

농부산물을 이용한 고체발효에서 발효조건이 목질계 분해 효소 생산에 미치는 영향

김진우[†]

맥길대학교 바이오시스템공학과, 몬트리올, 캐나다, H9X 3V9
(2014년 2월 24일 접수, 2014년 3월 9일 수정본 접수, 2014년 3월 19일 채택)

Effects of Fermentation Parameters on Cellulolytic Enzyme Production under Solid Substrate Fermentation

Jin-Woo Kim[†]

Department of Biosystems Engineering, McGill University, Ste Anne de Bellevue, Canada, H9X 3V9
(Received 24 February 2014; Received in revised form 9 March 2014; accepted 19 March 2014)

요 약

목질계 분해효소 활성 증대를 위해 밀짚을 이용한 고체발효에서 주요 발효인자의 최적화를 수행하였다. *Trichoderma reesei*와 *Aspergillus niger*를 이용한 혼합배양에서 고체발효에 주요한 영향을 미친다고 알려진 배양온도, pH, 수분함량과 고체기질 크기를 순차적 최적화를 진행하였다. 실험에 적용된 인자 모두 목질계 분해효소 활성에 유의한 효과를 주었으며, 발효온도 40 °C, pH 7, 수분함량 75%와 고체기질 크기 0.25~0.5 mm가 목질계 분해효소 생산을 위한 최적 조건임을 알 수 있었다. 최적조건 하에서 밀짚을 이용한 고체발효를 수행하였을 때, 효소활성 기준 cellulase 10.3 IU, endoglucanase 100.3 IU, β -glucosidase 22.9 IU와 xylanase 2261.7 IU/g dry material을 배양 96시간에 확인할 수 있었다. 본 결과는 기존 효소활성 대비 각각 72.6, 48.7, 55.2와 51.9% 증가한 수치로 혼합배양과 순차적 최적화를 적용하여 효과적인 목질계 분해효소 활성 증대가 가능함을 확인하였다.

Abstract – The present study was carried out to optimize fermentation parameters for the production of cellulolytic enzymes through solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* grown on wheat straw. A sequential optimization based on one-factor-at-a-time method was applied to optimize fermentation parameters including temperature, pH, moisture content and particle size. The results of optimization indicated that 40 °C, pH 7, moisture content 75% and particle size between 0.25~0.5 mm were found to be the optimum condition at 96 hr fermentation. Under the optimal condition, co-culture of *T. reesei* and *A. niger* produced cellulase activities of 10.3 IU, endoglucanase activity of 100.3 IU, β -glucosidase activity of 22.9 IU and xylanase activity of 2261.7 IU/g dry material were obtained. Cellulolytic enzyme production with optimization showed about 72.6, 48.8, 55.2 and 51.9% increase compared to those obtained from control experiment, respectively.

Key words: Solid State Fermentation, Co-culture, Cellulolytic Enzyme, Optimization, Biorefinery

1. 서 론

국제 원유가격 상승과 온실가스 배출 규제에 의해 바이오연료의 미래에 대한 관심이 전 세계적으로 증가하고 있다. 바이오연료 생산 중 80%를 차지하는 바이오에탄올의 생산량은 전세계 기준 2000년 182억 리터에서 2012년 974억 리터로 5배 이상 증가했으며 2020년 1,559억 리터 생산이 예상되고 있다. 신재생 에너지 중, 바이오에탄올은 수송용 연료의 대체가 가능하며 경쟁력 있는 유일한 후보이다.

현재, 수송용 연료 중 바이오에탄올이 차지하는 비중은 약 2%에 불과하나 2020년엔 9.3%에 달할 것이라는 전망이다[1]. 이러한 필요성과 수요증대에 불구하고 대부분의 바이오에탄올은 전분계 및 당질계 식용작물을 이용한 제1세대 전환기술을 이용하여 생산되고 있다. 식용작물을 이용한 바이오연료 및 바이오소재 생산은 곡물가격의 상승, 식량부족, 경작지 감소와 윤리적 문제로 인해 식용작물 이용 한계론이 확산되고 있다[2].

