

Evaluación de un medio de cultivo a partir del fruto de **Prosopis juliflora**



Alex Armando Sáez Vega

M.Sc. en Ingeniería Química. Profesor del Departamento de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT
asaез@eafit.edu.co

Juan Felipe Solarte Vasquez

Ingeniero de procesos. Auxiliar de investigación en el Departamento de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT
jsolarte@eafit.edu.co

Ana María Martínez Moreno

Ingeniera de Procesos. Actualmente trabaja como Analista de procesos en la empresa *Visio Software*
amartinezmoreno@hotmail.com

David Habeych Narváez

M.Sc. en Ingeniería Química. Profesor del Departamento de Ingeniería de Procesos de la Universidad EAFIT
dhabeych@eafit.edu.co

Recepción: 30 de abril de 2004 | Aceptación: 16 de junio de 2004

Resumen

Se evaluó un medio de cultivo para hongos, elaborado a partir del fruto del árbol *Prosopis juliflora* como fuente nutricional; se cultivaron *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Trichoderma harzianum* en medio líquido a concentraciones de 30, 40 y 45 g/l de azúcares reductores, usando como medio de control Saboraud 40. También se cultivó *A. niger* en medio sólido usando 1% de agar y 40 g/L de azúcares y agar Saboraud como Control. Teniendo en cuenta las cinéticas de biomasa y sustrato, los hongos evaluados tuvieron una buena adaptación al medio líquido y un crecimiento mayor a medida que aumentaba la concentración de azúcares reductores. En el caso del *A. niger*, el sustrato se consumió en su totalidad, a diferencia del *A. flavus* y el *T. harzianum*, que aunque su consumo fue bueno no lo agotó totalmente, quedando azúcares reductores no metabolizables. En medio sólido, el *A. niger* presentó un buen crecimiento en el medio complejo, siendo mayor al observado en el medio control. En todos los casos, la esporulación fue alta y mucho más rápida que la del control, para todas las concentraciones evaluadas. En conclusión el fruto del *P. juliflora* tiene un alto potencial como fuente nutricional para el cultivo de hongos, tanto en sumergido como en sólido.

Palabras Clave

Prosopis juliflora
Trupillo
Medio de cultivo
Aspergillus Níger
Aspergillus flavus
Trichoderma harzianum

Evaluation of a culture medium based on the fruit of *Prosopis juliflora*

Abstract

A culture medium for fungi elaborated from the fruit of *Prosopis juliflora* tree as nutritional source were evaluated, three fungi were cultivated (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Trichoderma harzianum*) in the liquid medium to 30, 40 and 45 g/l of reducing sugars concentrations, using Saboraud 40 as control, *A. niger* was also cultivated in the solid media using 1% of agar and 40 g/L of sugars and agar Saboraud as control. Considering kinetics of biomass and the substrate, the evaluated fungi had a good adaptation to the liquid media and a greater growth as it increased the concentration of reducing sugars. In the case of the *A. niger* the substrate was totally consumed, unlike *A. flavus* and *T. harzianum* that although their consumption was good it was not totally used, leaving nonmetabolizable reducing sugars. In the solid media culture, the *A. niger* showed good growth in the complex media, being greater than the observed in the control. In all cases, sporulation was high and much faster than the one of the control, for all the evaluated concentrations. As a conclusion the fruit of *P. juliflora* has a high potential as nutritional source for fungi culture, both submerged and in solid.

Key Words

Prosopis juliflora
Trupillo, mesquite
Culture media
Aspergillus niger
Aspergillus flavus
Trichoderma harzianum

Introducción



El árbol *Prosopis spp.*, conocido como trupillo o mesquite (Correa y Bernal, 1995), pertenece a la familia de las leguminosas. Se caracteriza por su elevado contenido de azúcares, fibra dietética y proteína (Bravo, 1999). Es una planta originaria de México, aunque su distribución se ha extendido hasta algunas regiones áridas y semiáridas de Norte, Centro y Suramérica. En Colombia es abundante en varias zonas semiáridas y zonas de bosque tropical con poca pluviosidad: en la costa Atlántica, las orillas del río Magdalena y los Llanos Orientales (Correa y Bernal, 1995); esta especie es erróneamente considerada maleza indeseable y se combate por su agresividad y competencia con otras especies forrajeras (Correa y Bernal, 1995).

