

유리인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 Pellet 형성에 미치는 황토의 영향

†강 선 철 · 이 동 규

대구대학교 공과대학 생물공학과

(접수 : 1999. 3. 22., 게재승인 : 1999. 6. 8.)

Effects of Loess on the Mycelial Pellet Formation of Phosphate Dissolving Fungus, *Penicillium* sp. GL-101 in the Submerged Culture

Sun Chul Kang† and Dong Gyu Lee

Department of Biotechnology, College of Engineering, Taegu University, Kyungsan, Kyungbook 712-714, Korea

(Received : 1999. 3. 22., Accepted : 1999. 6. 8.)

In order to investigate effects of loess on the mycelial pellet formation a phosphate dissolving fungus, *Penicillium* sp. GL-101, was cultured in potato dextrose broth containing loess. The strain formed an amorphous pellet or loose aggregates agitated at a low speed(50rpm) while spherical and regular pellets at a high speed(150rpm). The higher concentration of loess, the smaller size of a pellet in the medium formed by the strain. Cultured in the medium supplemented with 15% loess the pellet size was reduced to a seventh compared to the control. In the case of addition of several insoluble salts, which are main components of loess, to the culture medium the higher concentrations of salts, the smaller sizes of pellet formed by the strain and the smallest pellet was formed by the addition of calcium sulfate.

Key Words : pellet formation, phosphate dissolving fungus, *Penicillium* sp. GL-101, loess

서 론

인은 식물체에서 핵산, 인지질, phylates 등의 중요 구성성분이며 식물성장에 필요한 에너지 대사에서도 중요한 역할을 한다. 인비료의 일종인 인광석을 작물에 사용하였을 때 토양중의 인산가용화균의 작용으로 식물에 이용될 수 있다(1). 그러나 토양에 잔존하는 인산가용화균은 그 수가 매우 적고 인산가용화 활성이 낮으므로 환경친화적인 유기농법에 적당하지 않다. 따라서 인산가용화능이 우수한 미생물을 생물비료(biofertilizers)로 개발하여 인광석과 같이 섞어 사용하면 작물의 인 공급 효과를 높일 수 있는 하나의 방법이 된다.

인산가용화균을 이용한 환경친화형 생물비료 개발을 위한 연구는 1950년대에 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물(phosphobacteria)의 분리 및 토양시비로부터 시작되었으며(2), 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나 *Bacillus megaterium*(2), *B. polymyxa*(3), *Pseudomonas striata*(3,4), *Pseudomonas* sp. (PI18/89)(5), *Penicillium simplicissimum*(6), *P. aurantiogriseum*(7), *P. bilaii*(2),

Aspergillus awamori(4,8), *A. aculeatus*(9), *A. niger*(6) 등의 인산가용화균을 biofertilizers로 사용했을 때 cereals, legumes, potatoes, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고되고 있다(2). 국내에서도 이러한 노력의 일환으로 인산염으로부터 유리인산을 생성하는 인산가용화 사상균들이 분리, 동정되었으며 그 배양적 특성이 보고되었다(10).

유리인산 생산균을 생물비료화하기 위한 노력의 일환으로 인산가용화능이 우수한 *Penicillium* sp. GL-101을 대량생산하기 위하여 액침배양하였을 때, 배양용 배지에서 상당한 크기의 mycelial pellet이 형성되었다 Mycelial pellet이 형성되면 표면적 감소에 따른 산소 및 영양분 흡수율 감소, 성장률 감소 등의 비효율적 배양적 특성이 나타난다(11). *Penicillium* 및 *Aspergillus* 등 생물공학적으로 중요한 사상균을 대량배양할 때, pellet 형성을 억제하거나 pellet의 크기를 줄일 수 있는 몇 가지 방안들이 보고되었다 Amadek은 Tween 80을 배지중에 첨가하여 pellet 형성을 억제하였으며(12), Inch와 Trinci는 고농도의 glucose를 첨가함으로써 수분활성도(water activity)를 낮추어 pellet 형성을 억제하였다(13). 또한 Humphreys 등은 배지중에 polyethylene glycol 200(PEG 200)을 첨가함으로써 수분활성도를 낮추어 pellet 형성을 억제하였으며(14), Kleespies 등은 균주의 종류, 배양초기 pH, 배지 종류에 의해서도 pellet 형성에서 차이가 생길 수 있음을 보고하였다(15). 그러나 이러한 연구 성과에도 불구하고 사상균의 발효공학에서 pellet 형성의 억제는 여전히 해결하기 어려운 과제로 남아있다.

