

## Effect of methyl and ethyl alcohol on citric acid production by submerged fermentation

Zulay Mármol P., Gisela Páez y José R. Ferrer

Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Química, Facultad de Ingeniería  
Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela

### Abstract

Methyl and ethyl alcohol were added in concentrations ranging from 1% to 4% in order to assess their effect on the production of citric acid in submerged cultures at pH: 2.02, 5.06 and 6.08. During the process, pH, biomass, residual sugar and citric acid content were measured. Where fermentations yielded higher acid production, an attempt was made to establish the growth model of the *Aspergillus niger* strain used in them.

Result shows that the *Aspergillus niger* 46890 strain produces citric acid and tolerates methyl and ethyl alcohol at concentrations lower than 3%. However, the strain suffered modifications during storage prior to inoculation. This affected the performance of the culture. Methyl alcohol turned out to be the best enhancing agent. Mold growth was adjusted to the model,  $X^{1/3} = X_0^{1/3} + Kt$ .

**Key words:** Citric acid, submerged fermentation, *Aspergillus niger*.

## Efecto de la adición de metanol y etanol en la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida

### Resumen

Se evaluó el efecto de la adición de metanol y etanol en concentraciones del 1% al 4% en la producción de ácido cítrico por cultivo sumergido a pH: 2.02, 5.06, 6.08. Durante el proceso se evaluaron: pH, biomasa, azúcar residual y ácido cítrico. Para aquellas fermentaciones con una mayor producción de ácido, se trató de establecer el modelo de crecimiento para la cepa de *Aspergillus niger* empleada. Los resultados indican que la cepa de *Aspergillus niger* 46890 es productora de ácido cítrico y tolerante al metanol y etanol en concentraciones menores del 3%. Sin embargo, la misma sufrió modificaciones durante el almacenamiento previo a la inoculación, lo cual afectó la respuesta del cultivo. El metanol resultó ser el mejor agente estimulante para la producción del ácido. El crecimiento del hongo se ajustó al modelo,  $X^{1/3} = X_0^{1/3} + Kt$ .

**Palabras claves:** Acido cítrico, fermentación sumergida, *Aspergillus niger*.

### Introducción

El ácido cítrico es un metabolito producido comercialmente con cepas seleccionadas de *Aspergillus niger*, hongo filamentoso imperfecto, el cual es capaz de convertir hasta un 90% (w/w) del carbohidrato sustrato (usualmente sacarosa o melazas) a ácido cítrico. Aunque el

conocimiento básico de este proceso es bien conocido, ocasionalmente a nivel industrial se producen fermentaciones con bajo rendimiento. Rohr y Kubicek [1] reportan que esto puede ser debido a la degeneración de las conidias durante el almacenamiento del hongo, de este modo el organismo pierde su habilidad para producir grandes cantidades de ácido cítrico. Se ha estu-

diado la adición de alcoholes, grasas e inhibidores metabólicos con el propósito de incrementar la producción del ácido [2,3,4]. Se han realizado importantes observaciones en la tecnología de la fermentación de ácido cítrico, estableciendo que la adición de alcoholes (metanol, etanol) al medio reduce el efecto inhibitor de metales trazas como hierro, cobre, zinc y manganeso, en la producción de este ácido. La adición de metanol antes de la inoculación, en concentraciones de 3 a 4% retarda el crecimiento, disminuye la esporulación e incrementa la producción de ácido cítrico [2,5]. Quizá el papel del metanol es acondicionar el micelio sin afectar el metabolismo. Sin embargo, la obtención de mutantes tolerantes a altas concentraciones de metales trazas y que responden positivamente a la adición de metanol, determina que su acción no sólo es incrementar la tolerancia a dichos metales, sino que también afecta las propiedades de permeabilidad facilitando una mayor excreción de ácido cítrico. Manonmani y Sreekantiah [4] realizaron ensayos adicionando metanol en niveles entre 1 y 3%, encontrando que un 2% de este incremento significativamente el rendimiento en ácido cítrico, pero a niveles elevados tanto el crecimiento como la producción disminuyeron. Encontraron que la adición de un 3% de etanol estimuló la producción de ácido cítrico. Estos investigadores reportan observaciones hechas por Bhatt y col. [6] donde establecen que el etanol puede ser convertido a acetylCo-A, precursor del ácido cítrico. El etanol también actúa como fuente de carbono. A niveles elevados ejerce un efecto tóxico, disminuyendo el crecimiento y la producción, Roukas y Kotzekidou [7] investigaron el efecto de estimulantes como el metanol (1 - 5%) en la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida, usando una cepa de *A. niger* 9142, reportando un marcado incremento en el ácido cítrico producido en presencia de metanol al 4%(v/v). En investigaciones realizadas por Kumar y Ethiraj [3] con varias cepas de *A. niger* a partir de jugo de caña de azúcar como fuente de carbono, adicionando metanol en concentraciones de 1 - 4%, encontraron que la adición de un 3% de metanol al medio incrementó la producción de ácido cítrico, obteniendo rendimientos hasta de un 42% comparado con el control (9 - 17%). Hang and Woodams [8] desarrollaron un método de fermentación en

