

PRODUKSI ASAM SITRAT OLEH *Aspergillus niger* PADA KULTIVASI MEDIA CAIR

Kirana Sanggrami Sasmitaloka^{1*}

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No. 12, Cimanggu, Bogor, Indonesia, 16114

*Email: kirana.sanggrami@gmail.com

Abstrak

Asam sitrat merupakan asam organik yang banyak digunakan dalam industri makanan, minuman, farmasi, kosmetik, pertanian, dan kimia. Asam sitrat dapat diproduksi melalui proses fermentasi mikroorganisme penghasil asam sitrat. *Aspergillus niger* merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan pada proses produksi asam sitrat. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari proses produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* menggunakan kultivasi media cair. Pengamatan dilakukan terhadap pH, biomassa, gula sisa (substrat sisa), absorbansi, total asam dan rendemen (*yield*) yang dihasilkan. Sumber karbon yang digunakan adalah gula pasir, sedangkan sumber nitrogen yang digunakan adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Hasil penelitian menunjukkan produksi asam sitrat maksimum sebesar 11,904 g/l pada hari ke-4, laju pertumbuhan spesifik maksimum sebesar 0,03 hari⁻¹, $Y_{p/x}$ adalah 1,881 g asam sitrat/g biomassa, $Y_{p/s}$ adalah 1,881 g asam sitrat/ppm substrat, dan $Y_{x/s}$ adalah 0,016 g biomassa/ppm substrat.

Kata Kunci: Asam Sitrat, *Aspergillus niger*, Kultivasi Cair

Abstract

Citric acid is the most widely used organic acid in food, beverage, pharmacy, cosmetics, agriculture, and chemical industries. Citric acid can be produced by fermentation of microorganisms producing citric acid. Aspergillus niger is a microorganism which can be used in production of citric acid. This research aimed to study the process of citric acid's production by Aspergillus niger using submerged cultivation medium. Observations were carried out on the pH, biomass, residual sugar (residual substrate), absorbance, total acid and yield. Carbon source used was sugar, while nitrogen source used was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The results showed maximum citric acid production was 11,904 g/l on day-4, maximum specific growth rate was 0,03 on day-1, $Y_{p/x}$ 1,881 g citric acid/g biomass, $Y_{p/s}$ 1,881 g citric acid/ppm substrates, and $Y_{x/s}$ 0,016 g biomass/ppm substrates.

Keywords: *Aspergillus niger*, Citric Acid, Submerged Cultivation

1. PENDAHULUAN

Asam sitrat merupakan salah satu produk komersial yang penting di dunia maupun di Indonesia. Di Indonesia, 65% konsumsi asam sitrat berada di industri makanan dan minuman, 20% berada di industri deterjen rumah tangga dan sisanya berada di industri tekstil, farmasi, kosmetik dan lainnya. Besarnya pemanfaatan asam sitrat pada industri makanan dan minuman karena sifat asam sitrat menguntungkan dalam pencampuran, yaitu kelarutan relatif tinggi, tak beracun dan menghasilkan rasa asam yang disukai. Kegunaan lain, yaitu sebagai pengawet,

pengecegah kerusakan warna dan aroma, menjaga turbiditas, penghambat oksidasi, penginvert sukrosa, penghasil warna gelap pada kembang gula, jam dan jelly, pengatur pH.

Asam sitrat dapat diproduksi melalui ekstraksi sederhana, proses fermentasi menggunakan mikroorganisme, dan proses sintesa secara kimia. Proses ekstraksi sederhana telah lama ditinggalkan seiring dengan pengembangan metode fermentasi. Sedangkan sintesa secara kimia belum bisa sepenuhnya diterima konsumen karena faktor keamanan pangan produk yang dihasilkan. Produksi

asam sitrat melalui proses fermentasi menggunakan mikroba dinilai prospektif untuk diterapkan di industri.

Asam sitrat dapat diproduksi dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme melalui proses fermentasi (Darouneh *et al.*, 2009; Pallares *et al.*, 1996; Manafaati 2011; dan Demirel *et al.*, 2005). Mikroorganisme yang banyak digunakan dalam produksi asam sitrat diantaranya *Penicillium glaucum*, *Candida oleophila* (Anastasisdis dan Rehm, 2005), *A. niger* (Angumeenal dan Venkappayya, 2005; Cevrimli *et al.*, 2009; Cevrimli *et al.*, 2010; Dhillon *et al.*, 2013), *Aspergillus awamori* (Max *et al.*, 2010), *Aspergillus nidulans* (Max *et al.*, 2010), *Hansenula anamola* (Soccol *et al.*, 2006) dan *Yarrowia lipolytica* (Wojtatowics *et al.*, 1993; Karasu Yalcin *et al.*, 2010).

