

Aspergillus niger NRRL 567을 이용한 고체배양에서 완충용액이 구연산 생산에 미치는 영향

김진우[†]

맥길대학교 바이오시스템공학과
21111 레이크로드 세인트앤드벨라뷰시 퀘벡주, H9X 3V9
(2012년 3월 1일 접수, 2012년 4월 20일 채택)

Effect of Buffers on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 in Solid Substrate Fermentation

Jin-Woo Kim[†]

Department of Biosystems Engineering, McGill University, 21, 111 Lakeshore Road, Ste Anne de Bellevue, Canada, H9X 3V9
(Received 1 March 2012; accepted 20 April 2012)

요 약

곰팡이균을 이용한 구연산 생산에 있어 액체배양의 초기 pH는 구연산 생산에 유의한 영향을 미친다고 알려져 있다. 본 연구에서는 고체배양에서 *Aspergillus niger*를 이용한 구연산 생산에 여러 pH의 완충용액이 구연산 생산에 미치는 영향을 밝혀 최적의 완충용액을 찾고자 연구하였다. 실험에 적용된 여러가지 완충용액은 구연산 생산에 영향을 미치며 높은 초기 pH 조건에서 구연산 생산성이 우수한 것으로 나타났다. 여러가지 완충용액 중, phosphate (pH 8.6) 완충용액과 carbonate 완충용액(pH 10.0)이 고체배양에서 구연산 생산에 가장 적합함을 알 수 있었다. Carbonate 완충용액(pH 10.0)을 사용하여 고체배지의 초기 pH를 6.8으로 하였을 경우, 최대 구연산 생산인 564.3 g/kg solid substrate 얻을 수 있었다. 또한, 염기 또는 산을 사용하여 고체 배지의 초기 pH를 4.42로 조정한 배지에 비해 phosphate 완충용액을 사용한 pH 4.48의 고체배지에서 구연산 생산성이 1.5배 증가함을 알 수 있었다. 이는 완충용액의 사용이 구연산 생산에 의한 배지의 산성화를 방지해 세포성장과 생산성을 높였다고 결론지을 수 있다.

Abstract – In the submerged fermentation of fungi, it was known pH had significant effect on the citric acid production. Various growth conditions were applied with different buffer on citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown on peat moss to find the optimum pH and most effective buffer solution. The initial pHs of different buffer solutions significantly influenced on the citric acid production and *A. niger* NRRL 567 produced citric acid more efficiently at high pHs. A phosphate buffer and a carbonate buffer with pH 8.6 and pH 10.0 were identified as suitable buffer solutions for citric acid production. The maximal citric acid production of 564.3 g/kg solid substrate was achieved employing carbonate buffer at pH 10.0.

Key words: Citric Acid, *Aspergillus niger*, Buffer Solution, Solid Substrate Fermentation, Optimization, Peat Moss

1. 서 론

고체배양법(solid substrate fermentation)은 free flowing water가 최소화된 고체배지에서 미생물을 배양하는 것으로 수천 년 전부터 아시아를 중심으로 된장, 청주, 템페(tempeh), 일본간장(shoyu) 및 koji 공정을 이용한 효소 생산에 널리 사용되어 왔다[1-5]. 최근에는 고체배양법이 기존의 액체배양법에 비해 용수사용 절감, 오염 위험 감소, 높은 생산성 및 공정 에너지 절감과 같은 우수성이 알려지면서 농부산물을 고체배지로 이용한 고체배양법에 대한 관심이 높아지고 있다[6,7]. 특히, 액체배지에 비해 높은 생산성과 분리

/정제 비용 절감 효과가 뛰어난 곰팡이 균을 이용한 유기산, 효소, 항생제 및 단백질 생산에 고체배양법의 적용 범위가 확대되고 있다[8-11].