estado sólido para producir ácido cítrico a partir de "grape pomace" con adición de un 3% de metanol, obteniendo rendimientos mayores al 60% basado en la cantidad de sacarosa consumida. Hasan; Baig y col. [2] describen el efecto de varios metabolitos inhibidores tales como metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, cloroformo y tetracloruro de carbono en el proceso de crecimiento y producción de ácido cítrico en medio con melazas de remolacha en cultivo superficial. Plantean una relación entre el peso molecular del metabolito y el efecto estimulante que ejerce. De todos el metanol demostró ejercer un mejor efecto estimulante a una concentración de 3.5%. La formación de ácido disminuyó en el orden etanol, cloroformo, n-propanol, n-butanol y tetracloruro de carbono.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de diferentes concentraciones de metanol y etanol en la producción de ácido cítrico.

## Parte Experimental

### Microorganismo

Cepas de *A. niger* 46890, mantenidas en cuñas de PDA, almacenadas a 4°C. Las esporas así cultivadas, se transfieren usando agua estéril y bajo condiciones asépticas a erlenmeyers de 500 ml de capacidad con un volumen de trabajo de 150 ml. La concentración de esporas, aproximadamente  $3 \times 10^8$ /ml fue estimada por conteo microscópico directo usando una cámara de Neubauer. Inicialmente se utilizó el medio de prueba sugerido por Benuzzi y Segovia [9] capaz de predecir la habilidad de distintas cepas de *A. niger*, para producir ácido cítrico.

### Medio

Se utilizó el medio descrito en la Tabla 1 [10], con adición de 1.24 g/l de sulfato de amonio como fuente nitrogenada, metanol y etanol en concentraciones entre 1 y 4%. Azúcar refinada fue utilizada como fuente de carbono y energía, previo a su utilización fue caracterizada en cuanto al contenido de Fe, Cu, Zn, Mn y Al. (Tabla 2).

### Técnicas Analíticas

**Peso seco:** Las determinaciones de biomasa se realizaron con la técnica de peso seco [11],

Tabla 1  
Composición del medio usado en las fermentaciones

Elementos (g/L)	Fermentación por Carga (g/L)
Sacarosa	140.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.24
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.50
SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> Ox10 <sup>3</sup>	0.42
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> Ox10 <sup>3</sup>	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> Ox10 <sup>3</sup>	0.06

Tabla 2  
Caracterización del azúcar refinada usada como fuente de carbono

Metal	Concentración (mg/Kg)	Límite de Detección (mg/L)
Fe	27.00	0.02
Zn	2.35	0.02
Cu	3.75	0.03
Mn	3.60	0.01
Al	92.50	0.03

en ésta las muestras se filtraron usando papel de filtro Whatman No. 1, previamente secado durante 24 hrs a 80°C y tarado. El residuo filtrado se lavó con agua destilada, se secó a 80°C durante 24 horas, se enfrió en un desecador y luego se pesó.

**Acido Cítrico:** El ácido cítrico en el filtrado se determinó por el método colorimétrico de Marier y Boulet [12] para la determinación directa de éste.

**Azúcar residual:** El azúcar residual se analizó por el método fenol-ácido sulfúrico de Dubois y colaboradores [13] para determinación de azúcares totales.

**pH:** Las mediciones se llevaron a cabo con un potenciómetro digital Corning Modelo 140.

**Proceso por carga:** Se realizaron fermentaciones por duplicado a escala de laboratorio en erlenmeyer de 500 ml, con un volumen de trabajo de 150 ml. Se adicionaron metanol y etanol en concentraciones entre 1 y 4% antes de la inoculación [1]; el pH inicial del medio fue de 2.02 variando a valores entre 1.67 - 1.69 y 2.00 - 1.68 al agregar el metanol y el etanol respectivamente; a estos valores de pH no se esterilizó el medio. Todos estos procesos se llevaron a cabo sin control del pH, a una temperatura de 30°C y una agitación de 200 rpm, tomando muestras por duplicado periódicamente y determinando en cada caso valores de pH, biomasa, ácido cítrico y azúcar residual.

## Resultados y Discusión

### Fermentación por carga

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos en la fermentación 1. En general la presencia de metanol no incrementó la producción de ácido cítrico, observándose que a concentraciones superiores al 2% la disminución de la cantidad de ácido obtenido es mayor.

En las Tablas 4 y 5 se presentan los resultados para las fermentaciones 2 y 3, la adición de metanol a una concentración del 2% produjo un incremento en la producción de ácido con respecto al control, observándose una disminución tanto en la producción de ácido como en el crecimiento para concentraciones de 3.5 y 4%. Manonmani y Sreekantiah [4] reportan resultados similares para una cepa de *A. niger* - 16 en una fermentación en estado sólido. El metanol no es asimilado por el *A. niger* y su papel como estimulante en la producción de ácido cítrico aún no está claro. Es posible que su acción sea sobre las propiedades de la permeabilidad favoreciendo la excreción del ácido cítrico [1,5,8].