Aspergillus niger merupakan mikroorganisme utama yang digunakan di industri untuk produksi asam sitrat karena menghasilkan lebih banyak asam sitrat per satuan waktu dan juga kemampuannya untuk memproduksi asam sitrat dari bahan yang murah (Soccol *et al.*, 2006). Papagianni (2007) menyebutkan bahwa secara teori, produksi asam sitrat menggunakan *Aspergillus niger* dapat menghasilkan rendemen 70%.

Pembentukan asam sitrat secara fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yang dapat memberikan pengaruh pada komposisi medium, baik komponen makro maupun *trace element* yang dapat mempengaruhi proses ekskresi asam sitrat oleh mikroba. Sumber karbon yang digunakan adalah gula pasir dan ekstrak tauge, sedangkan sumber nitrogen yang digunakan adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Produksi asam sitrat menggunakan kultivasi cair banyak diaplikasikan di industri. Hal ini karena kultivasi cair memiliki beberapa keunggulan, yaitu rendemen yang dihasilkan tinggi, waktu fermentasi lebih singkat, biaya perawatan murah, dan resiko kontaminasi yang lebih kecil.

Penelitian tentang produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* telah banyak dilakukan. Akan tetapi, penelitian tentang fenomena pertumbuhan mikroba pada produksi asam sitrat menggunakan kultivasi cair belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari fenomena pertumbuhan mikroba pada proses produksi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* menggunakan kultivasi cair, meliputi laju pertumbuhan spesifik, koefisien Y_p/s , koefisien Y_x/s , dan koefisien Y_p/x .

2. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini terdiri dari tiga bagian, yaitu mikroorganisme, medium propagasi, dan medium fermentasi. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Aspergillus niger*. Medium propagasi yang digunakan adalah gula pasir 15 gram, ekstrak tauge 20% (b/v) 11 ml, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 450 mg, KH_2PO_4 225 mg. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam 100 ml akuades, pH diatur menjadi 6. Medium fermentasi yang digunakan adalah gula pasir 15% (b/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6% (b/v), KH_2PO_4 0,3% (b/v)

dengan pH 6. Sedangkan alat yang digunakan adalah tabung reaksi, otoklaf, labu erlenmeyer, neraca, inkubator goyang, kertas saring, spektrofotometri visible (Spektro Vis), buret, dan gelas kimia.

2.2. Metode

Sebelum dipropagasi, dilakukan pengecekan apakah *Aspergillus niger* siap digunakan. Pada umumnya digunakan *Aspergillus niger* dalam agar miring yang berumur 5 hari. Media propagasi dibuat dengan komposisi tersebut dengan memisahkan antara gula dari bahan lainnya. Selanjutnya sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan. Inokulasi dilakukan dengan suspensi spora *Aspergillus niger* sebanyak 2% (v/v). Hasil inokulasi media propagasi yang telah diinkubasi ini disebut inokulum. Inkubasi dilakukan pada inkubator goyang pada suhu $29 \pm 1^\circ\text{C}$ (suhu kamar) selama 24 jam. Media fermentasi disiapkan dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan. Inokulum diinokulasikan sebanyak 2%. Sampel diambil setiap hari selama 5 hari. Parameter yang diamati meliputi:

- pH
pH cairan fermentasi diukur menggunakan pH meter.
- Biomassa
Cairan fermentasi disaring menggunakan kertas saring yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya. Biomassa dihitung sebagai bobot residu kering hasil penyaringan per ml cairan kultivasi
- Gula sisa
Gula sisa diukur menggunakan metode DNS dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometri visible (Spektro Vis) pada panjang gelombang 550 nm.
- Total asam
Pengukuran asam organik dilakukan dengan metode titrasi. Penentuan kadar total asam organik tertitrasi adalah :