제1세대 전환기술의 단점 극복을 위해 비식용 바이오매스를 이용한 바이오연료 개발에 관심이 증가하고 있다. 특히, 목질계 농부산물을 이용한 제2세대 전환기술 개발이 활발하게 연구되고 있다. 농/산업 부산물로 생산되는 볏짚, 밀짚, 옥수수대, 팜 부산물, 톱밥 등은 식용작물과 경쟁하지 않고 가격이 저렴하며 폐기 비용 절감과 수집이 용이한 우수한 원료로 평가되고 있다. 하지만 이러한 목질계 부산물로

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kimjw1028@hotmail.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

부터 발효당을 생산하는 공정은 식용작물 대비 에너지 소비가 큰 과제, 전처리, 당화와 발효공정을 포함하고 있어 생산비용이 높아 상용화에 어려움을 겪고 있다[3-5].

바이오에탄올 생산을 위한 공정 중 전처리와 당화는 강건한 목질계 구조를 연화시켜 발효당을 생산하는 공정이다. 전처리 공정의 목적은 당화와 발효에 저해물질로 작용하는 리그닌을 선택적으로 제거하는 동시에 셀룰로오스의 구조를 효소작용에 용이하게 변형시켜 당화과정에서 효소의 접근성을 증가시켜 단당류 생산을 극대화 함에 있다[6,7]. 당화과정은 목질계 분해효소인 *endoglucanase*, *exoglucanase*, β -glucosidase의 복합작용에 의해 협업적으로 발생하며, 현재 곰팡이 균으로부터 생산된 상업효소인 Celluclast 1.5 L, Novozyme 188, Ctec 2 등이 사용되고 있다. 위와 같은 상업용 효소의 경우, 전분 분해 효소 대비 낮은 효소활성으로 인해 사용량이 많아 바이오에탄올 생산가 기준 20~30%의 원가비중을 차지하고 있다. 이에, 목질계 농부산물을 이용한 바이오연료 상업화를 위해서는 고효율 복합효소 생산을 위한 균주개발과 함께 기존 액체 효소 생산공정 대체를 위한 고체발효법과 같은 효율적 공정개발이 필수적이라 하겠다[8,9].

고체발효법은 잉여수분이 최소화된 고체의 표면에서 미생물을 배양하는 전통적인 발효방법으로 아시아를 중심으로 발효식품 생산에 널리 사용되고 있다. 특히 곰팡이 균과 같은 부착 성장형 미생물을 이용한 유기산 및 효소 생산에 유리한 배양공정으로 발효에 사용되는 고체기질은 고착 표면뿐만 아니라 탄소원 및 질소원으로 사용된다[10,11]. 고체발효는 다양한 고체기질을 활용할 수 있으며 볏짚, 밀짚, 옥수수대, 감자 껍질, 오렌지 껍질 및 맥주 생산 부산물(spent brewers grains)을 포함한 농/산업부산물이 널리 사용되고 있다. 고체발효에서 세포성장과 산물생산은 고체기질의 종류, 배양온도, 산도, 수분함량, 입자 크기, 통기량 및 영양성분에 의해 크게 영향을 받으므로 고체발효에서 산물생산 증대를 위해서는 주요 발효인자의 최적화가 필수적이라 하겠다[12-14].

본 실험의 목적은 대표적인 농부산물인 밀짚을 고체기질로 활용하여 *T. reesei*와 *A. niger*의 혼합배양을 통한 목질계 분해효소 활성 증대를 위한 발효조건 최적화에 있다. 통계학적 최적화를 활용하여 기존에 목질계 효소생산에 주요한 효과를 준다고 알려진 배양온도, pH와 수분함량을 최적화하여 cellulase, endoglucanase, β -glucosidase와 xylanase 최대 생산 조건을 탐색하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 재료

Trichoderma reesei ATCC 56765과 *Aspergillus niger* ATCC 10864는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 포자(spore) 생산을 위해 고체배지인 potato dextrose agar plates (Sigma, St. Louis, USA)에서 30 °C 조건으로 7일간 배양하였다. Agar plate는 7일 간격으로 계대배양했으며, 배양 7일된 plate에서 0.1% Tween 80 (sigma, Sigma, St. Louis, USA) 용액을 사용하여 포자를 회수하여 희석을 통해 1.0×10^6 spores/ml 농도로 고체발효 접종에 사용하였다.