El árbol se desarrolla en zonas de precipitación muy escasa, a temperaturas altas e insolación intensa. Se presenta en climas cálidos y semicálidos y crece en gran variedad de suelos: areno-arcilloso, salino, rocoso, arenoso e incluso en dunas secas. Crece

sin dificultad en suelos con un pH de 6.5 hasta 10.4 (Conabio, 2002). Los frutos carnosos y dulces no se abren para soltar sus semillas, y son de color amarillo paja o marrón, alargados, compactos y curvos. El tiempo transcurrido entre la floración y fructificación es de tres meses. Las semillas están protegidas por una cubierta dura y color amarillento. El árbol está formado por raíces laterales y verticales que pueden penetrar el suelo y el subsuelo, hasta 25 m de profundidad, donde encuentran agua subterránea (Díaz, 1997). Esta planta es buena productora de forraje: de 300 a 8,000 Kg/ha y produce anualmente de 3,000 a 10,000 Kg de fruto por hectárea (Conabio, 2002). Hay plantas que dan sus primeros frutos a los 20 meses después de sembradas (Díaz, 1997). Es considerada especie vegetal promisoría, de aprovechamiento integral y con múltiples usos: reforestación, fijación de arenas movedizas y como melífera (Semamat, 2002). La goma que exuda el tronco se usa como pegamento y para dar viscosidad a mezclas con polvos insolubles y pesados; la madera es de gran interés en la construcción y como combustible. La corteza contiene taninos para curtir pieles, forraje para ganado bovino, ovino y caprino; la goma obtenida de

las semillas se usa como edulcorante para alimentos y tiene propiedades muy semejantes a las de la goma arábica (Conabio, 2002).

El crecimiento casi espontáneo del árbol de *Prosopis spp* y su largo ciclo vital, permiten asociar esta especie con aplicaciones en el campo de la biotecnología, por lo que se puede tratar de darle un uso integral, enmarcado dentro del concepto “cero emisiones” (ZERI, Zero Emissions Research Initiative, Pauli, 1995), aprovechando su alto contenido de nutrientes para la obtención de un medio de cultivo. Pues innovar en medios de cultivo a partir de una planta de bajos requerimientos económicos para su cultivo y mantenimiento, y que su explotación involucre unas etapas de procesamiento simples, es una alternativa interesante desde el punto de vista económico (Díaz y González, 1997).



Por su alto contenido proteico, el fruto del *Prosopis spp* puede explorarse como medio de cultivo sustituto de gran variedad de medios para cultivar hongos (como los de maíz, avena, zanahoria, papa y semi-sintéticos con ingredientes naturales), los cuales afectan la morfología, el color y la formación de esporas. La mayoría de los hongos tienen buen crecimiento en medios enriquecidos, donde la glucosa es la fuente de carbono más utilizada; la fuente de nitrógeno incluye peptona, aminoácidos y compuestos de nitrato. El medio Sabouraud es muy usado para hongos y levaduras, conocido desde 1910; su pH ácido (5.6) desarrolla características para diagnóstico como estructuras esporuladas y pigmentación (Sabouraud, 2002).

El análisis Bromatológico realizado al fruto molido sin tamizar, mostró concordancia con los reportados y se encontraron niveles de proteína y carbohidratos de 9.5 y 61.5%, respectivamente.

Las investigaciones con el fruto se han enfocado a la producción de gomas y poco se ha investigado sobre la obtención de medios de cultivo a partir del mismo, teniendo en cuenta que las importaciones de reactivos como los medios de cultivo para hongos y bacterias alcanzaron los 2.2 millones de dólares en 2002 (Incomex, 2003) y que en la industria y en la microbiología existe mucha demanda de estos medios utilizados en el diagnóstico de las enfermedades, con fines investigativos, actividades de aislamiento y mantenimiento de cepas, además de que muy poco se ha investigado sobre sustratos naturales que presenten ventajas productivas y económicas. Es necesario que se comience una búsqueda de alternativas para que esta materia prima, sea de bajo costo y fácil adquisición, para que pueda ser usada en todo tipo de aplicaciones. En

el presente trabajo se evaluó la cinética de crecimiento de tres hongos de gran importancia, tanto microbiológica como industrial: *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) y *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*), y se utilizó el contenido de azúcares reductores como parámetro para la elaboración del medio de cultivo líquido y sólido.