† Corresponding Author . Department of Biotechnology, College of Engineering, Taegu University, Kyungsan, Kyungbook 712-714, Korea

Tel : 053-850-6553, Fax : 053-850-6509

e-mail : sckang@biho.taegu.ac.kr

한편 황토는 여러 가지 광물입자로 구성되어 있는데, 그 크기는 0.02-0.05mm이며, 조립질과 중립질의 먼지를 포함한다. 이 범위의 크기를 갖는 입자비율은 무게비로 전체의 50%이고, 점토 크기(0.005mm 이하)의 입자들은 5-10% 정도이다. 황토의 화학적 조성은 SiO₂가 50-60%, Fe₂O₃(3가 산화철) 2-4%, Al₂O₃ 8-12%, FeO(2가 산화철) 0.8-1.1%, TiO₂ 0.5%, MnO 0.5%, CaO(석회) 4-16%, MgO 2-6% 정도로 구성되어 있다(16). 또한 황토는 석영, 장석, 운모, 방해석 등이 들어 있어서 이들 물질이 철분과 함께 산화작용을 받아 황색, 자색, 적색, 회색, 미녹색 등 다채로운 색깔을 나타낸다. 본 연구에서 유리 인산 생성균의 액침배양중 pellet 형성을 억제하기 위한 방법으로 상기의 물리, 화학적 특성을 갖고있는 황토를 배양액에 첨가하여 배양적 특성을 조사하였다. 또한 황토의 농도별, 화학적 성분별로 pellet 형성에 미치는 영향을 분석하여 기술하였다.

재료 및 방법

사용균주, 배지 및 시약

공시균주는 본 연구실에서 인산가용화능이 우수한 균주를 탐색하여 토양으로부터 선발 및 분리한 *Penicillium* sp. GL-101 균주를 사용하였다(10). 이 균주는 PDA(potato dextrose agar-potatoes infusion 200g, dextrose 20g, agar 15g)배지에서 배양하여 유지하였으며, 액침배양에는 PDA에서 agar를 제외한 PDB(potato dextrose broth) 배지를 사용하였다. 실험에 사용된 분생포자는 공시균주를 PDA 배지에서 25°C로 10일간 배양하여 형성된 포자이고 각 실험마다 새롭게 형성된 포자를 사용하였다. 배양배지에 첨가한 SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃, CaCO₃, CaSO₄, MgCO₃ 등 그 밖의 모든 시약은 Sigma Co.(USA)제품을 사용하였다.

황토 채취 및 성분분석

황토의 채취는 경북 일대의 황토지대를 탐방하여 지상으로부터 1m 깊이까지 판 후에 표토와 섞이지 않도록 주의하여 채취하였다. 이것을 음지에서 1주일간 건조한 후 막자사발로 가볍게 간 후에 0.05mm 이내의 고운 분말이 생기도록 체로 걸렀다. 선별된 토양은 토양화학분석법(17)에 따라 성분분석을 실시하였다.

유리인산 생성균의 pellet 크기 및 균체량 측정

공시균주의 액침배양시 황토 첨가에 따른 mycelial pellet의 크기 및 균체 생성량의 변화를 알아보기 위하여 30ml의 PDB 배지가 들어있는 100ml 삼각플라스크에 황토를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0%(W/V) 농도로 첨가하고, 1×10⁶ 개의 분생포자를 접종한 후 25°C에서 4일간 진탕배양하였다. 이 배양배지 중에 형성된 pellet을 plate에 옮긴 다음 해부현미경 하에서 pellet의 크기를 측정하였다.