2-2. 고체발효용 배지

고체발효 실험을 위해 McGill 대학 농장으로부터 밀짚을 제공받아 영양성분을 첨가하여 고체기질로 사용하였다. 밀짚의 구성성분은

NREL 표준분석방법 001~004을 사용하여 분석하였다. 본 실험에 사용된 밀짚의 성분은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 함량은 각각 36.2, 23.0, 18.2%로 분석되었다 [15]. 고체기질에 첨가된 영양 성분은 농축액(x20)으로 제조하여 증류수와 혼합하여 고체기질에 첨가하였다. 고체기질에 첨가된 영양성분은 아래와 같다(kg dry solid material): 15.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 43.9 g KH_2PO_4 and 4.0 g NaCl.

2-3. 고체발효

건조된 7 g 바이오매스에 액체배지 각 28.5 ml을 혼합하여 250 ml Erlenmeyer flask에 분주하고 foam stopper로 밀폐한 후, 121 °C에서 15분간 멸균하였다. Tween 80로 회수한 1 ml의 포자 용액을 접종하여 96 시간 고체발효를 수행하였다. 각 flask에서 고체시료를 채취하여 50 ml 증류수와 혼합한 파쇄기에서 30초간 파쇄한 후 전체 내용물을 250 ml flask에 옮겨 4 °C 교반기에서 230 rpm으로 30분간 혼합하여 상등액을 막분리하여 효소활성 측정에 사용하였다.

2-4. 분석방법

효소용액으로부터 cellulase 활성 분석을 위해 Whatman #1 filter paper를 기질로 이용한 FPA (filter paper activity) 표준 측정을 수행하였다. Endoglucanase 활성 측정은 1% carboxymethyl cellulose (CMC)를 기질로 이용하여 측정하였다. β -glucosidase 활성은 1% pNPG 용액을 이용하여 0.05 M acetate buffer (pH 4.6)에서 효소용액 0.5 mL과 혼합하여 생산된 당당을 DNS법을 이용한 발색법으로 정량하였다 [16,17].

3. 결과 및 고찰

3-1. 배양온도에 따른 영향

목질계 분해효소 활성에 미치는 배양온도의 영향을 비교하기 위해 발효조건 pH 6, 수분함량 70%와 혼합 고체배지(입자크기 2.0 mm 이하)를 기본조건으로 발효온도를 변화시켜(25~60 °C) 효소생산을 비교하였다. 목질계 효소 생산에 있어 발효에서 최적발효 온도는 40 °C에서 형성이 되었으며 cellulase 9.1 IU, endoglucanase 86.9 IU, β -glucosidase 19.1 IU와 xylanase 2073.1 IU/g dry material (DM)를 얻을 수 있었다(Fig. 1). 최적온도 이상이었던 50 °C에서는 효소생산이

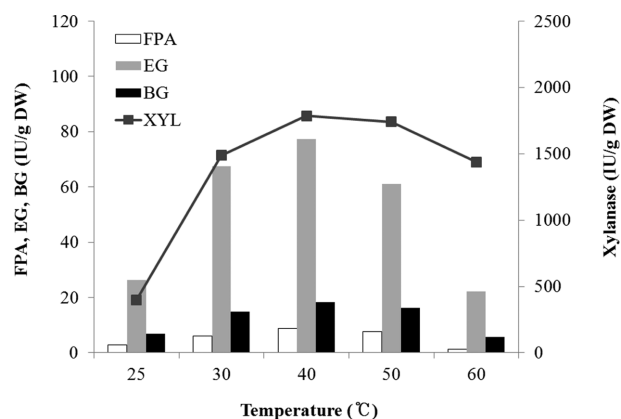


Fig. 1. Effect of fermentation temperature on cellulolytic enzyme production from SSF using co-culture on wheat straw at 96 hr. The other variables were fixed at: moisture content 70%, solid substrate pH of 6 and mixed particle (< 2.0 mm).