1. Metodología

1.1 Ubicación

Se utilizaron cepas de *Aspergillus niger* (AL01) (Sáez *et al.*, 2002) de *Aspergillus flavus* y *Trichoderma harzianum*, aisladas y mantenidas en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT.

1.2 Adaptación de cepas

Las cepas se activaron en Agar Sabouraud durante 5 días, en incubadora, a 30°C; luego se mantuvieron a 4°C.

1.3 Tratamiento del fruto

El fruto se recogió en estado maduro, en las inmediaciones de la Estación Piscícola en el municipio de Sopetrán (Antioquia); se secó a 50° C durante 24 horas, se realizó la molienda en un molino de discos, se tamizó con malla 600µm, eliminando el exocarpio y la semilla.

1.4 Selección del mejor pH de extracción

Para la obtención del medio líquido; se realizó una extracción al 10% (P/V) de la fracción tamizada, con agua destilada, colocando el material seco en una bolsa cerrada de tela de algodón. Las infusiones se hicieron con agua destilada a diferentes pH: ácido, neutro y básico (2, 7 y 12, ajustando con HCl y NaOH respectivamente), durante 40 minutos a partir de ebullición, con el fin de evaluar el pH más conveniente, según la cantidad de azúcares reductores extraídos. El pH que presentó mejor rendimiento en azúcares reductores, se siguió utilizando para las extracciones posteriores. Para los tratamientos en sólidos, se agregó 1% de Agar. Para la determinación de azúcares y proteínas, se utilizaron los métodos de

DNS y Lowry, respectivamente. (Miller, 1959; Lowry, 1951).

1.5 Preparación del medio de cultivo líquido

La preparación del medio líquido se realizó como se menciona en el párrafo anterior, ajustando a pH 2 con HCl al 10%; el jarabe resultante tiene un pH de 3.7, que se ajusta con NaOH 2.0 N a 5.6 (igual al del medio control Sabouraud). Los sólidos suspendidos se separan por centrifugación (4500 RPM, 10 min, 10°C) y se determina y ajusta la cantidad de azúcares reductores del medio final por reducción del volumen. Se preparan tres diluciones, tomando como base la concentración de 40 g/l de glucosa del medio de control Sabouraud -que para el caso del trupillo son los azúcares reductores- por debajo, igual y por encima de este valor, siendo 30, 40 y 45 g/l de glucosa equivalente. Los medios se esterilizan 15 minutos a 121° C y 15 PSI. Para efectos prácticos, los medios se nombrarán: M30, M40 y M45, respectivamente.

1.6 Preparación del preinóculo

Se realizaron tres subcultivos de la cepa madre incubados, por 5 días a 30° C, tanto en Sabouraud como en medios M30, M40 y M45, y se inocularon para el caso de *A. niger* y *A. flavus*, según la metodología de Marín y Salazar (2003), y en el caso de *T. harzianum*, la de Maj *et al.* (2000).

Los preinóculos se mantuvieron por 24 horas a 30°C y 150 RPM, en un agitador orbital.

1.7 Condiciones de la fermentación y toma de muestras

Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 8 días en erlenmeyers de 250 ml, con 25 ml de los medios de cultivo, a 150 RPM, 30°C. Las muestras se realizaron por duplicado, y se determinó cada 24 horas la biomasa por peso seco y los azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).

