, los *Aspergillus* producen más ácido por unidad de tiempo, debido a que presentan baja actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y aconitasa hidratasa, y una alta actividad de citrato sintetasa. Las anteriores constituyen ventajas importantes si se toma en cuenta que además la formación de productos laterales no deseados como ácido oxálico, ácido isocítrico y ácido glucónico puede ser fácilmente suprimida en estos mutantes (4).

En Colombia inicialmente se empleó azúcar refinada como materia prima para la obtención de ácido cítrico en Sucromiles, generando un alto costo de producción. Con los años se han buscado nuevas alternativas de producción más económicas y se ha logrado cultivar *A. niger* con azúcar morena obteniendo buenos resultados, pero el costo aún es alto (5).

En cuanto a la producción de ácido cítrico, Grewal y Kalra (6) afirman que el pH inicial requerido depende de la fuente de carbono utilizada, y Ruijter y sus colegas (7) mencionan que los hongos filamentosos *Aspergillus niger* acumulan altas concentraciones de ácido cítrico a partir de hexosas o disacáridos cuando es cultivado bajo

condiciones particulares. El plátano Dominico Hartón en estado maduro es un fruto rico en carbohidratos, por lo que en el trabajo del que acá damos cuenta se empleó como sustrato en un proceso de fermentación por lotes, utilizando como agente fermentante el hongo *Aspergillus niger*, y evaluando el pH inicial y la concentración del sustrato sobre la producción de ácido cítrico.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Sustrato de plátano Dominico Hartón

El sustrato de plátano empleado en las fermentaciones se obtuvo con frutos en estado maduro, con rangos de color en la cáscara para  $L^*$   $64.31 \pm 0.33$ , para  $a^*$   $7.31 \pm 0.89$  y para  $b^*$   $48.59 \pm 0.76$ . Se utilizaron los frutos sin cáscara para la elaboración del sustrato, tomando 100 g de pulpa fresca y 100 mL de agua destilada, los cuales se licuaron hasta obtener un líquido homogéneo que fue prensado manualmente utilizando un lienzo, y posteriormente filtrado por gravedad y esterilizado en un autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 15 minutos para su posterior utilización como sustrato en las fermentaciones.

### 2.2 Cultivo

Se empleó la cepa de *Aspergillus niger*, donada por el centro de biotecnología de la universidad EAFIT, sede Medellín. La preparación del preinóculo se realizó con base en la metodología descrita por Delgado (8), desarrollando el proceso en una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de los tubos inoculados. La preparación de la suspensión de esporas se hizo conforme a la metodología descrita por Sáez y colegas (5): para lograr homogeneidad en el inóculo se mezcló la suspensión de varios tubos y se inoculó el sustrato de plátano maduro Dominico Hartón (*Musa AAB Simmonds*) con 5% de suspensión de esporas a una concentración de  $1.0 \times 10^7$  esporas/mL. Para todos los cultivos microbiológicos se utilizó un fermentador tipo tanque agitado con capacidad para 5 L, utilizando un volumen de trabajo de 2 L. El fermentador consta de un sistema de agitación de dos turbinas provistas de 6 paletas con eje vertical, operando a una velocidad de agitación de 350 rpm. La temperatura de incubación se mantuvo constante a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  durante el periodo de fermentación y se mantuvo una velocidad de flujo de aire en 1 vvm. Se empleó como antiespumante 10% de polietilenglicol de uso industrial. El porcentaje de saturación de oxígeno se mantuvo por encima de 75%. El pH del sustrato se ajustó al valor deseado con adición de HCl o NaOH 1.0 N, la concentración de 100 g/L de azúcares reductores

en el sustrato se empleó para evaluar el pH inicial de 4.0, 5.0 y 6.0. Para evaluar la concentración del sustrato se ajustó, diluyendo con agua o aumentando la concentración utilizando rotavapor a 60 °C y 75 mbar, para evaluar las concentraciones de 50, 100 y 150 g/L de azúcares reductores, se utilizó el pH inicial de 5.0. Se tomaron las muestras cada 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas para realizar los respectivos análisis.