*A. niger*를 이용한 구연산 생산은 고체배지의 영양성분, 배양온도, pH, 수분함량, 통기, 첨가제와 고체배지의 특성(particle 크기, 흡수성, 열전도성) 등에 따라 영향을 받는다고 알려져 있다[12,13]. 특히, 고체배지의 초기 pH는 세포성장 및 유기산 생산에 주요한 영향을 준다. 일반적으로 대부분의 곰팡이 균은 산성 조건(pH 3-6)에서 최적의 성장을 보인다고 알려져 있으나, 일부 곰팡이 균은 박테리아와 경쟁에서 우위를 점하기 위해 pH 2 조건에서 성장할 수 있다고 알려져 있다[14]. Roukas [15]의 보고에 따르면 *A. niger*를 이용한 글루콘산 생산에 있어 초기 배지의 pH가 7일 때 생산이 가장 우수함

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kimjw1028@hotmail.com

을 보였다. 반면 Kamini 등은 *A. niger* ATCC 10577과 *A. niger* MTCC 259를 이용한 lipase 생산에 있어 pH 6~8이 최적 조건임을 보고했다. 일반적으로 고체 및 액체배양법에서 *A. niger*를 이용한 구연산 생산에 있어서는 초기 pH 5~6이 최적 조건임이 보고되었다 [16-18].

액체배양에서와 같이 고체배양에서도 *A. niger*를 이용한 구연산 생산에 있어 초기 pH는 세포성장 및 산물 생산성을 높이는 데 중요한 변수이다. 특히, 배양 중 최적의 pH의 유지는 유기산 생산에 따른 pH 저하에 의한 세포성장 저해를 방지하고 구연산의 생산성을 유지하는데 필수적이다. 고체배양은 free flowing water가 최소화 된 상태에서 교반 없이 고정층에서 미생물을 배양함으로써 고체배지 중의 수분함량, 온도, pH 및 열분포를 균일하게 유지함이 어려운 단점이 있다. 특히, 유기산 생산에 있어 배양 후반에 유기산 축적에 따른 배지의 산성화로 세포성장 저해가 발생하는데 혐기성 용액의 투입을 통해 고체배지를 중성화 시키는 것은 교반장치가 없는 고체배양기에서 적용에 어려움이 있다. 이와 같이 유기산 생산에 이용되는 고체배양법의 단점을 극복하기 위해 배양 초기에 산 또는 염기를 사용하여 배지의 pH를 조절하는 방법을 적용하였다. 또한, 특정한 pH를 가진 완충용액을 배양초기에 고체배지와 혼합하여 사용함으로써 배양 중에 pH 변화를 최소화시켜 보다 효과적인 pH 유지가 가능하다고 하였다[19-21]. 액체배양법에서 곰팡이 균을 이용한 유용물질 생산에 사용되는 완충용액으로는 phosphate, acetate, carbonate, citric acid 및 lactic acid가 널리 사용되고 있으며 이는 곰팡이 균 성장에 저해효과가 없다고 알려져 있다[16,22]. 현재 상업적으로 생산되는 여러 가지 유기산 중, 구연산은 연간 1.4 백만 톤 생산이 되는 주요 유기산으로 연간 3.5~4% 수요의 증가가 예상된다[23].

곰팡이균의 유전자 변이를 통한 생산성 향상이 다양하게 시도되고 있는데, *A. Niger*를 이용한 구연산 생산에 있어 U.V. 또는 NTG를 이용한 random mutation을 이용한 생산성 향상이 보고되었다. Rajoka 등에 따르면 *A. niger* GCB 75의 U.V.를 이용한 mutation을 통해 구연산 생산을 2.7배 증가한 결과를 발표하였다[30]. 또한 유전체 분석기술의 급속한 발전에 따라, 다양한 곰팡이균을 이용한 새로운 목질계/전분계 분해효소개발이 활발하게 진행되고 있다. 현재까지 JGI (Joint Genome Institute) 등에 의해 *A. niger* 여러 종의 유전체 분석이 완료 되었으며, 이러한 유전체 정보를 바탕으로 새로운 목질계분해효소를 선별하고 기능을 예측하는 연구가 활발히 진행되고 있다. Ram 등은 *A. Niger* CBS 513.88의 유전체 분석을 통해 17종의 효소 후보군 선별하여, 이중 2종(α -glucosidase와 α -amylase)이 전분 분해능이 있음을 확인하였다[31]. 이와 같이 유전체 정보를 기반으로 한 유전체 변이 또는 강화를 통해 구연산 생산을 증대를 시도하는 연구도 진행되고 있다.