En el caso de los cultivos sólidos de *A. niger*, se realizaron mediciones, a diferentes horas, de área de crecimiento (cm²), para todos los medios con 1% agar y Agar Sabouraud como control. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

2. Resultados y discusión

2.1 Selección del mejor pH de extracción

Para la fracción tamizada, se encontraron los valores de azúcares reductores y proteínas mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto del pH sobre la extracción de azúcares y proteínas

pH Extracción	Azúcares reductores g/L	Proteínas g/L
2	46.02	5.53
7	13.00	4.43
12	7.70	4.53

Como se puede deducir de la Tabla 1, el pH 2 es el mejor para la extracción de la harina de trupillo. Se utilizó ese pH para todas las extracciones posteriores.

2.2 Comportamiento del *Aspergillus niger*

En medio sólido

En la Figura 1, se puede observar que existen diferencias significativas en el crecimiento del *A. niger* en medio sólido, con respecto al control la desviación estándar es pequeña para todos los casos, lo que hace pensar que los ensayos son precisos y reproducibles. Entre los diferentes medios no existen diferencias apreciables en el crecimiento.

Además del buen crecimiento, el *A. niger* en agar-trupillo tuvo una abundante esporulación de color negro oscuro, cubriendo la totalidad de la caja de petri, siendo para el sabouraud una esporulación más tenue y lenta; esto puede deberse a que existen vitaminas y factores en el medio complejo que activan la esporulación, especialmente vitamina B6 (Cruz, 1999).

Evaluación del *Aspergillus niger* en medio líquido

El hongo creció fácilmente en los medios preparados, presentó alta esporulación y apreciables cambios de

físicos en el medio, como disminución en la viscosidad y clarificación, contrario a lo ocurrido en el sabouraud que no presentó esporulación.

En la Figura 2 se observa la cinética de biomasa en los diferentes medios, durante el proceso fermentativo. Se puede ver la ausencia de la fase de latencia en todos los casos, debido a que presenta una fácil adaptación a los medios utilizados. Desde el inicio de la fermentación hay un aumento constante en la biomasa, llegando a su valor máximo a las 72 horas en el caso de M30, M40 y M45, a diferencia del medio de control que llegó a las 96 horas. Los valores máximos de biomasa fueron: 46.8, 59.54, 75.93 y 27.2 g/l, para M30, M40, M45 y control, respectivamente. Para todos los casos, el crecimiento estuvo significativamente por encima del control, lo que sugiere que como medio es adecuado para el cultivo de *A. niger*. Las velocidades específicas de crecimiento estuvieron entre 5.4 y 4.4 días⁻¹, para los medios elaborados a base de trupillo, y de 1.98 días⁻¹ para el control, lo que corrobora que el hongo crece significativamente más rápido en el medio complejo.

Figura 1. Crecimiento (cm²) de *A. niger* en diferentes concentraciones de agar trupillo y en agar sabouraud

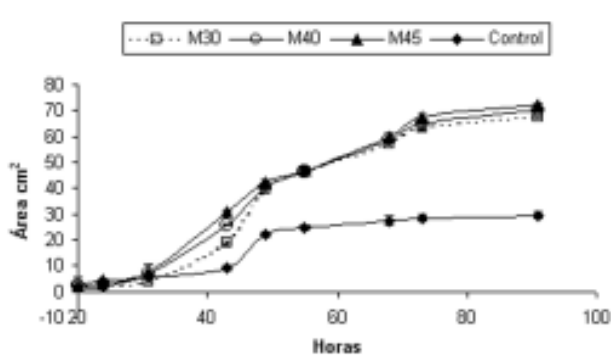
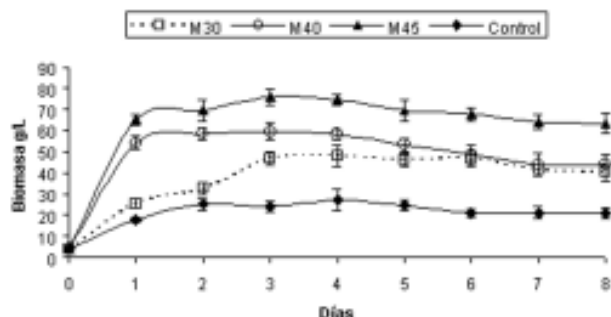


Figura 2. Cinética de crecimiento de *A. niger* en cultivo sumergido



Se aprecia de la Figura 3, que el consumo de sustrato es similar para las tres concentraciones evaluadas, observándose un aumento, durante las primeras 24 horas en la cantidad de sustrato, esto se debe a que el medio de cultivo presenta carbohidratos complejos que deben ser hidrolizados para facilitar su utilización, es decir el *A. niger* es capaz de segregar enzimas que hacen asequibles los polisacáridos presentes, presuntamente mananos (Cruz, 1999). En el caso del medio de control, el sustrato se consumió en un 98.5% mientras que en los medios estudiados se observa que el consumo fue aproximadamente de un 90 a 92% del sustrato partiendo de su valor máximo.