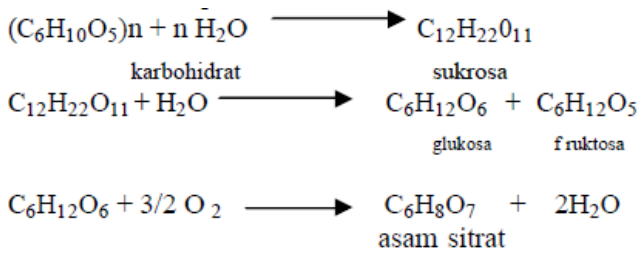
$$\text{Total asam} : \frac{\text{ml NaOH} \times \text{Normalitas NaOH} \times 192}{10 \text{ ml sampel}} \text{ mg/ml}$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses fermentasi asam sitrat merupakan salah satu cabang bioteknologi yang memanfaatkan agen biologis (mikroba) antara lain jamur. Proses fermentasi tersebut, terdiri dari dua tahap yaitu fasa pertumbuhan miselium dan fasa pembentukan produk. Kedua tahap ini dibedakan berdasarkan laju penyerapan karbohidrat (gula total). Media fermentasi untuk produksi asam sitrat terdiri dari nutrien yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba terutamasumber karbon, unsur kelumit (*trace element*), nitrogen, dan fosfor, juga diperlukan air dan

udara. Kondisi proses yang berpengaruh adalah pH, suhu, kecepatan pengadukan dan aerasi. Produksi asam sitrat dapat dilakukan melalui permukaan (*surface fermentation*) maupun fermentasi terendam (*submerged fermentation*).

Proses fermentasi ini diharapkan mampu menghasilkan asam sitrat yang optimum melalui proses produksi yang efisien dan memperbesar nilai tambah yaitu dengan bahan baku yang murah didapat produk yang lebih banyak nilainya. Reaksi pembentukan asam sitrat adalah:



(Syamsuriputra *et al.*, 2006)

Secara alami asam sitrat merupakan produk metabolisme primer, tidak diekskresi oleh mikroorganisme dalam jumlah yang cukup berarti dan penggunaan *Aspergillus niger* dapat menekan produk-produk samping yang tidak diinginkan seperti asam oksalat, asam isositrat dan asam glukonat. Selain itu pemilihan bahan baku perlu dilakukan, agar *yield* yang didapatkan tinggi, yaitu bahan dengan kandungan gula total tinggi (Sumo *et al.*, 1993).

Pada proses produksi asam sitrat dengan kultivasi cair, diperlukan adanya sumber karbon, nitrogen, dan mineral. Menurut Dulmage dan Rhodes (1971), karbon adalah bahan utama untuk mensintesis sel baru atau produk sel. Sumber karbon yang digunakan selama proses kultivasi adalah gula pasir.

Nitrogen yang dibutuhkan mikroorganisme biasanya dipenuhi oleh garam amonium. Dalam hal ini sering nitrogen organik harus disediakan dalam bentuk asam amino tunggal atau bahan kompleks termasuk asam nukleat dan vitamin. Sumber nitrogen yang digunakan selama proses kultivasi adalah $(NH_4)_2SO_4$.

Pada kultivasi cair, parameter yang diamati adalah pH, total asam, gula sisa, biomassa, dan absorbansi. Kurva hasil pengamatan terhadap pH, total asam dan biomassa pada produksi asam sitrat dengan kultivasi cair disajikan pada Gambar 1.

pH medium dalam proses fermentasi sangat penting. Hal ini karena penurunan pH mengindikasikan terbentuknya asam sitrat. Pada proses awal fermentasi diketahui bahwa pH medium sebesar 6 kemudian menurun pada hari ke-1 sebesar 5. Nilai pH mengalami penurunan kembali pada hari ke-2 sampai hari ke-5 menjadi sebesar 3,0. Berdasarkan data pada Gambar 1, penurunan pH selama waktu kultivasi mengindikasikan terbentuknya asam sitrat dalam kultivasi cair

pH pada media juga mempengaruhi produksi asam sitrat dari *Aspergillus niger* karena beberapa enzim yang berperan dalam siklus TCA sensitif terhadap pH. Produksi asam sitrat akan optimal dengan pH sekitar 2. Jika kondisi tersebut tidak diperoleh hasil produksi akan berkurang (Mattey, 1992). Papagianni (1995) dan Papagianni *et al.* (1999) melaporkan bahwa pH mempengaruhi morfologi dan produktivitas asam sitrat dari *Aspergillus niger* dari hasil data kuantitatif. Morfologi dengan agregat yang kecil dan filamen yang pendek berkaitan dengan meningkatnya produksi asam sitrat pada pH sekitar $2,0 \pm 0,2$. Pada pH 1,6 morfologi akan berkembang abnormal (*bulbous hyphae*) dan produksi asam sitrat akan menurun secara drastis. Pada pH 3,0 agregat mempunyai bentuk perimeter yang lebih panjang dan terbentuk asam oksalat.