유전체 연구를 통한 구연산 생산증대와 함께 발효조건 최적화를 통한 구연산 생산증대 또한 활발히 진행되고 있다. 현재 생산되는 대부분의 구연산은 *A. niger*를 이용하여 액체배양법으로 생산되나 구연산 수요의 증가로 인해 보다 효과적이고 경제적인 발효법의 도입이 필요하다. 농부산물물을 이용한 고체발효법 부산물을 이용한다는 장점과 함께 생산성을 높일 수 있다는 점에서 액체배양법의 대안으로 본 연구에서 도입하였다[24-26]. 본 연구의 목적은 고체배지의 초기 pH 구연산 생산에 미치는 영향을 연구하여 구연산 생산에 최적의 pH와 완충용액을 선정함에 있다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 재료

A. niger NRRL 567는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) 에서 분양받아 사용하였다. *A. niger*의 spores 생산을 위해 고체배지인 potato dextrose agar plates (PDA, Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 30 °C에서 배양하였다. PDA는 2주 간격으로 계대배양 했으며, 배양 후 7일된 plate에서 0.1% Tween 80 (sigma, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 사용하여 PDA의 표면에서 spore를 회수하였다. 회수된 Tween 80 용액은 멸균증류수를 이용하여 희석하여 4×10^6 spores/ml로 접종농도를 조절하여 고체배양에 사용하였다[10].

2-2. 고체발효용 배지

고체발효 실험을 위해 글루코오스와 영양성분을 공급한 peat moss (PM, Schultz Company, Mississauga, Ontario, Canada)를 inert 고체배지로 사용하였다. 건조 peat moss (DPM)의 물리적/화학적 특성(밀도, 탄소함량, 총탄소량, 총질소량, 총인량, pH, $\text{NH}_4\text{-N}$ absorption capacity)을 Table 1에 정리하였다.

여러 완충용액의 pH가 구연산 생산에 미치는 효과를 실험하기 위해 phosphate, acetate와 carbonate 완충용액을 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 완충용액 자체의 pH와 완충용액을 영양성분과 peat moss와 혼합한 이후의 pH를 Table 2에 표시하였다. 각각의 완충용액에 아래와 같은 농도의 글루코오스와 영양성분을 첨가하여 peat moss와 혼합하여 고체배지로 사용하였다(kg peat moss): 967.9 g glucose, 15.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 43.9 g KH_2PO_4 , 4.0 g NaOH.

2-3. 고체발효

영양성분을 첨가한 완충용액 각 28 g을 각 7 g의 dried peat moss (DPM)에 혼합하여 고체배지로 사용하였다. 250 ml Erlenmeyer flask에 고체배지를 분주하고 foam stopper로 밀폐한 후, 121 °C에서 15분간 멸균하였다. Tween80으로 회수한 1 ml의 spore 용액(4×10^6 spores/ml)을 접종하여 35 °C 배양기에서 192 시간 동안 고체발효를 수행하

Table 1. Physico-chemical characteristics of the sphagnum peat moss after drying

Property	Units	Value
Bulk density	kg/m ³	276.4
Moisture content	%	52.7
Carbon	% DW	53.1
Nitrogen	% DW	2.1
Phosphorus	% DW	0.01
Potassium	% DW	0.15
Ash	% DW	2.8
Volatile solids	% DW	97.1
$\text{NH}_4\text{-N}$ absorption capacity	mg/kg	27.5
pH		4.38
Coarse fibre, (> 2.00 mm)	% DW	14.3
Medium fibre, (1.00-2.00 mm)	% DW	18.4
Fine fibre, (0.5-1.00 mm)	% DW	20.5
Very fine fibre (< 0.5 mm)	% DW	46.8

Note: All analysis are reported on a dry weight basis; the carbon content was calculated from $\{(100\% - \text{ash}\%) / 183\}$ [26]; DW=dry weight.

였다. 발효 후, 48, 96, 144, 192 시간에 각 flask에서 고체시료를 채취하여 증류수에 suspension시켜 구연산과 글루코오스 농도를 측정하였다.

2-3. 구연산 및 당 분석

구연산 정량은 pyridine과 acetic anhydride를 첨가한 후 420 nm에서 발색법으로 수행하였다[27]. 고체배지에 포함된 글루코오스 농도는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA)를 이용한 발색법으로 측정하였다[28]. 측정된 구연산과 글루코오스는 단위 건조 고체배지(DPM) 당 농도로 환산하여 표시하였다. 구연산 수율과 글루코오스 소모율은 아래와 같이 정의된다:

$$\text{구연산 수율(\%)} = 100 \times \frac{\text{생산된 구연산(g/l)}}{\text{소모된 글루코오스(g/l)}} \quad (1)$$

$$\text{글루코오스 소모율(\%)} = 100 \times \frac{\text{소모된 글루코오스(g/l)}}{\text{초기 글루코오스(g/l)}} \quad (2)$$