### 2.3 Métodos de análisis

El contenido de Mn, Zn, Fe, Mg y Cu se determinó por absorción atómica, empleando la metodología para análisis de minerales en jugos de frutas descrita por Ross y Price (9). El nitrógeno se cuantificó por el método de kjeldhal (10). La concentración de fósforo se determinó mediante U.V. visible empleando la metodología de Norma (11). La concentración de la solución de esporas se cuantificó en una cámara de Neubauer, y por dilución se obtuvo la concentración deseada para la inoculación. Para la determinación de biomasa se utilizó el método de peso seco, mediante el cual se separó la biomasa del medio empleando filtración por gravedad. La biomasa obtenida se secó en una estufa a 80°C, posteriormente se registró su peso hasta obtener peso constante en la muestra. Los azúcares reductores se cuantificaron empleando la metodología descrita por Miller (12), mediante el uso del método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La concentración de ácido cítrico se determinó por el método espectrofotométrico reportado por Marrier and Boulet (13), utilizando un espectrofotómetro U.V. visible.

Se empleó el método empírico para evaluar las variables en el proceso fermentativo. Este método tradicional emplea la estrategia de un factor al tiempo e involucra la variación de un factor mientras que los otros permanecen constantes bajo unas condiciones específicas. Sólo es útil cuando se aplica a pocas variables, es simple de manejar y permite la interpretación de resultados sin análisis estadístico (14).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Sustrato de plátano

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre el análisis de los metales en el sustrato (Tabla 1), se encontró que no se requiere ningún tratamiento previo para remoción de los mismos, debido a que los metales no están en límites extremos que puedan afectar el proceso de fermentación sumergida para la producción de ácido cítrico. El *Aspergillus niger* produce poco ácido cítrico a niveles bajos de  $Mn^{2+}$ , debido a

que afecta la actividad enzimática en el ciclo de krebs (excepto la citrato sintetasa). Así mismo se reportan pérdidas en el rendimiento del 10 y 50% cuando se emplean melazas de remolacha con concentraciones de manganeso de 1 y 10 ppm respectivamente (6,15). El resultado en este trabajo se encuentra dentro de los valores aceptables para la producción de ácido cítrico, si se toma en cuenta que Moresi y Parente citan valores óptimos de concentración de  $Zn^{2+}$  en un rango entre 0.2 a 1.5 ppm en los cuales el nivel superior (1.5 ppm) es usado para contrarrestar el efecto tóxico del  $Fe^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  (16), se concluirá que el resultado obtenido se encuentra en los límites de referencia para la fermentación.

Papagianni señala que la producción de ácido cítrico con *A. niger*, se alcanza con valores óptimos de  $Fe^{2+}$  de 1.3 ppm, y Yigitoglu afirma que una concentración de  $Fe^{2+}$  superior a 1 ppm es necesaria para obtener altos rendimientos de ácido cítrico, pero que cantidades en exceso interfieren con la acumulación del ácido y favorecen la producción de ácido oxálico (2,15,17). También se ha reportado que la adición de  $Mg^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  en pequeñas cantidades incrementa la producción de ácido cítrico (4), Moresi y Parente muestran que rangos de 0.001 a 10.2 ppm de cobre favorecen la producción de ácido cítrico (16); el cobre reduce la participación del  $Fe^{2+}$  debido a la formación de compuestos tales como FeS y  $FeSO_4$  (15,18), el resultado en este trabajo se encuentra dentro del rango que permite la producción de ácido cítrico.

| Elemento  | Concentración |
|-----------|---------------|
| Hierro    | 0,771 ppm     |
| Magnesio  | 149,592 ppm   |
| Cobre     | 0,271 ppm     |
| Manganeso | 1,048 ppm     |
| Zinc      | 2,015 ppm     |
| Nitrógeno | 8,000 ppm     |
| Fósforo   | 7,330 ppm     |

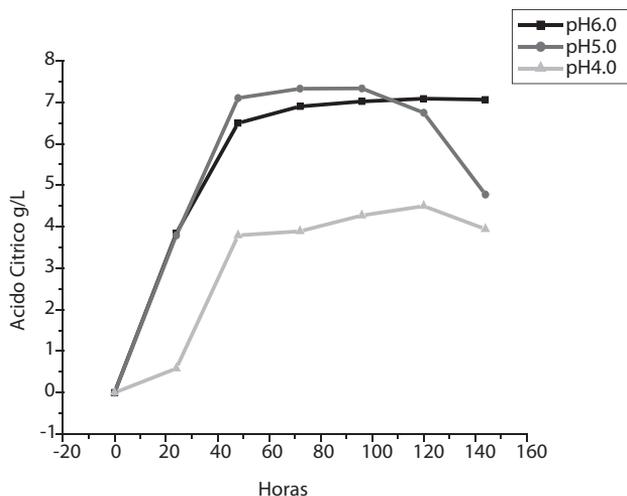
**Tabla 1.** Análisis del sustrato de plátano Dominicano Hartón.