Investigaciones iniciales indican que el metanol aumenta la tolerancia del *A. niger* a la concentración de metales como Fe<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>. Sin embargo, los estudios recientes demuestran que con cepas tolerantes a altas con-

Tabla 3  
Efecto del metanol en la producción de ácido cítrico por *A. niger* 46890  
Fermentación 1. pHi = 2.02

Concent. metanol (%)	Tiempo (días)	pH	Blomasa (g/L)	Azúcar Residual (g/L)	Acido Cítrico (g/L)
-	0	2.02	1.44	140.00	0.00
-	3	1.78	1.48	120.00	0.08
-	8	1.72	10.16	115.00	3.13
-	14	1.47	13.48	108.50	14.00
0	20	1.37	21.96	100.00	19.25
-	28	1.67	17.39	75.10	31.25
-	36	1.48	16.07	50.00	33.25
-	44	1.44	17.03	58.25	50.00
-	0	1.68	0.59	140.00	0.00
-	3	1.67	1.27	130.00	0.00
-	8	1.66	3.84	118.75	0.12
-	14	1.52	12.71	108.50	6.85
1.0	20	1.38	12.70	87.50	14.45
-	28	1.69	11.79	78.40	22.50
-	36	1.43	12.04	71.25	22.50
-	44	1.46	12.15	72.50	38.13
-	0	1.67	1.16	138.00	0.00
-	3	1.66	1.30	130.00	0.00
-	8	1.66	1.77	121.50	0.07
2.0	14	1.61	8.14	112.25	1.01
-	20	1.35	9.21	96.25	11.85
-	28	1.28	12.62	82.55	21.25
-	36	1.25	12.04	68.75	25.00
-	44	1.47	12.30	78.75	31.89
-	0	1.69	1.89	137.00	0.00
-	3	1.67	2.01	135.00	0.00
-	8	1.53	2.19	126.00	0.01
3.5	14	1.79	2.75	121.50	0.06
-	20	1.50	10.28	112.50	0.17
-	28	1.45	12.36	93.75	1.15
-	36	1.21	5.54	61.25	5.75
-	44	1.15	6.89	57.50	11.00
-	0	1.68	0.76	134.00	0.00
-	3	1.64	1.16	133.00	0.00
-	8	1.47	1.64	129.00	0.01
4.0	14	1.79	5.26	127.50	0.08
-	20	1.44	2.51	124.00	0.92
-	28	1.43	12.26	106.90	1.75
-	36	1.23	15.63	97.50	6.75
-	44	1.17	13.31	86.25	14.25

Tabla 4  
Efecto del metanol en la producción de ácido cítrico por *A. niger* 46890  
Fermentación 2. pH<sub>i</sub> = 2.02

Concentración metanol (%)	Tiempo (días)	pH	Biomasa (g/L)	Azúcar Residual (g/L)	Acido Cítrico (mg/L)
-	0	2.02	2.54	140.00	0.00
-	3	1.83	2.58	132.50	10.00
-	7	1.67	5.28	97.50	15.00
-	11	1.57	5.43	92.50	110.00
0	15	1.45	6.71	92.50	135.00
-	21	1.45	7.40	42.50	160.00
-	28	1.45	9.88	37.00	160.00
-	36	1.45	12.69	30.00	160.00
-	46	1.54	8.44	25.00	110.00
-	0	1.98	1.90	125.00	0.00
-	3	1.83	2.35	125.00	0.00
-	7	1.65	5.11	62.55	60.00
-	11	1.55	5.59	62.50	61.00
1.0	15	1.47	8.25	47.50	110.00
-	21	1.45	9.61	37.50	148.00
-	28	1.45	9.63	35.00	173.00
-	36	1.54	12.69	30.00	113.00
-	46	1.57	10.88	30.00	110.00
-	0	1.88	2.31	125.00	0.00
-	3	1.86	2.88	125.00	0.00
-	7	1.68	5.28	62.50	10.00
-	11	1.54	5.63	47.50	135.00
2.0	15	1.46	6.31	42.50	188.00
-	21	1.44	6.30	40.00	200.00
-	28	1.41	9.38	37.00	210.00
-	36	1.41	10.09	35.00	210.00
-	46	1.41	10.13	30.00	210.00
-	0	1.98	1.84	132.50	0.00
-	3	1.86	1.58	125.00	0.00
-	7	1.79	1.78	85.00	10.00
-	11	1.54	2.03	62.50	50.00
3.5	15	1.45	3.54	56.00	250.00
-	21	1.42	5.08	55.00	730.00
-	28	1.40	6.38	55.00	173.00
-	36	1.40	10.58	55.00	173.00
-	46	1.39	9.08	47.00	198.00
-	0	1.97	0.48	132.50	0.00
-	3	1.86	0.53	132.50	0.00
-	7	1.79	0.60	94.00	10.00
-	11	1.60	1.60	85.00	50.00
4.0	15	1.45	1.61	70.00	60.00
-	21	1.45	5.54	55.00	110.00