Evaluación del *Aspergillus flavus* en medio líquido

De la Figura 4 podemos inferir, que el *A. flavus* se desarrolló rápidamente en el medio preparado a partir de trúpillo. Desde los primeros días de la fermentación se observó un aumento la viscosidad del líquido filtrado, sin clarificación. En el medio de control, el crecimiento fue más escaso y sólo logró esporular en el día siete. El hongo presenta una cinética de crecimiento típica en los medios evaluados, al igual que el control, encontrándose diferencias significativas en su crecimiento de los medios complejos con respecto al control. En todos los casos, la fase de latencia es nula.

La concentración de biomasa es lógicamente mayor, a medida que aumenta la concentración del sustrato. Para los medios evaluados y el control se observa la fase estacionaria a partir de las 72 h, permaneciendo casi constante en toda la fermentación. Las velocidades específicas de crecimiento para los medios complejos, estuvieron entre 3.05 y 3.58 Días^{-1} , mientras que para el control se encontró una velocidad específica de crecimiento de 2.72 Días^{-1} .

Los valores máximos de biomasa estuvieron por encima de lo reportado por Akpomedaye y Ejechi (1998), en un medio de cultivo complejo de naranja y piña.

La cinética de consumo de sustrato presenta un comportamiento parecido al *A. niger*. Inicialmente se da un aumento en la concentración de azúcares durante el primer día de la fermentación, por la acción

enzimática del hongo al hidrolizar los azúcares complejos presentes en el medio, y así facilitar su utilización, capacidad enzimática propia del género *Aspergillus* (Osorio 1996). Desde el segundo día se observa una disminución en el sustrato, hasta el sexto día, a partir del cual el consumo permanece casi constante durante el resto de la fermentación. El sustrato en los medios estudiados no se agota en su totalidad, quedando de 2 a 5 g/L en el medio, lo que sugiere presencia de carbohidratos reductores no metabolizables por *A. flavus*.