Produksi asam sitrat meningkat selama proses fermentasi dan maksimum pada hari ke-4 sebesar 11,904 g/l. Pada hari ke-5, produksi asam sitrat mengalami penurunan menjadi 11,520 g/l. Penurunan tersebut disebabkan karena berkurangnya substrat dan nutrisi yang diperlukan mikroba dalam memproduksi asam sitrat. Sehingga pada hari ke-5, mikroba mengalami fase penurunan (kematian).

Pada pembentukan asam sitrat dalam proses fermentasi dibatasi oleh ketersediaan beberapa unsur kelumit (P, Mn, Zn). Peranan ion logam dalam proses ini belum diketahui secara menyeluruh. Nilai pH optimum sekitar 1,7 - 2,0. Jika pH lebih tinggi (alkalis) menyebabkan pembentukan asam - asam oksalat dan glukonat dalam jumlah banyak. Karenanya pengendalian kondisi proses secara cermat merupakan prasyarat untuk mempertahankan keteraturan metabolik dan mendukung pembentukan asam sitrat yang lebih banyak. Kondisi yang sesuai tersebut memungkinkan stimulasi glikolisis untuk penyediaan aliran karbon yang tidak terbatas ke dalam metabolisme antara. Akumulasi sitrat selanjutnya tergantung pada pemasokan oksaloasetat (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994).

Kekurangan mangan akan menurunkan aktivitas enzim dalam siklus asam trikarboksilat yang diikuti oleh penurunan anabolisme. Gangguan metabolisme ini menyebabkan perbedaan tingkat ion amonium intraseluler yang dapat membantu menghilangkan penghambatan enzim fosfofruktose oleh sitrat. Mangan juga terlibat dalam biokimia permukaan sel dan morfologi hifa. Kebutuhan oksigen yang tinggi memungkinkan reoksidasi sitoplasma NADH tanpa pembentukan ATP dan melibatkan suatu cabang respirasi alternatif yang berbeda dari rantai respirasi normal.

Bobot kering biomassa yang dihasilkan berkisar 0,37 - 1,03 g/l. Pada hari ke-1 kultivasi, bobot kering biomassa yang dihasilkan sebesar 0,37 g/l. Bobot kering biomassa mengalami kenaikan yang signifikan pada hari ke-3, yaitu sebesar 1,03 g/l. Hal ini disebabkan karena pada awal kultivasi substrat masih tersusun dalam rantai karbon panjang. Adanya enzim yang dihasilkan akan menghidrolisis pati yang terkandung dalam substrat, sehingga substrat

terdegradasi menjadi rantai-rantai karbon yang lebih pendek.