황토 농도가 균체 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 freeze drying한 황토를 이용하여 *Penicillium* sp. GL-101을 상기의 방법으로 배양하였다. 이 배양액을 원심분리(3,000×g, 10mm)하여 수확한 균체를 freeze drying하여 함수율이 0%[Moisture analyzer, Mettler LJ16 (Swiss)]가 될 때까지 건조한 후 정량하였으며, 이 값에서 배지에 첨가한 황토량을 뺀 값을 균체량으로 결정하였다.

황토의 주요성분들이 사상균의 pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃, CaCO₃, CaSO₄, MgCO₃를 각각 0.001, 0.01, 0.1, 1.0%(W/V) 농도로 첨가한 PDB배지에서 상기의 방법으로 *Penicillium* sp. GL-101을 배양한 후, pellet 크기를 측정하였다. 이상의 실험은 3회 반복 수행하였으며 평균값을 구하여 유의성을 높였다.

결과 및 고찰

황토의 성분분석

유리 인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 pellet 형성을 억제하기 위한 방법으로 황토를 배양액에 첨가하기 위하여 먼저 대구·경북 일대의 3개 지점(진량, 정산, 대구)에서 황토를 채취하여 토양화학분석법(17)에 따라 이들의 성분분석을 실시하였다(Table 1). 그 결과 채취원에 따라 황토의 물성이 다르게 나타났으며 치환성 양이온양에서 큰 차이를 보였다.

한편 본 연구의 예비실험에서 각 지역에서 채취한 황토를 1% 농도로 배양배지에 첨가하여 액침배양하였을 때, 진량지역의 황토에서는 약 1/4배, 대구지역의 황토에서는 약 1/3배, 정산지역의 황토에서는 약 1/7배의 pellet size 감소가 있었다. 이같은 차이는 황토의 채취원에 따라 치환성 양이온량의 차이가 큰 것과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다(Table 1). 따라서 치환성 양이온량이 가장 큰 정산지역에서 채취한 황토 표본을 공시토양으로 이용하여 다음 실험을 수행하였다.

배양배지중 황토의 농도가 pellet 형성에 미치는 영향

Penicillium sp. GL-101은 황토 농도에 관계없이 50rpm의 속도로 배양했을 경우에 원형의 pellet이 아닌 매우 불규칙적이고 무정형의 pellet을 형성하였다. 반면에 150rpm의 속도로 진탕배양했을 때는 구형의 pellet을 형성하였다(Figure 1). 이상의 결과는 *Aspergillus niger*(18)와 *Phanerochaete chrysosporium* (19)의 액침배양에 대한 결과와 유사하였다. 이것은 *Penicillium* sp. GL-101 분생포자가 낮은 속도로 교반할 경우 배양초기에 매우 큰 agglomerate를 형성한 채 분산되지 않고 남아있기 때문에 무정형의 pellet이 형성되었으며, 교반의 속도가 빠를수록 교반의 물리적인 힘에 의하여 상대적으로 작은 agglomerate가 형성되었고 또 이 agglomerate가 시간이 경과할수록 작게 분산되어 작은 pellet을 형성한 것으로 사료된다(18). 결론적으로 교반의 속도가 agglomerate의 수를 많게하고, 이 agglomerate의 수가 많을수록 pellet의 크기는 작아지는 것으로 볼 수 있다(20). Table 2의 결과에 의하면 1.5% 황토 첨가에서 평균 0.4±0.1mm의 가장 작은 pellet이 형성되었는데, 이는 대조군에 비하여 7배 작은 크기이다. 또한 0~15% 황토농도에서는 황토농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었다. 이는 황토의 작은 고체 입자들이 분생포자와 상호작용하여 agglomerate 형성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 액침배양에서 pellet 형성은 포자들 간의 상호작용, 균사체 간의 상호작용, 균사와 포자간의 상호작용, 균사와 고체입자간의 상호작용, pellet 간의 상호작용 등의 요인에 의하여 결정된다고 보고되었다(21). 황토의 성분 분석에서(Table 1) 정산지역에서 채취한 표본이 다른 지역의 표본보다 치환성 양이온양이 높게 나타났는데, 배양배지 중에서 이 황토의 작은 입자들의 음전하가

Table 1 Content analysis of loess collected from Taegu and Kyungbook area.