3. 결과 및 고찰

3-1. 고체배지의 초기 pH가 구연산 생산에 미치는 영향

완충용액의 pH (B)와 완충용액과 영양성분을 첨가한 고체배지의 pH (BNP)를 Table 2에 정리하였다. 완충용액의 pH 범위는 4.4~11.0 인 반면 멸균 후 고체배지의 pH는 4.5~6.9임을 알 수 있다. 이는 peat moss 자체 pH가 4.4임으로 염기성 완충용액 첨가 시 pH가 크게 떨어짐을 알 수 있다. 실험에 사용된 8가지 완충용액의 초기 pH가 구연산 생산에 미치는 영향을 발효 48, 96, 144, 192 시간에서 비교하였다(Fig. 1). 완충용액의 pH가 증가함에 따라 구연산의 생산성이 높아지는 경향성을 보이나, pH 11의 carbonate 완충용액의 경우 구연산 생산성이 pH 10의 carbonate 완충용액에 비해 떨어지는 것으로 보아, 고체배지의 초기 pH가 6.9 (BNP) 이상에서는 구연산 생산에 저해가 있음을 알 수 있다. 특히, 완충용액을 사용하지 않고 염기용액인 NaOH 만을 이용해 초기 pH를 조절한 경우(pH 4.4, pH 6.8), 완충용액을 사용한 동일 초기 pH 조건(PB 4.7, CB 10.0)에 비해 192 시간 기준으로 구연산 생산성이 각각 1.5배와 1.3배 증가함을 알 수 있었다. 이는 구연산 생산에 따른 배지 산성화를 완충용액에 의해 감

Table 2. Experimental buffer solutions and their effect on medium initial pH

Buffer	Treatment notation	Buffer strength	pH	
			Buffer (B)	Buffer+Nutrients+Peat moss (BNP)
NaOH*	pH 4.4	—	—	4.42
	pH 6.8	—	—	6.80
Phosphate (PB)	PB 4.7	0.2 M	4.68	4.48
	PB 6.1	0.2 M	6.09	5.67
	PB 8.6	0.2 M	8.60	6.43
Acetate (AB)	AB 4.9	0.1 M	4.92	4.80
	AB 6.1	0.1 M	6.05	5.48
Carbonate (CB)	CB 10.0	0.2 M	10.00	6.76
	CB 11.0	0.2 M	10.92	6.94

Note: *NaOH- control; pH adjustment using 1 N NaOH (or 1 N HCl).

(B)- pH of buffer solution.

(BNP)- pH of peat moss with buffer medium and nutrient solution after autoclaving.

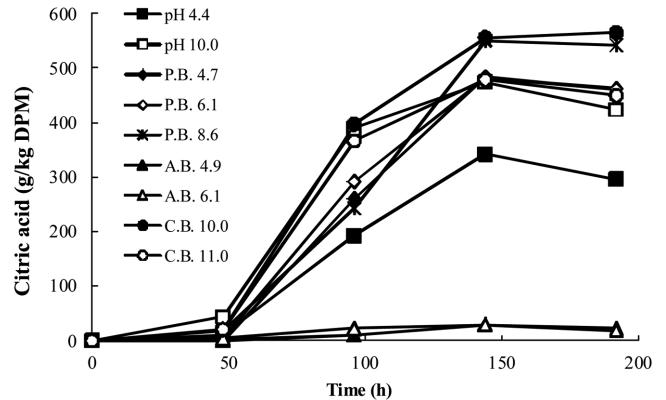


Fig. 1. Effects of buffer solutions on citric acid production by *A. niger*.

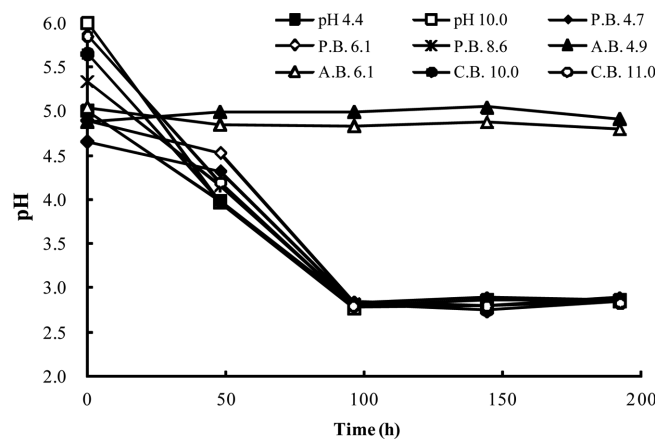


Fig. 2. Variation in PM pH with fermentation period.