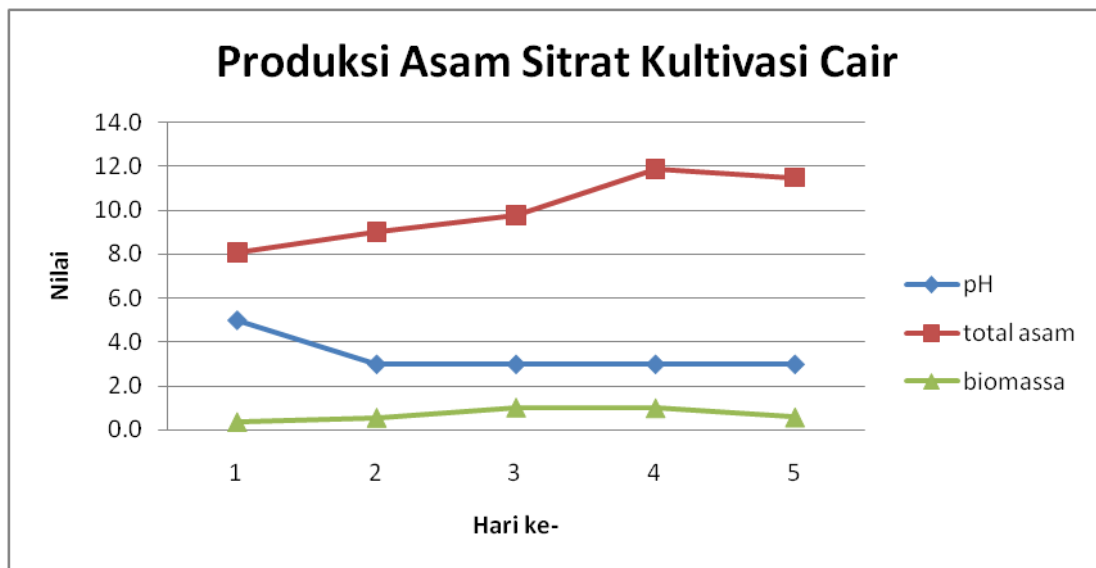
Bobot kering biomassa mengalami penurunan pada hari ke-4 menjadi sebesar 1,0 g/l dan terus menurun pada hari ke-5 menjadi sebesar 0,58 g/l. Pengukuran terhadap bobot kering biomassa tidak hanya mengukur sel hidup saja, tapi juga sel mati, spora. Setelah mencapai pertumbuhan optimal pada akhir fase stasioner dapat pula mengindikasikan mulai terjadinya fase kematian. Pada fase ini sel-sel *Aspeergillus niger* mengalami lisis sehingga mengurangi bobot biomassa yang terukur. Hal ini disebabkan karena massa sel yang telah lisis tersebut sebagian akan hilang dikonversi menjadi energi yang dimanfaatkan oleh sel-sel yang masih hidup sebagai sumber energi untuk pertumbuhannya.

Penurunan bobot biomassa kering di atas dapat juga terjadi karena mulai berkurangnya substrat sehingga sel-sel *Aspergillus niger* mengalami kekurangan sumber makanan dan energi untuk pertumbuhan dan perkembangannya.

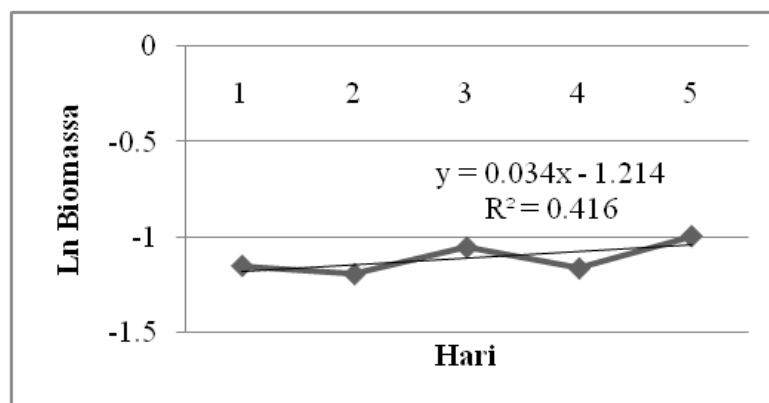
Tabel 1. Hasil Pengamatan Gula Sisa dan Absorbansi ($\lambda = 550 \text{ nm}$) pada Produksi Asam Sitrat dengan Kultivasi Cair

Hari ke-	Absorbansi	Gula Sisa (ppm)
1	0,99	23,47
2	0,98	23,30
3	0,83	19,94
4	0,83	19,90
5	0,81	19,50

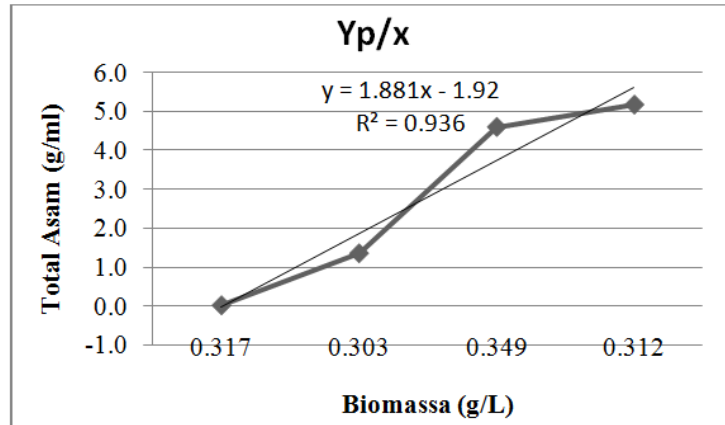
Pengukuran gula sisa selama kultivasi bertujuan untuk mengetahui keberadaan substrat pada kultivasi. Berdasarkan Gambar 1, gula sisa (substrat) pada kultivasi cair mengalami penurunan selama waktu kultivasi berlangsung. Pada hari pertama, gula sisa sebesar 23,47 ppm. Sedangkan pada hari ke-5, gula sisa berkurang menjadi 19,50 ppm. Pengukuran gula sisa berkorelasi dengan nilai absorbansi yang diperoleh. Gula sisa berbanding lurus dengan nilai absorbansinya (Tabel 1).