### 3.2 Fermentación

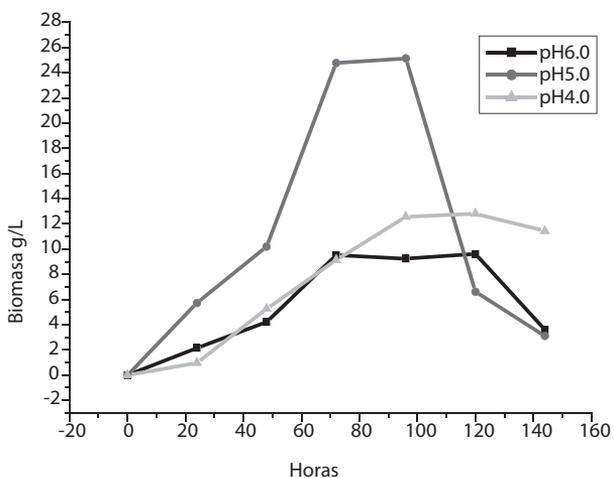
#### 3.2.1 Evaluación del pH

El sustrato evaluado se empleó como medio de cultivo en los procesos fermentativos por lotes, donde se evaluó la producción de ácido cítrico a diferente pH inicial de 4.0, 5.0 y 6.0 (figura 1a).

1a)



1b)



Parámetros evaluados a diferente pH inicial. Figura 1a. Producción de ácido cítrico. Figura 1b. Producción de biomasa.

Como lo ilustra la figura 1a, se evidenció la máxima concentración de 7,33 g/L de ácido cítrico a pH 5.0 y 96 horas de proceso fermentativo, y se observó que después de este periodo la concentración del ácido disminuye gradualmente, coincidiendo con lo reportado por Gökhan y sus colegas (19), quienes al utilizar un sustrato de

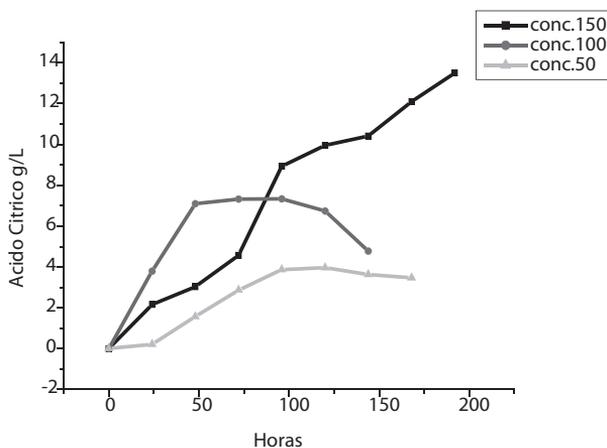
remolacha como medio de cultivo obtuvieron la máxima producción de ácido cítrico a los cuatro días y a partir de este periodo la producción decreció, debido a la disminución de la fuente de carbono en el sustrato y su repercusión en la muerte del microorganismo. Este fenómeno se observa en la figura 1b, donde se muestran las fases de crecimiento del *Aspergillus niger* en el sustrato de plátano bajo diferentes pH. En ella para el pH de 5.0, no se hace evidente la fase de latencia, debido que en las primeras 24 horas ya existe un crecimiento micelial, indicando que esta fase se encuentra entre 0 y 24 horas. A partir de este periodo y hasta las 48 horas se presenta la fase exponencial, seguida por la fase estacionaria, que se extiende desde las 48 a las 96 horas, y por último se presenta la fase de muerte a partir de las 96 horas.

Al evaluar el factor del pH sobre la producción de ácido cítrico y el crecimiento del hongo, se evidenció el factor inhibitorio de la disposición de la fuente de carbono, por lo que se planteó evaluar la concentración de azúcares reductores en el sustrato.