소시킬 수 있으며 낮은 pH로 인한 세포성장을 저해를 감소시킬 수 있었다고 판단할 수 있다. 반면, acetate 완충용액의 경우 초기 pH 4.9와 6.1에서 구연산 생산이 30 g/kg DPM로 매우 낮음으로 보아 첨가된 acetate가 세포성장에 저해작용이 있었음을 유추할 수 있다. 이는 *A. niger*를 이용한 액체배양 조건에서 0.2% acetate 첨가가 세포성장을 57% 감소시켰다는 보고와 동일한 결과이며, 본 고체배양에서는 약 1% (0.1M acetate 완충용액 기준) 수준의 acetate가 첨가되어 세포 성장 및 구연산 생산에 저해작용이 있음을 알 수 있다.

Figs. 1과 2의 결과에서 높은 초기 pH가 구연산을 포함한 유기산 생성에 보다 적합하며 높은 pH 조건에서 보다 많은 유기산이 생성되어 고체배지의 pH가 낮아졌음을 예측할 수 있다. 구연산 생산과 고체배지 내의 pH 변화를 비교하였을 때, 구연산 생산농도가 높아짐에 따라 pH 감소속도가 빨라지는 것으로 보아, 고체배지의 pH 감소는 구연산에 의해 대부분 이루어지며 구연산 생산의 간접지표가 될 수 있다고 해석할 수 있다.

3-2. 고체배지의 초기 pH가 글루코오스 소비에 미치는 영향

완충용액의 초기 pH가 고체배지의 잔존 글루코오스의 농도에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타냈다. 잔당농도는 구연산 생산농도와 반비례하는 것으로 보이며 acetate 완충용액의 경우 세포성장 저해에 따라 당소비 및 구연산 생산능이 현저히 떨어짐을 볼 수 있다. 잔당농도에 있어 acetate 완충용액을 제외한 모든 pH 범위에서 유사함을 보이며 발효 192시간 이후 잔당의 농도가 18.7~43.3 g/kg DPM 임을

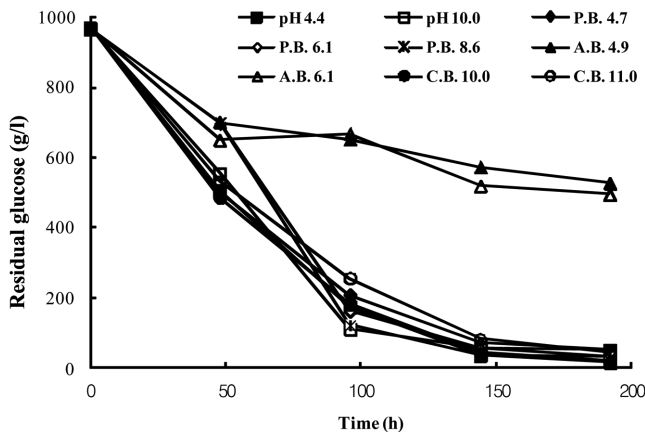


Fig. 3. Effect of various buffer solutions on residual glucose concentration.

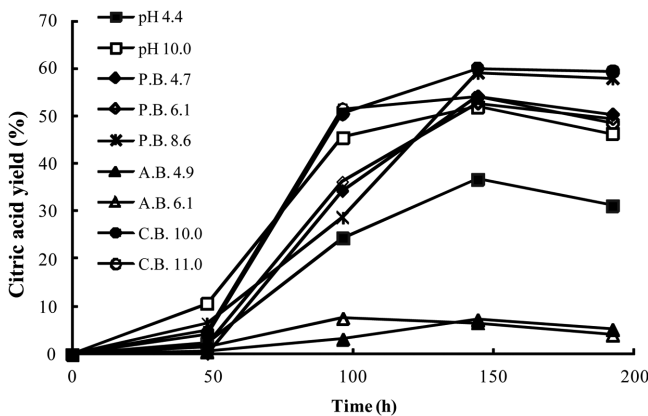


Fig. 4. Effect of various buffer solutions on citric acid yield.