Figura 3. Cinética de consumo de sustrato de *A. niger* en cultivo sumergido

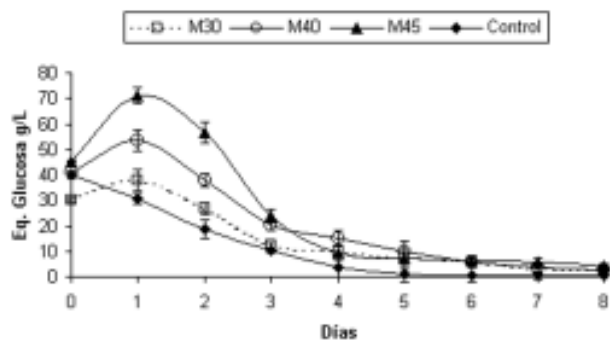


Figura 4. Cinética de crecimiento de *A. flavus* en cultivo sumergido

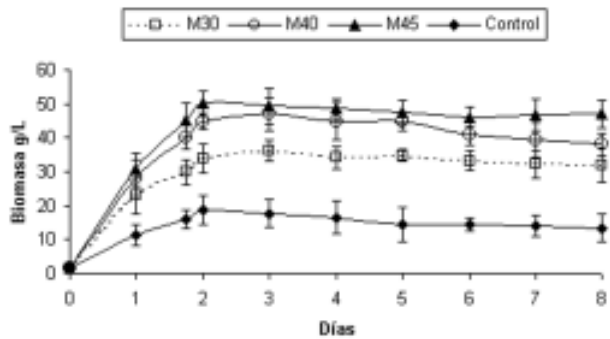
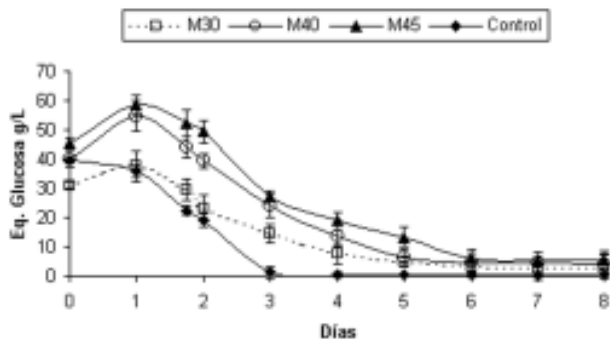


Figura 5. Cinética de consumo de sustrato de *A. flavus* en cultivo sumergido



Evaluación del *Trichoderma harzianum* en medio líquido

El *T. harzianum* se desarrolló rápidamente en el medio preparado a partir de harina de trúpillo, presentando alta esporulación en las primeras 24 horas. Desde los primeros días de la fermentación se observó un aumento la viscosidad del líquido filtrado, sin clarificación. En el medio de control, el crecimiento fue más escaso y sólo logró esporular en el día siete.

La biomasa presenta un comportamiento similar para todos los medios evaluados, sin presentar fase de latencia. La fase exponencial se presenta durante los dos primeros días, cuando hay un aumento constante de la biomasa; en los siguientes cuatro días no se observa un crecimiento significativo del hongo, lo que corresponde a la fase estacionaria. Aunque no hay diferencias significativas que resalten, es importante anotar que el crecimiento en el medio M30 coincide con el crecimiento del control, esto permite predecir que el *T. harzianum*, a diferencia de los *Aspergillus*, es incapaz de desdoblar los polisacáridos del Trúpillo.

Las velocidades específicas de crecimiento celular del *Trichoderma harzianum* son muy parecidas,

incluso el control, con una velocidad específica de 4.35 Días⁻¹, está por encima de M45, con una velocidad de 3.72 Días⁻¹. La velocidad específica más alta la presenta el medio M30 con 4.91, seguida de M40 con 4.60 Días⁻¹, respectivamente. Esto permite sugerir que el medio es adecuado para el cultivo de *T. harzianum*, a concentraciones iguales o menores a 40 g/L de azúcares.

En la cinética de sustrato, se observa un acelerado consumo en las etapas más tempranas, las que coinciden con la fase de crecimiento celular. A partir del cuarto día, y durante los demás días de evaluación, la cantidad de sustrato es casi constante para los medios M30, M40 y M45 y casi nula para el medio control, razón por la cual el crecimiento del hongo se detiene. Para los medios evaluados, a diferencia del medio de control, se observó que el sustrato no se consumió en su totalidad, quedando 7, 13 y 14 g/l de azúcares reductores en M30, M40 y M45, respectivamente, por lo que se asume que hay presencia de azúcares reductores no metabolizables por el *T. harzianum*. Se corrobora, como se esperaba, que no hay aumento en la cantidad de azúcar debido a la hidrólisis enzimática, ya que el hongo es más limitado enzimáticamente que los *Aspergillus*.

Figura 6. Cinética de crecimiento de *T. harzianum* en cultivo sumergido

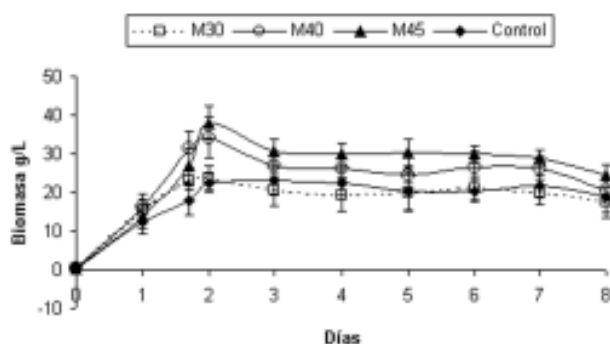
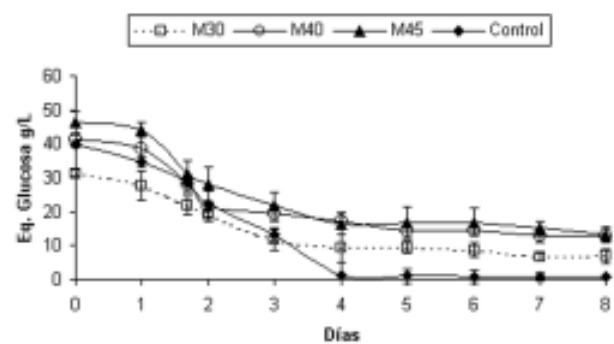