Tabla 5  
Efecto del metanol en la producción de ácido cítrico por *A. niger* 46890  
Fermentación 3. pHi = 2.02

Concent. metanol (%)	Tiempo (días)	pH	Biomasa (g/L)	Azúcar Residual (g/L)	Acido Cítrico (mg/L)
-	0	2.02	3.80	140.00	0.00
-	5	1.87	10.12	130.00	20.00
0	11	1.75	12.24	105.00	110.00
-	18	1.71	12.21	100.00	280.00
-	27	1.67	21.43	85.00	580.00
<hr/>					
-	0	1.98	1.68	140.00	0.00
-	5	1.78	9.96	129.00	80.00
1.0	11	1.77	10.99	108.50	210.00
-	18	1.70	13.04	87.50	430.00
-	27	1.65	18.26	70.00	430.00
<hr/>					
-	0	1.88	2.35	135.00	0.00
-	5	1.84	9.21	132.00	430.00
2.0	11	1.75	8.04	112.25	430.00
-	18	1.69	8.26	92.50	430.00
-	27	1.66	16.77	80.00	1350.00
<hr/>					
-	0	1.98	1.78	135.00	0.00
-	5	1.74	6.24	130.50	600.00
3.5	11	1.71	9.59	121.50	850.00
-	18	1.71	6.22	112.50	1110.00
-	27	1.66	8.64	110.00	1110.00
<hr/>					
-	0	1.97	0.37	137.00	0.00
-	5	1.76	3.59	131.00	90.00
4.0	11	1.73	8.06	127.50	90.00
-	18	1.73	8.18	124.00	140.00
-	27	1.69	8.47	119.00	340.00

centraciones de estos metales el metanol incrementa la producción de este ácido [5].

La Tabla 6 presenta los resultados de la primera fermentación realizada con adición de etanol a diferentes concentraciones. Estos muestran que la adición de este alcohol al medio

ejerce gran influencia sobre la producción de ácido cítrico, peso seco de micelio y consumo de azúcar. La adición de etanol al 1% produjo una mayor cantidad de ácido, sin superar la obtenida en el control. Incrementos en la concentración

Tabla 6  
Efecto del etanol en la producción de ácido cítrico por *A. niger* 46890. Fermentación 1. pH = 2.02

Concent. etanol (%)	Tiempo (días)	pH	Biomasa (g/L)	Azúcar Residual (g/L)	Acido Cítrico (mg/L)
-	0	2.02	1.44	140.00	---
-	3	1.78	1.48	120.00	0.03
-	8	1.72	10.16	115.00	3.13
0	14	1.47	13.48	108.50	14.00
-	20	1.37	21.96	100.00	19.25
-	28	1.67	17.39	75.10	31.25
-	36	1.48	16.07	58.25	33.25
-	44	1.44	17.03	50.00	50.00
-	0	1.68	1.35	135.00	---
-	3	1.59	1.86	124.50	0.03
-	8	1.40	8.73	112.50	1.04
-	14	1.67	11.17	97.00	8.80
1.0	20	1.21	12.16	87.50	14.43
-	28	1.73	8.71	75.00	20.00
-	36	1.73	11.61	74.00	24.38
-	44	1.51	10.45	72.50	26.25
-	0	1.69	2.18	140.00	---
-	3	1.59	2.43	139.00	0.02
-	8	1.57	2.61	126.50	0.02
2.0	14	1.70	6.26	87.00	0.07
-	20	1.17	5.49	77.00	0.55
-	28	1.73	7.19	75.00	1.03
-	36	1.82	11.18	62.50	2.00
-	0	1.69	0.57	119.00	---
-	3	1.68	0.89	117.50	0.01
-	8	1.66	5.55	112.50	0.01
3.0	14	1.67	6.24	99.00	0.02
-	20	1.23	7.77	95.00	0.02
-	28	1.64	8.62	74.00	0.02
-	36	1.62	8.60	72.50	0.02
-	0	1.68	1.07	129.50	---
-	3	1.67	1.49	125.00	0.01
-	8	1.72	3.01	117.50	0.01
3.5	14	1.80	1.68	110.00	0.01
-	20	1.28	6.90	100.00	0.01
-	28	1.65	9.14	90.00	0.01
-	36	1.80	7.59	90.00	0.01
-	0	1.68	1.50	125.00	---
-	3	1.65	2.73	125.00	0.01
4.0	8	1.64	3.02	115.00	0.01
-	14	1.64	3.02	115.00	0.01