감안할 때, 글루코오스 소모율이 95% 이상임을 알 수 있다. 소모당 기준으로 생산된 구연산을 수율로 표현했을 때(Fig. 3), acetate 완충용액을 제외한 모든 완충용액에서 당 소모율이 유사함으로 구연산 수율은 구연산 생산농도와 동일한 경향성을 보인다. 세포성장애 저해작용을 보인 acetate 완충용액의 경우 소모된 글루코오스 대비 구연산 수율이 7.6과 9.6%이었다. 반면, carbonate 완충용액(CB 10.0)과 phosphate 완충용액(PB 8.6)의 경우 구연산 수율이 59.4%로 대조 군인 pH 4.4에 비해 1.8배의 수율 증가를 보였다.

4. 결 론

고체발효법을 이용한 구연산 생산에 있어 고체배지의 초기 pH가 구연산 생산에 유의한 효과를 보임을 알 수 있었다. 특히 NaOH를 이용한 초기 pH 조절 완충용액을 사용하여 초기 pH를 조절했을 때, 보다 효과적인 구연산 생산을 얻을 수 있었다. 특히, carbonate (pH 10.0)과 phosphate (pH 8.6) 완충용액을 사용한 경우에 고체배지의 초기 pH가 각각 6.8과 6.4로 형성되며, 구연산 생산성 증대효과가 가장 큼을 알 수 있었다[29]. 이는 Roukas [15]의 연구결과에 따르면 구연산과 클루론산 생산을 위한 고체배양에 있어 약산성 조건에서 생산성이 가장 높다는 것과 일치하는 결과이다. 고체배지에 산 또는 염기를 첨가하여 pH를 조절하는 기존의 실험과 달리 본 실험은 완충용액을 사용하여 발효기간 중 생산되는 구연산에 의한 pH 감소 및

세포성장 저해를 최소화하여, 산 또는 염기를 이용한 pH 조절법 대비 구연산 생산성을 1.5배 증대시켰다는데 연구의 의의가 있다고 하겠다.

참고문헌

1. Robinson, T., Singh, D. and Nigam, P., "Solid-state Fermentation; a Promising Microbial Technology for Secondary Metabolite Production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 284(2001).
2. Fujio, Y., Ogata, M. and Ueda, S., "Ethanol Fermentation of Raw Cassava Starch with Rhizopus Koji in a Gas Circulation Type Fermentor," *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1270(1985).
3. Tengerdy, R. P., "Solid State Fermentation," *Trends Biotechnol.*, **3**, 96(1985).
4. Omori, T., Takeshima, N. and Shimoda, M., "Formation of Acid-Labile α -Amylase During Barley-kogi Production," *J. Ferm. Bioeng.*, **78**, 27(1994).
5. Bellon-Maurel, V., Orliac, O. and Christen, P., "Sensor and Measurements in Solid State Fermentation: a Review," *Process Biochem.*, **38**, 881(2003).
6. Szakacs, G. and Tengerdy, R. P., "Production of Cellulose and Xylanase with Selected Filamentous Fungi by Solid Substrate Fermentation," *ACS sym. series*. Washington D.C., 175(1996).
7. Gutierrez-Correa, M., Portal, L., Moreno, P. and Tengerdy, R. P., "Mixed Culture Solid Substrate Fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on Sugar Cane Bagasse," *Biore-sour. Technol.*, **68**, 173(1999).
8. Ellaiah, P., Srinivasulu, B. and Adinarayana, K., "Optimization Studies on Neomycin Production by Mutant Strain Streptomyces Marinensis in Solid State Fermentation," *Process Biochem.*, **39**, 529(2004).
9. Goes, A. P. and Sheppard, J. D., "Effect of Surfactant on α -Amylase Production in a Solid Substrate Fermentation Process," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **73**, 709(1999).
10. Barrington, S., Kim, J. S., Wang, L. and Kim, J. W., "Optimization of Citric Acid Production by *A. niger* Grown in a Column Bioreactor," *Korean J. Chem. Eng.*, **29**, 2(2009).
11. Rezaei, P. S., Darzi, G. N. and Shafaghat, H., "Optimization of the Fermentation Condition and Partial Characterization for Acido-Thermophilic α -Amylase from *Aspergillus Niger* NCIM 548," *Korean J. Chem. Eng.*, **27**, 3(2010).
12. Hang, Y. D., Luh, B. S. and Woodams, E. E., "Microbial Production of Citric Acid by Solid State Fermentation of Kiwifruit Peel," *J. Food Sci.*, **52**, 226(1987).
13. Hang, Y. D. and Woodams, E. E., "Production of Citric Acid from Corncocks by *Aspergillus niger*," *Biore-sour. Technol.*, **65**, 251(1998).
14. Kumar, D., Jain, V. K., Shanker, G. and Srivastava, A., "Utilisation of Fruits Waste for Citric Acid Production by Solid State Fermentation," *Process Biochem.*, **38**, 1731(2003).
15. Roukas, T., "Citric and Gluconic Acid Production from Fig by *Aspergillus niger* Using Solid-State Fermentation," *J. Ind. Micro-bio. Biotechnol.*, **25**, 298(2000).
16. Uyar, F. and Baysal, Z., "Production and Optimization of Process Parameters for Alkaline Protease Production by a Newly Isolated *Bacillus* sp. Under Solid State Fermentation," *Process Biochem.*, **39**, 1893 (2003).