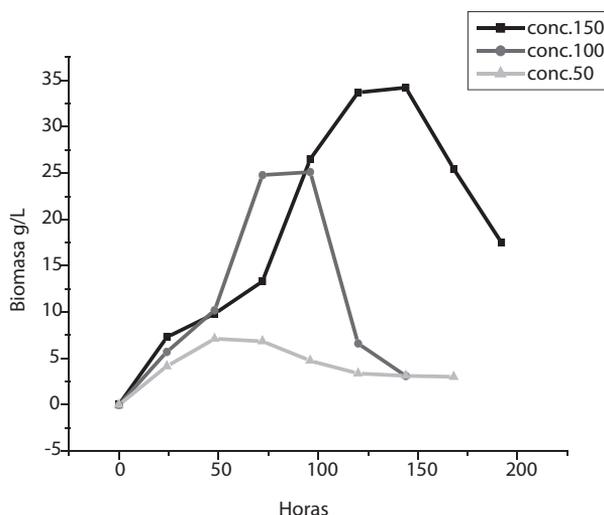
### 3.2.2 Evaluación de la concentración de azúcares

Se utilizaron concentraciones en el sustrato de plátano de 50, 100 y 150 g/L de azúcares reductores, con el fin de evaluar la influencia de este factor sobre la producción de ácido cítrico y el crecimiento del *Aspergillus niger*.

2a)

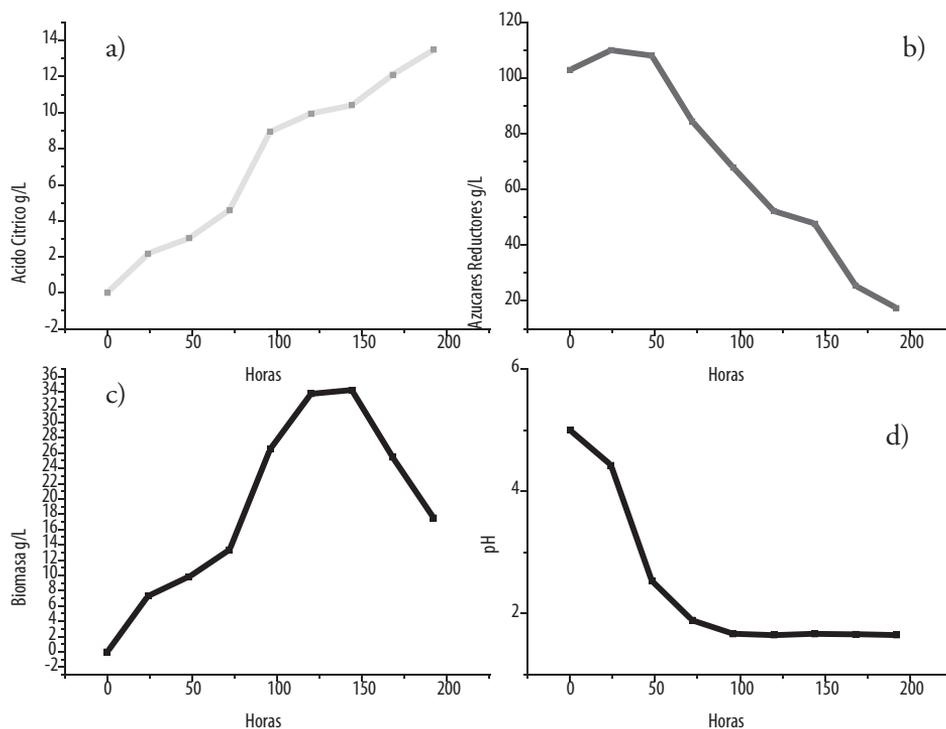


2b)



Parámetros evaluados a diferente concentración de azúcares. Figura 2a. Producción de ácido cítrico. Figura 2b. Producción de biomasa.

En la figura 2a se muestra la producción de ácido cítrico a diferentes concentraciones de azúcares. Se evidencia que la concentración de 150 g/L, muestra la mayor producción de 13,5 g/L de ácido cítrico a las 196 horas del proceso fermentativo, y que la producción de ácido aumenta conforme aumenta la concentración de azúcares reductores, confirmando lo reportado por Papagianni y sus colegas (20), quienes estudiaron la influencia de la concentración de glucosa sobre la producción de ácido cítrico y crecimiento de *A. niger* en fermentaciones batch y fed-batch, y reportaron una concentración final de ácido decreciente directamente proporcional con la disminución de glucosa en el medio. Dicho comportamiento está relacionado con la producción de biomasa, que aparece relacionada de manera directamente proporcional con la mayor concentración de azúcares reductores en el medio, lo cual se observa en la figura 2b. Además se muestra que en todas las concentraciones evaluadas se presentan tres de las cuatro fases de crecimiento, sin que se haga evidente la fase de latencia, lo que confirma que se presenta antes de 24 horas. También se observa que a medida que aumenta la concentración se prolonga la aparición de las diferentes fases.