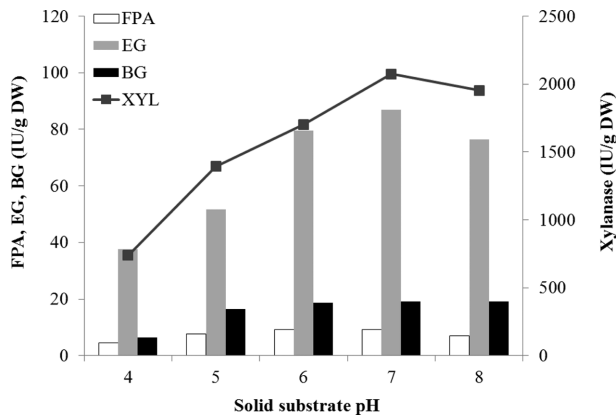


Fig. 2. Effect of the initial pH of solid substrate on cellulolytic enzyme production from SSF using co-culture on wheat straw at 96 hr. The other variables were fixed at: fermentation temperature 40 °C, moisture content 70% and mixed particle (< 2.0 mm).

감소함을 확인할 수 있었다. 이는 배양온도 증가에 따라, 열전도도가 낮은 고체배지의 내부 온도상승으로 TCA 회로 관련 효소들이 고온에서 활성저하가 발생하여 세포성장이 저하되고 그에 따른 목적산물 생산이 감소하는 것으로 예상할 수 있다. 또한, 고온에서 수분 증발량이 증가함에 따라 발효 후반부의 최적 수분함량인 70~80% 대비 낮은 수분함량을 가짐에 따라 균사체의 성장보다는 포자 생성향으로 성장주기를 전환되어 효소생산이 감소했다고 결론지을 수 있다. 최적 조건 적용 시, 기준 배양조건인 30 °C에서 진행된 고체발효 실험 대비 목질계 효소 생산이 각각 48.6, 14.6, 24.3과 19.9% 증가된 결과이다.

3-2. 고체기질 산도에 따른 영향

고체배양에서 발효온도와 함께 초기 pH는 유기산 및 효소생산에 중요한 변수로 알려져 있으며, 본 실험서 발효온도 40 °C, 수분함량 70%, 입자크기 2.0 mm 이하를 기준조건으로 고체배지의 초기 산도를 완충용액 첨가를 통해 pH 4~8 범위로 조절하여 효소생산을 비교하였다[18,19]. Fig. 2에서 보는 바와 같이 고체기질의 산도가 7로 증가함에 따라 효소생산이 크게 증가하여 각 9.1, 86.9, 19.1과 2073.1 g/g DM 생산량이 확인되었다. 목질계 효소생산이 생산이 pH 7에서 최대를 이루었는데 이는 Bansal 등이 *A. niger*를 이용한 고체배양에서 보고한 cellulase와 β -glucosidase의 활성과 동등한 수준이다[20]. 고체배양은 액체배양과 다르게 정체배양의 특징을 가지며, 발효 중 고체기질의 혼합이 최소화되고 산도 조절을 위한 산 또는 염기의 투입이 없는 이유로 고체배양 중 생산되는 유기산에 의해 고체기질의 산도 감소가 발생하게 된다. 유기산에 의한 산도감소로 인해 세포성장 및 효소생산이 저해됐다고 판단할 수 있으며 발효 중, 고체배지의 산도감소를 방지하기 위해 발효초기에 산도조절을 위해 첨가하는 완충용액의 종류와 농도의 최적화가 필수적이라 하겠다[21].

3-3. 수분함량에 따른 영향

고체배양에서 기질로 사용된 밀짚의 초기 수분함량이 목질계 분해효소 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 고체배지에 밀균 종류 수 혼합량을 조절하여 수분함량 69~85% 조건에서 효소생산 실험을 수행하였다. Fig. 3의 결과와 같이 밀짚의 초기 수분함량이 효소생산에 유의한 영향을 미치며, 수분함량 75%에서 최대 효소생산을 확인