17. Fawole, O. B. and Odunfa, S. A., "Some Factors Affecting Production of Pectin Enzymes by *Aspergillus niger*," *Int. Biodeterioration*, **51**, 223(2003).
18. Kamini, N. R., Mala, J. G. S. and Puvanakrishnan, R., "Lipase Production from *Aspergillus niger*, by Solid-state Fermentation Using Gingelly Oil Cake," *Process Biochem.*, **33**, 505(1998).
19. Watanabe, T., Suzuki, A., Nakagawa, H., Kirimura, K. and Usami S., "Citric Acid Production from Cellulose Hydrolysate by 2-Deoxyglucose Resistant Mutant Strain of *Aspergillus niger*," *Bioresour. Technol.*, **66**, 271(1998).
20. Adham, Z., "Attempts at Improving Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* in Beet-Molasses Medium," *Biores. Technol.*, **84**, 97(2002).
21. Lesniak, W., Pietkiewicz, J. and Podgorski, W., "Citric Acid Fermentation from 241 Starch and Dextrose Syrups by a Trace Metal Resistant Mutant of *Aspergillus niger*," *Biotechnol. Lett.*, **24**, 1065(2002).
22. Nagel, F., Oostra, J., Tramper, J. and Rinzema, A., "Improved Model System for Solid-Substrate Fermentation: Effect of pH, Nutrients and Buffer on Fungal Growth Rate," *Process Biochem.*, **35**, 69(1999).
23. Jianlong, W. and Ping, L., "Phytate as a Stimulator of Citric Acid Production by *Aspergillus niger*," *Process Biochem.*, **33**, 313 (1998).
24. Abou-Zeid, A. and Ashy, M., "Production of Citric Acid: a Review," *Agr. Wastes*, **9**, 51(1984).
25. Manohar, B. and Divakar, S., "Application of Central Composite Rotatable Design to Lipase Catalysed Synthesis of *m*-cresyl Acetate," *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 745(2002).
26. Barrington, S., Choiniere, D., Trigui, M. and Knight, W., "Effect of Carbon Source on Compost Nitrogen and Carbon Losses," *Biores. Technol.*, **83**, 189(2002).
27. Marier, J. R. and Boulet, M., "Direct Determination of Citric Acid In Milk with Improved Pyridine-Acetic Anhydride Method," *Dairy Sci.*, **41**, 1683(1958).
28. Miller, G. L., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars," *Ana. Chem.*, **31**, 426(1959).
29. Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P., Teodoro, J., Pandey, A. and Soccol, C. R., "Improvement on Citric Acid Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC Mutant Using Citric Pulp," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **158**, 72(2009).
30. Baker, S. E., *Aspergillus niger* Genomics: Past, Present and into the Future," *Medical Mycology*, **44**, S17(2006).
31. Yuan, X. L., Van der Kaaij, R. M., Van den Hondel, C. A., Punt, P. J., Van der Maarel, M. J., Dijkhuizen, L. and Ram, A. F., "*Aspergillus niger* Genome-Wide Analysis Reveals a Large Number of Novel Alpha-Glucan Acting Enzymes with Unexpected Expression Profiles," *Mol Genet Genomics*, **279**, 545 (2008).