Tabla 7  
Efecto del etanol en la producción de ácido cítrico por *A. niger* 46890.  
Fermentación 2. pH = 2.02

Concent. etanol (%)	Tiempo (días)	pH	Biomasa (g/L)	Azúcar Residual (g/L)	Acido Cítrico (g/L)
-	0	1.93	1.10	140.00	---
-	3	1.63	9.38	135.00	0.03
-	7	1.66	9.20	110.00	0.48
0	14	1.64	14.78	77.50	3.35
-	21	1.65	20.23	70.00	3.73
-	28	1.64	19.13	62.50	4.95
-	36	1.62	30.05	55.00	6.25
-	0	1.97	0.46	135.00	---
-	3	1.76	1.66	122.50	0.03
-	7	1.91	5.94	105.00	2.60
-	14	1.56	9.34	95.00	4.10
1.0	21	1.72	16.13	77.50	4.35
-	28	1.66	14.11	75.00	8.50
-	36	1.64	19.79	62.50	8.00
-	0	1.97	0.96	140.00	---
-	3	1.88	4.98	140.00	0.02
-	7	1.69	8.38	125.00	0.63
2.0	14	1.60	11.79	85.00	1.23
-	21	1.74	17.15	77.50	1.23
-	28	1.69	13.28	75.00	1.10
-	36	1.66	19.79	55.00	0.85
-	0	1.98	0.48	117.50	---
-	3	1.94	1.12	110.00	0.01
-	7	1.82	2.93	100.00	0.01
3.0	14	1.60	7.88	95.00	1.10
-	21	1.71	7.88	95.00	15.50
-	28	1.62	10.00	70.00	26.00
-	36	1.59	12.06	45.00	25.00
-	0	1.97	0.64	135.00	---
-	3	1.94	0.74	125.00	---
-	7	1.88	0.64	117.50	0.01
3.5	14	1.61	7.49	105.00	0.30
-	21	1.72	7.88	100.00	0.85
-	28	1.68	6.43	---	1.10
-	36	1.66	13.20	---	1.10
-	0	2.00	0.46	125.00	---
-	3	1.95	0.54	125.00	0.01
-	7	1.95	0.58	117.50	0.01
4.0	14	1.86	1.34	117.50	0.01
-	21	1.72	6.84	105.00	2.48
-	28	1.65	9.04	85.00	---
-	36	1.63	13.12	75.00	2.48



Tabla 8  
Valores del parámetro K y el coeficiente de correlación r según la ecuación:  
 $X^{1/3} = X_0^{1/3} + Kt$

Fermentación	Conc. Metanol (%)	K (días <sup>-1</sup> )	r	Conc. Etanol (%)	K (días <sup>-1</sup> )	r
1	0.0	0.09	0.95	0.0	0.10	0.94
	1.0	0.08	0.96	1.0	0.09	0.95
2	0.0	0.03	0.94	0.0	0.22	0.86
	2.0	0.05	0.94	3.0	0.48	0.99

de etanol afectan considerablemente los parámetros antes mencionados.

Para una segunda fermentación los resultados se muestran en la Tabla 7, observándose que la adición de un 3% de etanol incrementó la producción de ácido cítrico, coincidiendo esto con lo reportado por Manonmani y Sreekantiah [4] en sus investigaciones.

Los resultados para el crecimiento del hongo *A. niger 46890* se ajustaron al modelo propuesto por Righelato y col. [14, 15] que establece una relación cúbica entre la concentración de biomasa, X y el tiempo, t según la ecuación:

$$X^{1/3} = X_0^{1/3} + Kt,$$

para el caso de hongos y microorganismos filamentosos en los cuales la masa y la morfología del pellet varían con el crecimiento.

Las Figuras 1 y 2, representan la aplicación de este modelo a las fermentaciones realizadas sin adición de metanol o etanol (control) y para la concentración de éstos a la cual se obtuvo una mayor cantidad de ácido.

La Tabla 8 muestra los valores del parámetro K, y los coeficientes de correlación, r, obtenidos del ajuste de los resultados experimentales al modelo. Se observa que la presencia de metanol y etanol en el medio produce un mejor ajuste de estos resultados experimentales de crecimiento al modelo, lo que puede indicar que el alcohol no sólo influye en la permeabilidad del

pellet para la excreción del ácido, sino también en el crecimiento y la formación del pellet.