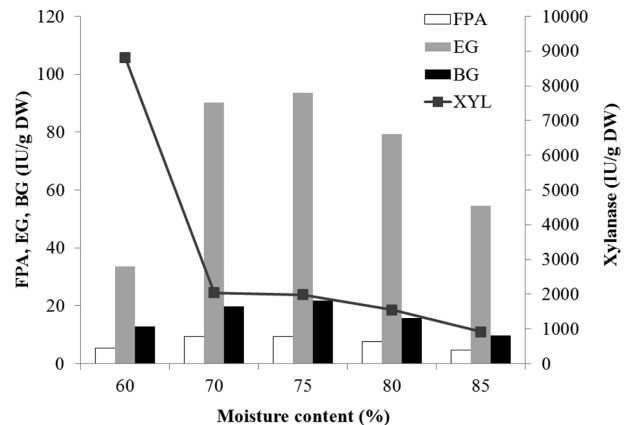


Fig. 3. Effect of the initial moisture content of solid substrate on cellulolytic enzyme production from SSF using co-culture on wheat straw at 96 hr. The other variables were fixed at: fermentation temperature 40 °C, solid substrate pH of 7 and mixed particle (< 2.0 mm).

할 수 있었던 반면, 70% 이하의 수분함량에서 효소생산이 크게 감소함을 알 수 있었다. 특히, 수분함량 50% 이하의 경우 효소 생산이 크게 감소해 4.5 g/g DM 이하임을 확인할 수 있었다. 고체기질 내의 수분은 산소 및 영양분의 확산에 중요한 매개체 작용을 하며 함수율 감소로 인해 영양분과 기체 공급제한이 발생하여 세포성장 저해의 원인이 되었으며 이에 따른 효소 생산 감소가 발생했다고 판단된다[22,23]. 반면 수분함량 80% 이상에서는 효소 생산이 감소하는 경향을 보였는데, 기존 연구에 따르면 효소생산에 적합한 수분함량은 60~80%이며 적정수준 대비 높은 수분함량에서는 잉여수분이 발생하여 통기를 제한, 채널링(channeling), 산소공급 저해 및 균사체 성장 저해가 발생하여 세포성장 및 효소생산을 저해한다고 알려져 있다[24,14].

3-4. 입자크기에 따른 영향

고체기질 입자크기는 고체배양 중 통기율, 가스교환, 열전달, 수분함유량 및 미생물 고정에 영향을 주는 인자로 알려져 있다[25]. 목질계 분해효소 활성에 미치는 파쇄밀짚의 입자크기의 영향을 파악하기 위해 입자크기 0.15~4.0 mm 범위에서 96시간 발효를 진행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 입자크기 0.25~0.5 mm 범위에서 최대 효

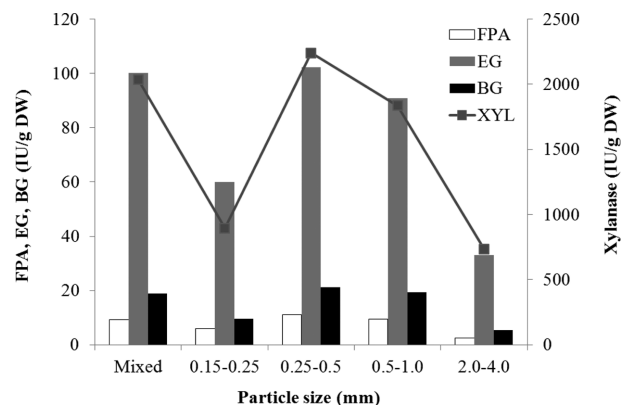


Fig. 4. Effect of the particle size of solid substrate on cellulolytic enzyme production from SSF using co-culture on wheat straw at 96 hr. The other variables were fixed at: fermentation temperature 40 °C, solid substrate pH of 7 and moisture content of 75%.

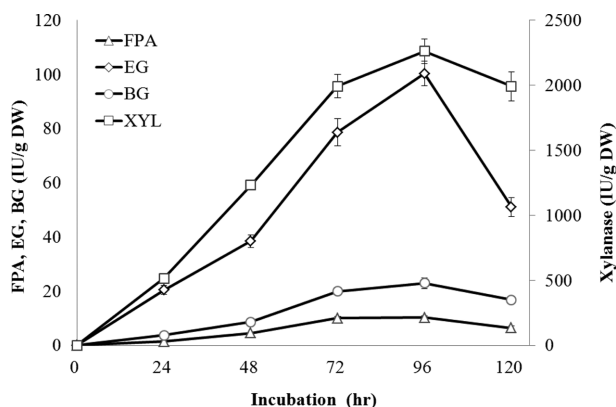


Fig. 5. Time course behavior of cellulolytic enzyme production under the optimal fermentation condition from SSF using co-culture on wheat straw (Δ : cellulase activity-FPA, \diamond : endoglucanase activity, \circ : β -glucosidase activity, \square : xylanase activity). Fermentation temperature 40 °C, solid substrate pH of 7, moisture content of 75% and solid substrate particle size between 0.25 and 0.5 mm.