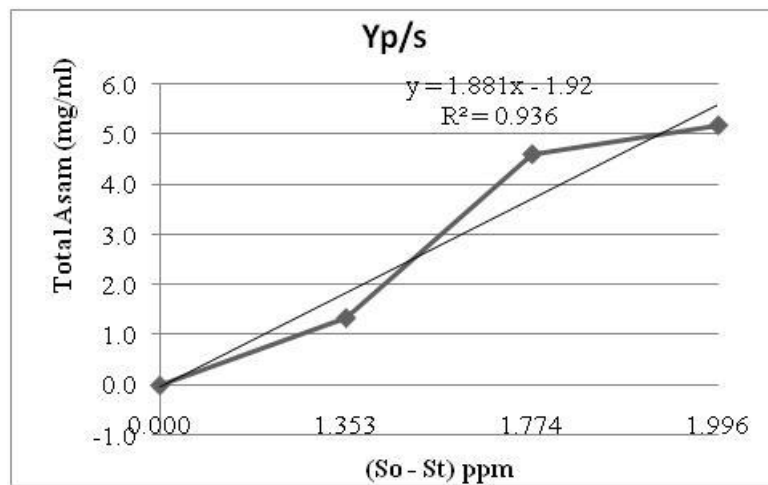
Gambar 1. Kurva pH, Total Asam dan Biomassa pada Produksi Asam Sitrat dengan Kultivasi Cair



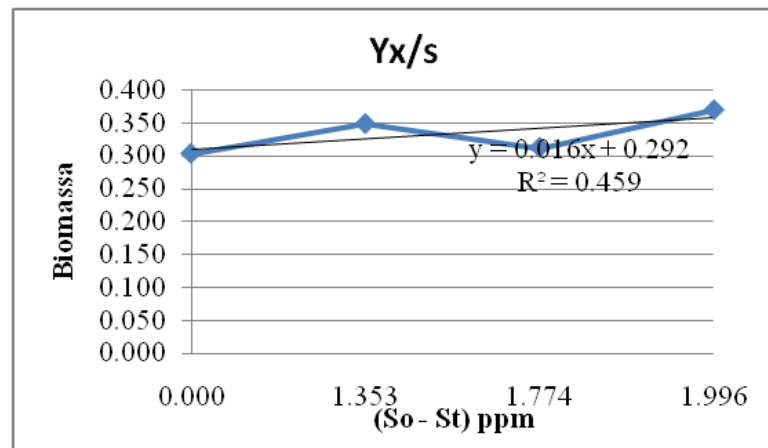
Gambar 2. Kurva Laju Pertumbuhan Spesifik pada Produksi Asam Sitrat dengan Kultivasi Cair



Gambar 3. Kurva Yp/x pada Produksi Asam Sitrat dengan Kultivasi Cair



Gambar 4. Kurva Yp/s pada Produksi Asam Sitrat dengan Kultivasi Cair



Gambar 5. Kurva Yx/s pada Produksi Asam Sitrat dengan Kultivasi Cair

Apabila nilai gula sisa mengalami penurunan, maka nilai absorbansinya juga akan mengalami penurunan. Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai absorbansi pada asam sitrat akan menurun selama waktu kultivasi. Hal ini mengindikasikan bahwa gula telah dikonsumsi mikroba.

Teknik evaluasi suatu populasi mikroba baik secara kuantitatif maupun kualitatif dapat digunakan untuk memantau dan mengkaji fenomena pertumbuhan. Fenomena pertumbuhan mikroba dapat dilihat melalui laju pertumbuhan spesifiknya. Kurva laju pertumbuhan spesifik pada produksi asam sitrat dengan kultivasi cair disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2, dinyatakan bahwa $y = a + bx$, dimana b adalah *slope* dan dapat dinyatakan sebagai laju pertumbuhan spesifik maksimal (μ_{maks}). Sehingga nilai μ_{maks} pada kultivasi cair adalah $0,03 \text{ hari}^{-1}$. Selain menentukan μ_{maks} , dari data yang ada juga dapat diperoleh nilai rendemen produk per biomassa (Yp/x), rendemen produk per substrat (Yp/s), dan rendemen biomassa terhadap substrat (Yx/s). Kurva Yp/x disajikan pada Gambar 3. Kurva Yp/s disajikan pada Gambar 4 dan kurva Yx/s disajikan pada Gambar 5.