Figura 7. Cinética de consumo de sustrato de *T. harzianum* en cultivo sumergido



Conclusiones

El mejor pH para realizar la extracción de azúcares presentes en la harina del fruto del *Prosopis juliflora*, debe estar cercano a 2, para lograr mayor hidrolización de los azúcares complejos.

La innovación en la obtención de medios a partir del *Prosopis juliflora*, permite el desarrollo del *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Trichoderma harzianum*, presentando para todos los casos valores mayores en cuanto a biomasa, a una concentración de azúcar similar, a los presentados por el medio de control Sabouraud.

Existen diferencias significativas en la velocidad específica de crecimiento celular para *A. niger* y *A. flavus*. Para el caso de *T. harzianum* no fueron notorias estas diferencias.

En medio sólido, el *A. niger* presentó una buena adaptación al medio y buena esporulación, lo que es una ventaja si se desea utilizar para efectos de caracterización y determinación rápida de este tipo de especies.

Los hongos evaluados presentaron un buen comportamiento en el medio líquido, no se dio la fase de adaptación y se observó un rápido aumento en la biomasa para todos los medios.

Para el caso del *Aspergillus Niger*, el medio de cultivo obtenido del *Prosopis juliflora* es mejor para obtener mayor cantidad de biomasa, un menor tiempo de crecimiento exponencial y una esporulación rápida; mas no para el mantenimiento de la cepa, si se compara con el medio control *Sabouraud*, diferente al caso del *Aspergillus flavus* y el *Trichoderma harzianum*, que sirven tanto para crecimiento y mantenimiento como para esporulación.

En todas las fermentaciones líquidas el mayor crecimiento se dio para M45, seguido por M40 y M30; a su vez, estos fueron mayores o iguales que el presentado por el medio de control.

Los resultados obtenidos, sugieren que se podría usar esta especie forrajera de una manera integral, dándole mayor valor agregado al fruto mediante la elaboración de medios de cultivo microbiológicos, todo enmarcado en la filosofía "Cero emisiones".

Se recomienda hacer ensayos de molienda con otro tipo de molinos para facilitar esta operación y mejorar su eficiencia, así como realizar una optimización de la extracción de azúcares. Realizar además la evaluación técnica y económica del proceso productivo.

Desde el punto de vista social, se sugiere establecer vínculos con la Secretaría de Agricultura y entidades afines, para la investigación e implementación de este árbol en programas de reforestación y desarrollo socioeconómico.

Bibliografía

Akpomedaye, D. E. y Ejechi, B.O. (1998). *The hurdle effect of mild heat and two tropical spice extracts on the growth of three fungi in fruit juices*. En: Food research International. Vol. 31, N°. 5. pp. 339-341.

Bayona, Claudia. (1999). "*Algarrobo, el superárbol del desierto peruano*". Servicio Informativo Iberoamericano. Organización de Estados Iberoamericanos para la educación, la ciencia y la cultura. Perú. Artículo de Internet. <http://www.oei.org.co/sii/entrega26/art08.htm>. Consulta: 22 de enero 2003.

Bravo, L. (1999). *Propiedades y aplicaciones de la fibra de algarroba (Prosopis pallida)*. En: Alimentaria, Revista de tecnología e higiene de los alimentos (España). Vol 36, N°. 300. pp. 67-73.