### Conclusiones

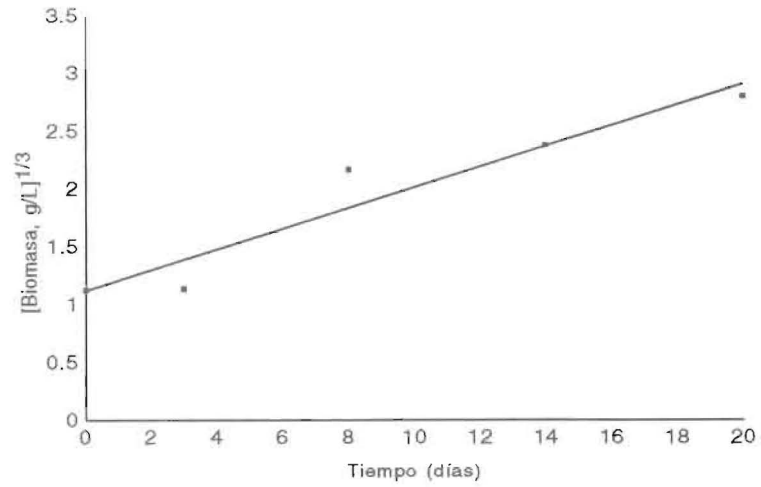
El metanol demostró ser un mejor agente estimulante en la producción de ácido cítrico. Sin embargo, a concentraciones de 3.5% y 4% disminuyó la producción de ácido cítrico y la cantidad de biomasa. El etanol incrementó la concentración de ácido cítrico para niveles de 1% y 3%. Concentraciones de 3.5% y 4% redujeron la producción del mismo. A concentraciones superiores de 3.5%, estos alcoholes ejercen un efecto tóxico sobre la biomasa.

El crecimiento del hongo se ajustó al modelo:  $X^{1/3} = X_0^{1/3} + Kt$ . La presencia de metanol y etanol en el medio mejoró el ajuste de los resultados experimentales al modelo.

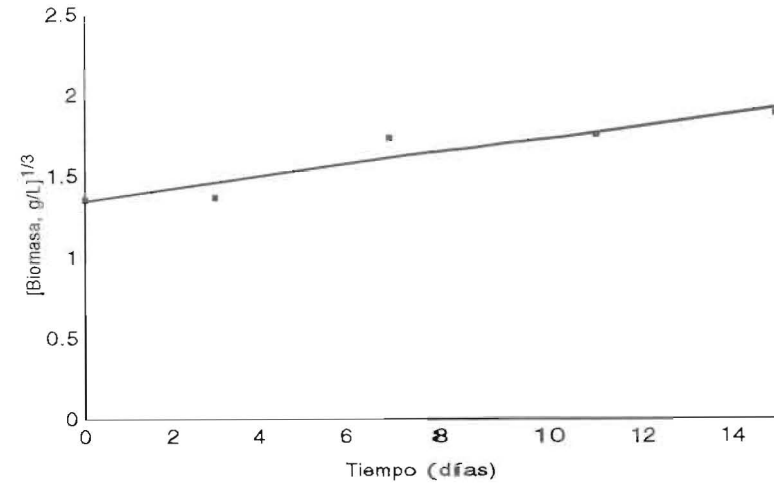
Los resultados indicaron que el *A. niger 46890* es una cepa productora de ácido cítrico, tolerante inicialmente a la concentración de metales presentes en el medio, esta capacidad del hongo sufrió modificaciones durante el almacenamiento, lo cual determinó las diferencias bajo las mismas condiciones físico-químicas.

### Agradecimiento

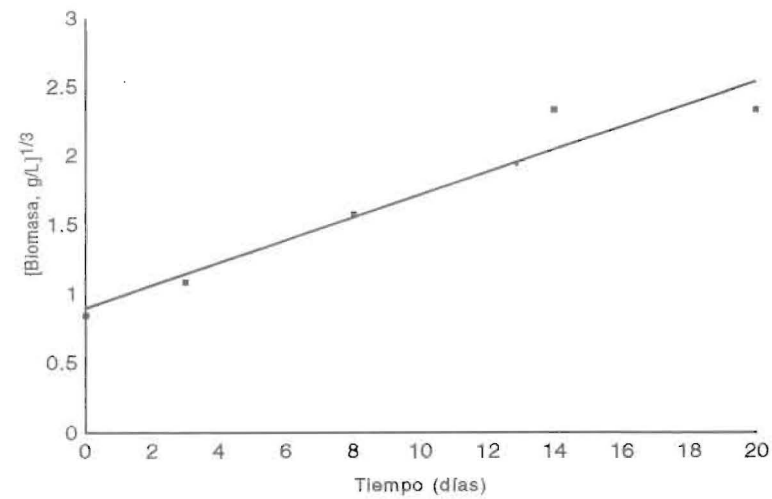
Se agradece al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) el financiamiento a esta investigación.