Yield dapat diperoleh dari *slope* pada kurva. Pada kurva diperoleh persamaan $y = bx + a$. Nilai b merupakan *slope* dan dinyatakan sebagai *yield*. Pada Gambar 3 diperoleh persamaan $y = 1,881x - 1,92$, maka nilai Yp/x adalah $1,881 \text{ g asam sitrat/g biomassa}$. Berdasarkan data tersebut, dapat diketahui bahwa setiap penambahan biomassa yang dihasilkan sebesar 1 gram akan terjadi penurunan jumlah asam sitrat yang dihasilkan sebesar $1,881 \text{ gram}$. Semakin tinggi jumlah biomassa yang dihasilkan maka akan menurunkan jumlah asam sitrat yang dihasilkan. Oleh karena itu produksi biomassa dalam pembuatan asam sitrat harus dibatasi sehingga akan didapatkan nilai rendemen yang tinggi.

Yp/s menunjukkan perbandingan antara produk yang dihasilkan dengan asam sitrat yang terbentuk. Pada Gambar 4 diperoleh persamaan $1,881x - 1,92$, maka nilai Yp/s adalah $1,881 \text{ g asam sitrat/ppm substrat}$. Hal ini menunjukkan bahwa dalam 1 ppm glukosa akan didapatkan produk asam sitrat sebesar $1,881 \text{ gram}$. Semakin tinggi konsentrasi nutrisi maka jumlah asam sitrat yang dihasilkan akan semakin tinggi.

Koefisien Yx/s menunjukkan perbandingan antara nilai biomassa dengan konsentrasi media yang digunakan. Pada Gambar 5, diperoleh persamaan $y = 0,016x + 0,292$. Maka nilai Yx/s adalah $0,016 \text{ g biomassa/ppm substrat}$. Hal ini menunjukkan bahwa dalam konsentrasi gula sebesar 1 ppm akan didapatkan jumlah biomassa sebesar $0,016 \text{ gram}$.

Produksi asam sitrat akan terus meningkat sampai nutrisi yang terkandung dalam media habis. Jika nutrisi yang terkandung dalam media habis maka mikroba akan menghentikan fase eksponensialnya dan akan berubah menjadi fase stasioner kemudian fase kematian. Semakin tinggi konsentrasi nutrisi dalam media yang digunakan maka akan didapatkan konsentrasi atau rendemen produk yang tinggi.

Sementara itu, semakin lama waktu fermentasi yang berlangsung, maka kadar nutrisi yang terkandung dalam media akan semakin habis dan kadar gula sisa yang ada dalam media akan semakin menurun. Hasil pengamatan menunjukkan semakin tinggi jumlah biomassa yang dihasilkan maka akan menurunkan jumlah asam sitrat. Semakin tinggi konsentrasi nutrisi maka jumlah asam sitrat yang diperoleh juga akan semakin tinggi.