소생산인 11.2, 102.2, 21.3과 2239.3 IU/g SM을 얻을 수 있었으며 입자크기 증가 또는 감소에 따라 효소생산이 급격하게 감소함을 확인할 수 있었다. 기존의 연구에 따르면 고체발효에 적합한 입자크기는 0.1~0.5 mm로 입자크기 감소에 따른 표면적 증가로 고착표면 증가와 함께 함수율을 증가가 발생하여 발효 후반까지 세포활성 유지가 가능하여 산물생산이 지속적으로 증가한다고 보고하고 있다. 한편, 0.1 mm 이하의 입자크기에서는 공극감소, 통기율 감소와 막힘(clogging) 현상 발생에 따라 효소생산이 감소된다고 알려져 있다. 본 실험을 통해 수분함량 최적화로 기준배양 조건 대비 목질계 효소 생산이 2~21% 증가된 결과를 얻을 수 있었다.

4. 결 론

바이오연료 생산에 있어 가격 경쟁력 있는 효소생산이 상업화 공정개발의 핵심 요소로 대두됨에 따라, 기존의 액체발효가 아닌 농부산물을 이용한 고체발효법이 친환경적이고 경제적인 대안으로 주목을 받고 있다. 기존 실험에서 *T. reesei*와 *A. niger*의 혼합배양을 적용하였을 때, 목질계 효소 간 상승작용에 의해 각 균주의 단일배양에 비해 효소 생산이 증가함을 확인할 수 있었다. 이에 대한 후속 연구로 밀짚에서 혼합배양을 이용한 목질계 효소 생산 증진을 위해 주요 발효조건인 온도, pH, 수분함량과 파쇄벧짚 크기를 순차적으로 최적화하여 효소 생산을 효과적으로 증진시킬 수 있었다. 효소생산 검증 실험에서, cellulase 10.3 IU, endoglucanase 100.3 IU, β -glucosidase 22.9 IU과 xylanase 2261.7 IU/g DM의 효소생산을 재확인할 수 있었다(Fig. 5). 4개의 주요한 영향인자를 순차적 최적화하였을 때, 최적화 이전 수준인 5.9, 67.4, 14.8와 1488.8 IU/g DM에 비해 효소활성이 51~73% 증가함을 확인할 수 있었다.