CONABIO (Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad). "*Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad*". *Prosopis Juliflora* (Sw.) DC. En : Prodrumus Systematis Naturales Regni Vegetabilis 2: 447. (México). Artículo de Internet. <http://www.conabio.gob.mx/arboles/pdfspecies/46->

- legum44m.pdf. Consulta: 5 de febrero de 2002.
- Correa, Jaime y Bernal, Henry. (1995). *Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello*. Tomo XI. Bogotá: Secretaria Ejecutiva Convenio Andrés Bello, SECAB. pp. 120-125.
- Cruz, Gastón E. (1999). *Production and Characterization of Prosopis Seed Galactomannan*. Tesis de Doctorado (Doctor of Technical Sciences). The Swiss Federal Institute of Technology. Zurich. pp. 18-29.
- Díaz C., Ángel. (1997). *Guía para el cultivo y aprovechamiento de los "Algarrobos" o "Trupillos" Prosopis juliflora (Swartz) Dc. y Prosopis pallida (H & B. ex Willd) H.B.C.* Santa fe de Bogotá: Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello. Editora Guadalupe Ltda. Colombia. pp. 6-18.
- Díaz, Elvira y Gonzalez, Nereida. (1997). *Utilización del fruto del Cují (Prosopis juliflora) en la elaboración de medios de cultivos bacterianos*. En : Revista científica (Maracaibo: Venezuela). Facultad de ciencias veterinarias, Universidad del Zulia. Vol. 7, N° 1. pp. 54-57.
- Favela, T. et al. (1998). "Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations". En: Process Biochemistry (Great Britain). Vol. 33, N° 2. pp. 103-107.
- González H., Eduardo E. et al. (s.f.). *Bioprocesamiento de la vaina de mezquite Prosopis spp. Para la producción de biomasa fungal*. México. Artículo de Internet <http://ecologia.uat.mx/biotam/v1n2/art6.html>. Consulta: 16 de mayo de 2002.
- Incomex. Ministerio de Comercio Exterior. Colombia. Seccional Medellín. [Database]. Importaciones 1999-2002. Consulta: 3 de abril 2002.
- Lowry, O. H., et al. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol, reagent*. En : Journal of Biology and Chemistry. Vol. 193, p. 265-275.
- Maj, Agnieszka, Witkowska, Danuta y Robak, Ma³gorzata. "Biosynthesis and properties of beta-1,3-glucanases of *Trichoderma hamatum*". En: Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology. Vol. 5, Issue 2. Artículo de Internet: <http://www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/biotechnology/art-1.html>. (Consulta: 15 de febrero de 2003).
- Marín, Luz y Salazar, Ana. (2003). *Evaluación de la producción de pectinasas a partir de Aspergillus niger*. Trabajo de Grado. Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT. Medellín.
- Miller G.L. (1959). *Use of DNS acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal Chem. No. 31. pp. 426-428.
- Osorio C., Ana y Restrepo, José. (1996). *Características de los hongos del grupo Aspergillus flavus y su producción de sustancias útiles y toxigénicas*. Seminario agronomía. Secc. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.
- Pauli, Gunter (1995). *Avances*. Medellín: Centro de publicaciones Universidad EAFIT. pp 6-10.
- Paustian, Keith y Schnürer, Johan. (1987). *Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: Application of a model to laboratory and field data*. En : Soil biology and biochemical. (Great Britain). Vol. 19, N° 5. pp. 621-629.
- Sabouraud, R. (1910). *Culture Media Manual. International Diagnostics Group, IDGPLC. Inglaterra*. 2002. Artículo de Internet. <http://www.idgplc.com/Malthus+Data+temp.nsf/8315fbd4c64588e780256776002cb774?OpenView&Start=175>. Consulta: 17 de febrero de 2003.
- Sáez A., Cadavid A. y Flórez G. (2002). *Caracterización de una cepa nativa de Aspergillus niger y evaluación de la producción de ácido cítrico*. Revista Universidad EAFIT. N° 128. pp. 33-41.
- Sermanat (Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales). *Especies forestales no maderables y maderables no tradicionales de zonas áridas y semiáridas en los estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. México*. Artículo de Internet. http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/prosopis_juliflora.htm. Consulta: 13 de agosto de 2002.