4. KESIMPULAN

pH merupakan indikator penting dalam produksi asam sitrat. pH akan menurun jika terbentuk asam sitrat. Pada kultivasi cair, nilai pH menurun sampai 3 pada akhir kultivasi. Produksi asam sitrat ditunjukkan dengan nilai total asam. Produksi asam sitrat maksimum sebesar $11,904 \text{ g/l}$ pada hari ke-4. Laju pertumbuhan spesifik maksimum sebesar $0,03 \text{ hari}^{-1}$, Yp/x adalah $1,881 \text{ g asam sitrat/g biomassa}$. Nilai Yp/s adalah $1,881 \text{ g asam sitrat/ppm substrat}$. Nilai Yx/s adalah $0,016 \text{ g biomassa/ppm substrat}$.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Anastasisdis, S.; Rehm, H. J., Continuous Production of Citric Acid Secretion by A High Specific pH Dependent Active Transport System in Yeast *Candida oleophila*, ATCC 20177. Electronic Journal of Biotechnology, 2005, 8, 26-42.
- Angumeenal, A. R.; Venkappayya, D., Effect of Transition Metal Ions on The Metabolism of *Aspergillus niger* in The Production of Citric Acid With Molasses as Substrate. Journal of Scientific and Industrial Research, 2005, 64, 125-128.
- Cevrimli, B. S.; Kariptas, E.; Ciftci, H., Effects of Fermentation Conditions on Citric Acid Production from Beet Molasses by *Aspergillus niger*, Asian Journal of Chemistry, 2009, 21, 3211-3218.
- Cevrimli, B. S.; Yasar, A.; Kariptas, E., Effect of O-Cresol, Resorcinol and Hydroquinone on Citric Acid Productivity by *Aspergillus niger* in Stirred Fermentor. Asian Journal of Chemistry, 2010, 22, 699-704.
- Darouneh, E.; Alavi, A.; Vosoughi, M.; Arjmand, M.; Seifkordi, A.; Rajabi, R., Citric Acid Production: Surface Culture Versus Submerged Culture. African Journal of Microbiology Research, 2009, 3(9), 541-545.
- Demirel, G.; Yaykaşli, K.O.; Yaşar, A., The Production of Citric Acid by Using Immobilized *Aspergillus niger* A-9 and Investigation of Its Various Effects. Food Chemistry, 2005, 89, 393-396.
- Dhillon, G.S.; Satinder, K.B.; Surinder, K.; Mausam, V., Bioproduction and Extraction Optimization of Citric Acid from *Aspergillus niger* by Rotating Drum Type Solid-State Bioreactor. Industrial Crops and Products, 2013, 41, 78 - 84.
- Dulmage, H. T.; Rhodes, R.A., Production of Pathogens in Artificial Media, In : Burges, H.D. (ed).

Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980. New York: Acad Press, 1971, hal. 507.

- Karasu Yalcin, S.; Bozdemir, M. T.; Ozhas, Effects of Different Fermentation Conditions on Growth and Citric Acid Production Kinetics of Two *Yarrowia lipolytica* Strains. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2010, 24, 347-360.
- Manfaati, R., Pengaruh Komposisi Media Fermentasi terhadap Produksi Asam Sitrat oleh *Aspergillus niger*. Jurnal Fluida, 2011, 8(1), 23-27.
- Mangunwidjaja, D.; Suryani, A., Teknologi Bioproses. Jakarta: Penebar Swadaya, 1994.
- Mattey, M., The Production of Organic Acids. Crit Rev Biotechnol, 1992, 12, 87-132.
- Max, B.; Salgado, J.M.; Rodríguez, N.; Cortés, S.; Converti, A.; Domínguez, J.M., Biotechnological Production of Citric Acid. Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41, 862-875.
- Pallares, J.; Rodríguez, S.; Sanromán, A., Citric Acid Production in Submerged and Solid State Culture of *Aspergillus niger*. Bioprocess Engineering, 1996, 15, 31-33.
- Papagianni, M.; Mattey, M.; Berovic, M.; Kristiansen, B., *Aspergillus niger* Morphology and Citric Acid Production in Submerged Batch Fermentation: Effects of Culture pH, Phosphate and Manganese Levels. Food Technol Biotechnol, 1999, 37, 165-171.
- Papagianni, M., Morphology and Citric Acid Production of *Aspergillus niger* in Submerged Culture. Tesis Doktor, University of Strathclyde, 1995.
- Papagianni, M., Advances in Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical Aspects, Membrane Transport and Modeling. Biotechnology Advances, 2007, 25, 244-263.
- Soccol, C.R.; Vandenberghe, L.P.; Rodrigues, C.; Pandey, A., New Perspective for Citric Acid Production and Application. Food Technology and Biotechnology, 2006, 44(2), 141-149.
- Sumo; Sumantri; Subono, Prinsip Bioteknologi. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama, 1993.
- Syamsuriputra, A.A.; Setiadi, T.; Kushandayani, R.; Yunus, R.F., Pengaruh Kadar Air Substrat dan Konsentrasi Dedak Padi pada Produksi Asam Sitrat dari Ampas Tapioka menggunakan *Aspergillus Niger* ITBCCCL 74. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia, Palembang, 19 - 20 Juli 2006.
- Wojtatowics, M.; Marchin, G. L.; Ericksen, L. E., Attempts to Improve Strain A-10 of *Yarrow lipolytica* for Citric Acid Production from N-Parrafins. Process Biochemistry, 1993, 28, 453-460.