References

- Limayema, A. and Rickea, S. C., "Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects," *Prog. Energy Combust.*, **38**(4), 449-467(2012).
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. and Aikat, K., "Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An Overview," *Renew. Energy.*, **37**(1), 19-27(2012).
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S. and Verma, M., "Bioproduction and Extraction Optimization of Citric Acid from *Aspergillus niger* by Rotating Drum Type Solid-state Bioreactor," *Ind. Crop Prod.*, **41**, 78-84(2013).
- Kim, S. B., Lee, J. H., Oh, K. K., Lee, S. J., Lee, J. Y., Kim, J. S. and Kim, S. W., "Dilute Acid Pretreatment of Barley Straw and Its Saccharification and Fermentation," *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **16**(4), 725-732(2011).
- Go, A. R., Ko, J. W., Lee, S. J., Kim, S. W., Han, S. O., Lee, J. W., Woo, H. M., Um, Y. S., Nam, J. W. and Park, C. H., "Process Design and Evaluation of Value-added Chemicals Production from Biomass," *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **17**(5), 1055-1061(2012).
- Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Aqueous Ammonia," *Bioresour. Technol.*, **90**(1), 39-47(2003).
- Kim, K. S. and Kim, J. S., "Optimization of Ammonia Percolation Process for Ethanol Production from *Miscanthus Sinensis*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **48**(6), 704-711(2010).
- Singhania, R. R., Shkumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C. and Pandey, A., "Advancement and Comparative Profiles in the Production Technologies Using Solid-state and Submerged Fermentation for Microbial Cellulases," *Enzyme Microb. Technol.*, **46**(7), 541-549(2010).
- Dhillon, G. S., Bra, S. K. and Surinder, K., "Potential of Apple Pomace as a Solid Substrate for Fungal Cellulase and Hemicellulase Bioproduction Through Solid-state Fermentation," *Ind. Crop Prod.*, **38**, 6-13(2012).
- Barrington, S. and Kim, J. W., "Response Surface Optimization of Medium Components for Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown in Peat Moss," *Bioresour. Technol.*, **99**(2), 368-377(2008).
- Kim, J. W. and Barrington, S., "Response Surface Optimization of Medium Components for Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown in Peat Moss," *Bioresour. Technol.*, **99**(2), 368-377(2008).
- Pensupa, N., Jin, M., Kokolski, M., Archer, D. B. and Du, C. A., "A Solid State Fungal Fermentation-based Strategy for the Hydrolysis of Wheat Straw," *Bioresour. Technol.*, **149**, 261-267(2013).
- Kim, J. W., Barrington, S., Sheppard, J. and Lee, B., "Nutrient Optimization for the Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown on Peat Moss Enriched with Glucose," *Process Biochem.*, **41**(6), 1253-1260(2006).
- Rezaei, P., Darzi, G. and Shafaghath, H., "Optimization of the Fermentation Conditions and Partial Characterization for Acidothermophilic α -amylase from *Aspergillus niger* NCIM 548," *Korean J. Chem. Eng.*, **27**(3), 919-924(2010).
- NREL. Chemical analysis testing standard procedure nos. 001-004 and 009. 1996; National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Rahikainen, J., Mikander, S., Marjama, K., Tamminen, T., Lappas, A., Viikari, L. and Kruus, K., "Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins from Softwood-study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-rich Surface," *Biotechnol. Bioeng.*, **108**(12), 2823-2834(2011).
- Takashima, S., Iilura, H., Nakamura, A., Hidak, M., Masaki, H.

- and Uozumi, T., "Overproduction of Recombinant *Trichoderma reesei* Cellulase by *Aspergillus oryzae* and Their Enzymatic Properties," *J. Biotechnol.*, **65**(2), 163-171(1998).
17. Jianlong, W. and Ping, L., "Phytate as a Stimulator of Citric Acid Production by *Aspergillus niger*," *Process Biochem.*, **33**(3), 313-316(1998).
18. Lotfy, W. A., Ghanem, K. M. and El-Helow, E. R., "Citric Acid Production by a Novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and Cost Reduction Studies," *Bioresour. Technol.*, **98**(18), 3464-3469(2007).
19. Bansal, N., Tewari, R., Soni, R. and Soni, S. K., "Production of Cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in Solid State Fermentation on Agricultural and Kitchen Waste Residues," *Waste Manag.*, **32**, 1341-1346(2012).
20. Kim, J. W., "Response Surface Optimization of Fermentation Parameters for Citric Acid Production in Solid Substrate Fermentation," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(5), 879-884(2012).
21. Roukas, T., "Citric Acid Production from Carob Pod by Solid-state Fermentation," *Enzyme Microb. Technol.*, **24**(1), 54-59(1999).
22. Nampoothiri, M. K., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. and Pandey, A., "Process Optimization for Antifungal Chitinase Production by *Trichoderma harzianum*," *Process Biochem.*, **39**(11), 1583-1590(2004).
23. Wen, Z. Y. and Chen, F., "Application of Statistically-based Experimental Designs for the Optimization of Eicosapentaenoic Acid Production by the Diatom *Nitzschia laevis*," *Biotechnol. Bioeng.*, **75**(2), 159-169(2001).
24. Ellaiah, P., Srinivasulu, B. and Adinarayana, K., "Optimization Studies on Neomycin Production by a Mutant Strain of *Streptomyces marinensis* in Solid State Fermentation," *Process Biochem.*, **39**(5), 529-534(2004).