Fermentación a pH inicial 5.0 y concentración inicial de 150 g/L de azúcares reductores, donde se muestra. Figura 3a. Producción de ácido cítrico. Figura 3b. Producción de biomasa. Figura 3c. Consumo de azúcares reductores. Figura 3d. Variación del pH.

Al evaluar el efecto del pH y la concentración de azúcares reductores en el sustrato de plátano sobre la obtención de ácido cítrico, se encontró que los niveles con los que se obtuvo la mayor concentración de ácido fueron a pH de 5.0 y la concentración de 150 g/L de azúcares reductores. El comportamiento sobre la producción de ácido cítrico, biomasa, consumo de azúcares reductores y cambio del pH se presentan en las figuras 3a a 3d, dando un máximo de producción de ácido cítrico (13.5 g/L) a las 196 horas.

El crecimiento del hongo muestra que la fase exponencial se prolonga debido a la alta disponibilidad de alimento, con lo que la fase estacionaria inicia a las 120 horas y llega hasta las 144 horas, momento a partir del cual se produce la fase de muerte. La concentración de azúcares reductores al inicio de la fermentación tiene un ligero incremento debido a la hidrólisis de polisacáridos que realiza el *Aspergillus niger*, obteniéndose glucosa y fructosa que son la fuente de carbono consumidos por el hongo

(21), y confirmando lo dicho por Nielsen en su trabajo de modelos de crecimiento de hongos filamentosos, en el cual argumenta que solamente la glucosa y fructosa pueden ser directamente metabolizadas por el *Aspergillus niger* (22). El pH del medio se estabiliza por debajo de 2.0 a partir de las 96 horas hasta el final del proceso de fermentación, y está relacionado con la concentración de azúcares reductores, evidenciando que a mayor concentración de éstos mayor producción de ácido cítrico, y por ende más ácido en el medio al final del proceso.

La máxima concentración de ácido cítrico reportada por algunos autores empleando medios alternativos como sustrato, y adición de diversas sustancias para incrementar la concentración final de ácido, fue reportada en el trabajo realizado por Haq y sus colegas (23), quienes obtuvieron 96.1 g/L de ácido cítrico, investigando la producción en melazas de caña y empleando *A. niger* mutado por inducción U.V y por método químico. También Nehad (24) investigó el efecto de la adición de aceites naturales a medios de melaza de remolacha, obteniendo 72.8 g/L de ácido cítrico, y López y sus colegas (4) investigaron la producción de ácido cítrico en suero de leche y obtuvieron la máxima concentración de 38 g/L a las 240 horas de fermentación. De igual manera, Sánchez y sus colegas (25) evaluaron la producción de ácido cítrico en suero de leche y obtuvieron 5.7 g/L a las 240 horas de fermentación, y Kilic y sus compañeros (26) obtuvieron esta misma concentración de ácido cítrico evaluando la concentración de  $K_4Fe(CN)_6$ , aceite de maíz y Hostarex.

Samragy y sus colegas (27) evaluaron el efecto del pH inicial, concentración de metanol y NaCl, en medios de fermentación de suero de leche, empleando dos cepas diferentes de *A. niger*, y obteniendo para las dos cepas evaluadas 1.06 y 0.82 g/L de ácido cítrico a pH de 3.5 y después de las 216 horas de fermentación. Con base en estos valores y la máxima producción de ácido cítrico obtenida en este trabajo (13.5g/L), se considera que es baja comparada con los medios de melaza de caña y remolacha, además del medio de suero de leche evaluado por López y sus compañeros (4). Sin embargo, a pesar de que el sustrato de plátano es un sustrato complejo, la máxima concentración de ácido cítrico obtenida en este trabajo es superior a los resultados logrados por otros autores que utilizaron medios no convencionales, y mayor a la concentración reportada por algunos trabajos que emplean aditivos para mejorar la producción de ácido cítrico.

#### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se encontró que el sustrato de plátano Dominico Hartón no es tóxico para el crecimiento del hongo filamentoso *Aspergillus niger* y la producción de ácido cítrico, a pesar de que este medio es un sustrato complejo y no convencional.

Se obtuvo la máxima concentración de 13,5 g/L de ácido cítrico, utilizando un pH 5.0 y 150g/L de azúcar reductores, a las 192 horas del proceso fermentativo.

Resulta necesario evaluar el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de ácido cítrico, utilizando sustrato de plátano con concentraciones de azúcares reductores mayores a 150 g/L.