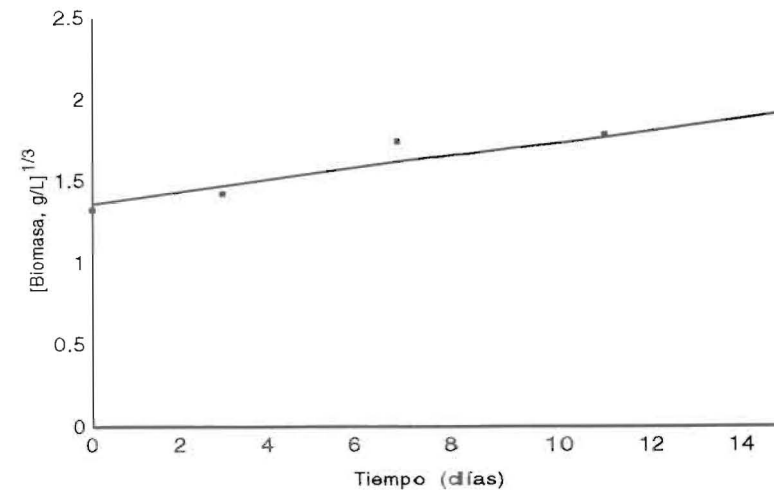
Metanol 0% Fermentación 1



Metanol 0% Fermentación 2



Metanol 1% Fermentación 1



Metanol 2% Fermentación 2

Figura 1. Modelamiento del crecimiento del *A. niger* 46890 en la fermentación cítrica.

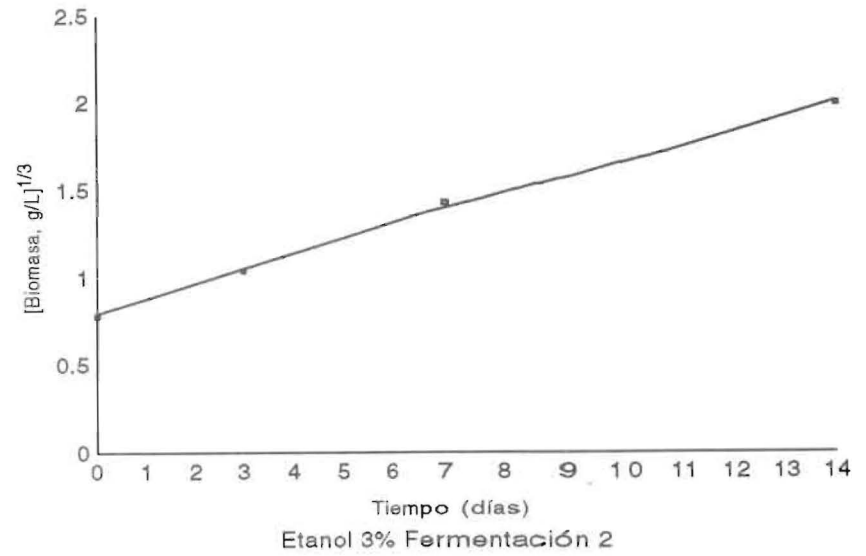
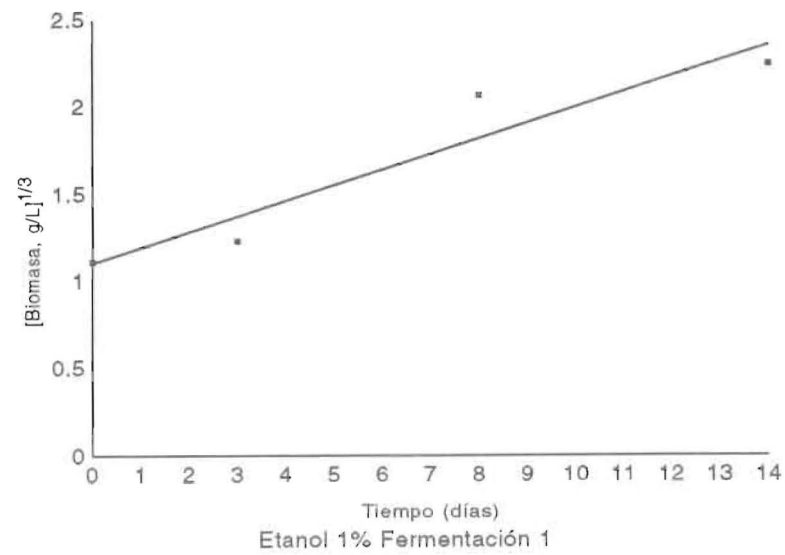
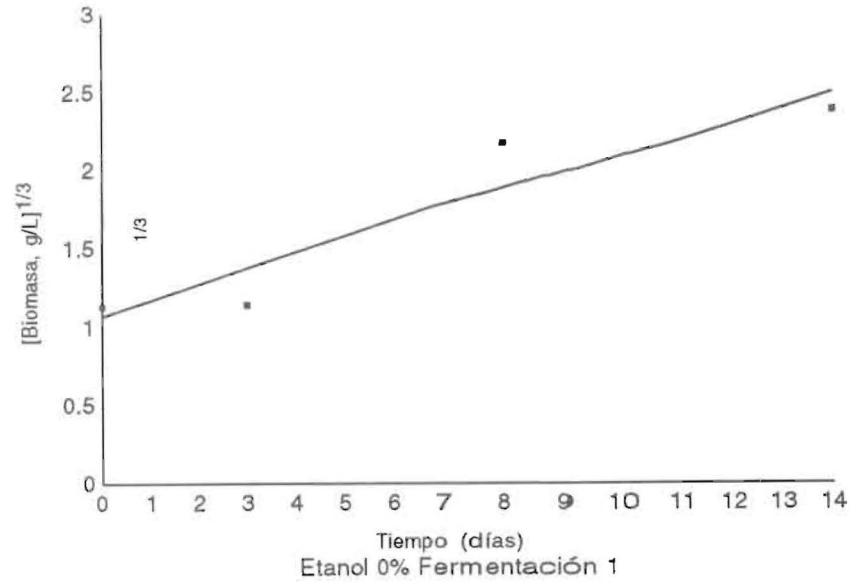
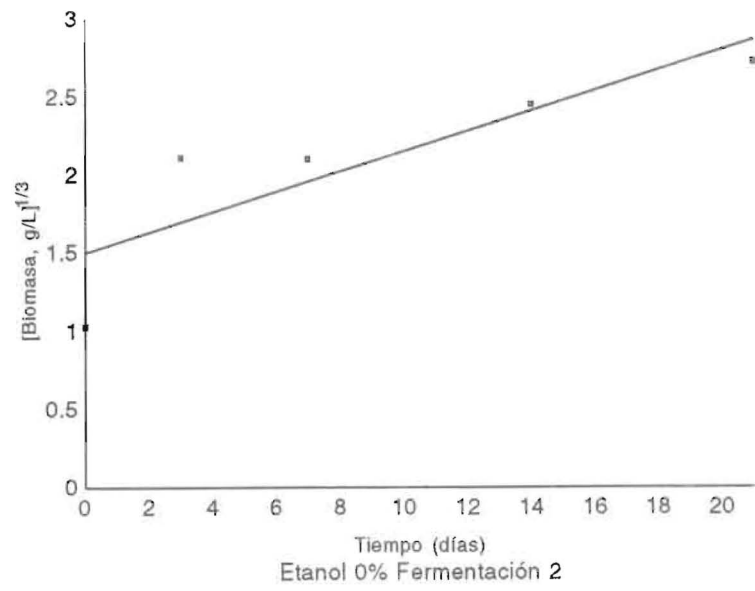