También sería de utilidad evaluar en el sustrato de plátano diferentes concentraciones de aditivos utilizados para mejorar el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de ácido cítrico.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento al programa de Química de la Universidad del Quindío y al grupo de investigación Agroindustria de Frutas Tropicales, perteneciente a los programas de Química y Ciencias Agroindustriales de la misma universidad.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Crueger, W. y Crueger, A. (1993). *Biotecnología: Manual de microbiología industrial*. España: Editorial Acribia S.A. 68 p.
- Papagianni, M. (2004). "Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes". *Biotechnology Advances*, 22, 189-259.
- Ates, S., Dingil, N., Bayraktar, E. y Mehmetoglu, U. (2002). "Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil". *Process Biochemistry*, 38, 433-436.
- López, C. A., Zuluaga, A., Herrera, S. N., Ruiz, A. A. y Medina, V. I. (2006). "Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche". *Dyna*, 150, 39-57.
- Sáez, A., Flórez, L. y Cadavid, A. (2002). "Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus*

- niger y evaluación de la producción de ácido cítrico”. *Revista Universidad EAFIT*, 128, 33-41.
- Grewal, H. S. y Kalra, K. L. (1995). “Fungal production of citric acid”. *Biotechnology Advances*, 13(2), 209-234.
- Ruijter, J. G., Panneman, H. y Visser, J. (1997). “Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1334, 317-326.
- Delgado, C. (2006). Efecto del  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  sobre la síntesis de amiloglucosidasa generada por *Aspergillus niger* en fermentación sólida y sumergida. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.
- Ross, T. H. y Price, W. J. (1970). “Analysis of fruit juices”. *Sci. Food Agr*, 21, 51.
- Escobar, F. y Rojas, C. (2008). Producción de *Lactobacillus casei* y determinación de ácido láctico a partir del suero de leche de ganado vacuno. Tesis de grado. Universidad del Quindío. Programa de química.
- Norma, C., Cavazos, L. y Zárate, E. (2001). “Determinación de fósforo y cafeína en bebidas de cola”. *UANL*, 116-120.
- Miller, G. L. (1959). “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”. *Anal Chem*, 31, 426-28.
- Marrier, J. R. y Boulet, M. (1958). “Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method”. *Journal Dairy Science*, 1, 1683-1692.
- Kim, J. (2004). Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 in various fermentation systems. Department of Biosystems Engineering. Macdonald Campus of McGill University. Ste-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canadá.
- Yigitoglu, M. (1992). “Production of citric acid by fungi”. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 5(2), 100-106.
- Moresi, M. y Parente, E. (1999). “Production of organic acids”. *Fermentation Industrial*, 705-717.
- Papagianni, M. (2007). “Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling”. *Biotechnology Advances*, 25, 244-263.
- Haq, I., Ali, S., Qadeer, M. A. y Iqbal, J. (2002). “Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media”. *Process Biochemistry*, 37, 1085-1090.
- Gökhan, D., Kürsat, O. y Yaykash, A. Y. (2005). “The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects”. *Food Chemistry*, 89, 393-396.

- Papagianni, M., Mattey, M. y Kristiansen, B. (1999). "The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture". *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 710-717.
- Bizukojc, M. y Ledakowicz, S. (2004). "The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation". *Process Biochemistry*, 39, 2261-2268.
- Nielsen, J. (1992). "Modelling the growth of filamentous fungi". *Adv Biochem Eng*, 46, 187-223.
- Haq, I., Sikander, A., Qadeer, M. A. y Iqbal, J. (2004). "Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses". *Bioresource Technology*, 93, 125-130.
- Nehad, A. (2002). "Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium". *Bioresource Technology*, 84, 97-100.
- Sánchez, O. J., Ortiz, M. C. y Betancourt, A. L. (2004). "Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp*". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(1), 43-54.
- Kilic, M., Bayraktar, E., Ates, S. y Mehmetoglu, U. (2002). "Investigation of extractive citric acid fermentation using response-surface methodology". *Process Biochemistry*, 37, 759-767.
- Samragy, Y. A., Khorshid, M. A., Foda, M. I. y Shehata, A. E. (1996). "Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*". *Food Microbiology*, 29, 411-416. 

| Referencia   | Fecha de recepción        | Fecha de aprobación       |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Velásquez J.A., Beltrán D., Padilla L. y Giraldo G. Obtención de ácido cítrico por fermentación con <i>aspergillus níger</i> utilizando sustrato de plátano dominico hartón ( <i>musa aab simmonds</i> ) maduro. <i>Revista Tumbaga</i> (2010), 5, 135-147 | Día/mes/año<br>23/09/2010 | Día/mes/año<br>27/09/2010 |