Figura 2. Modelamiento del crecimiento del *A. niger* 46890 en la fermentación cítrica.

### Referencias Bibliográficas

1. Rohr, M.; Kubicek, C. Regulatory Aspects of Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger*. Process Biochemistry, June/July, 1981, 34-37.
2. Hassan, M.T.; Baig, S.J.; Chugtal, M.I.D; Qadeer, M.A. Effect of Toxic Chemicals on Citric Acid Production by *Aspergillus niger*. Pakistan J. Sci. Ind. Res; Vol. 26, No. 2, Abril 1983, 107-110.
3. Kumar, K.; Ethiraj S. Influence of Methanol and groundnut oil on Citric Acid production from sugar cane juice by *Aspergillus niger* International Sugar Journal. Vol. 78, 1976, 13-15.
4. Manonmani, H; Sreekantiah, K. Effect of additives on Citric Acid production by *Aspergillus niger*. J. Fd. Sci. Technol, Vol. 25, No. 3, 1988, 159-161
5. Prescott, S.; Dunn, C. Industrial Microbiology. McGraw-Hill Book Co. Fourth Edition. 1987.
6. Bhatt, C. S., Agarwal, P.K. and Viswanathan, L. in 44th Convention of Sugar Technologists of India. 1979, 75G. Original no consultado.
7. Roukas, T.; Kotzekidou, P. Influence of some trace metals and stimulants on Citric Acid Production from brewery wastes by *Aspergillus niger*. Enzyme Microb. Technol., Vol. 9, May. 1987, 291 - 294.
8. Hand, Y.; Woodams, E. Utilization of Grape Pomace for Citric Acid Production by Solid State Fermentation. Am. J. Enol. Vitic, Vol. 37, No. 2, 1986, 141 - 142.
9. Benuzzi, A.; Segovia, R. Estudio sobre la Preselección de Cepas de *Aspergillus niger* Destinadas a la Producción de Acido Cítrico. Acta Científica Venezolana. 40. 1989, 195 - 197.
10. Shu, P.; Johnson. Journal Bacteriological. 56, 1948, 577.
11. Pir, S. J. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell, Scientific Publications. London. 1975.
12. Marier, J. R.; Boulet, M. Direct Determination of citric Acid in Milk with an Improved Pyridine - Acetic Anhidride Method. Journal Dairy Science. 41. 1958, 1683 - 1692.
13. Dubois, M.; Gilles, K. A; Hamilton, J.K. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. 28 (3). 1956 350 - 356.
14. Bailey, James; Ollis, David. Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition. 1986.
15. Quintero, R. Ingeniería Bioquímica. Departamento de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 3. 1981, 43 - 46.

Recibido el 18 de Febrero de 1994

En forma revisada el 3 de Marzo de 1995