Soil sample	Cation exchange capacity (cmol/kg)	Exchangable cations (cmol/kg)				pH	Organic material (%)	Specific area (m ² /g)
		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁻	Na ⁺			
Jinryang	12.8	22.8	0	0	0	5.8	0.3	30.6
Kyungsan	14.2	2.8	5.1	0.3	0.5	5.8	0.3	32.3
Taegu	11.0	2.5	0	0	0	5.9	0.4	25.9

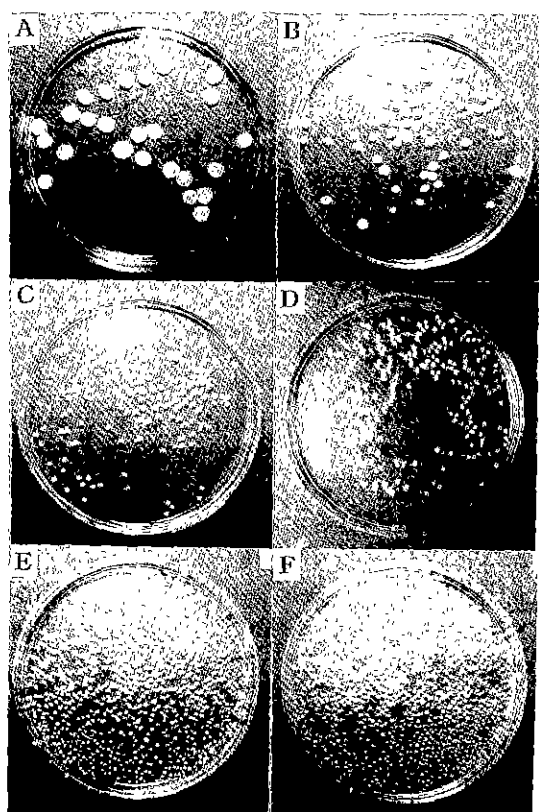


Figure 1. Photographs showing the pellet sizes of *Penicillium* sp. GL-101. The fungus was cultured at 30°C for 4 days in potato dextrose broth(PDB) supplemented with various concentrations(W/V) of loess A, control (0% loess); B, 0.05% loess, C, 0.1% loess; D, 0.2% loess; E, 0.5% loess; F, 1.0% loess.

Penicillium sp. GL-101의 분생포자들 사이의 인력을 완화하여 agglomerate가 작게 형성되도록 영향을 준 것으로 생각된다. 그러나 2.0%의 황토 첨가시에는 오히려 pellet의 크기가 증가한 것으로 나타났는데 이것은 배양매지 중의 황토의 농도가 높아지면 사상균의 균사와 황토의 상호작용에 의하여 매지의 점성이 증가함과 동시에 교반에 의한 agglomerate의 분산이 곤란해지기 때문에 생긴 현상으로 생각된다(21). 이와같은 설명은 3.0% 이상의 고농도 황토첨가시 무정형의 큰 pellet이 형성되는 결과와 동일한 해석이 가능하다.

Table 2. Average pellet sizes after 4 days culture of *Penicillium* sp. GL-101 at different concentrations of loess.

Concentration of loess (%)	Pellet diameter (mm)
0 (control)	4.9±0.5
0.1	2.2±0.3
0.2	1.3±0.2
0.5	0.8±0.1
1.0	0.6±0.1
1.5	0.4±0.1
2.0	1.8±0.3
3.0	Amorphous pellet

배양매지중 황토의 농도가 균체 성장에 미치는 영향

황토가 유리 인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PDB매지에 황토를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0%(W/V)첨가하고 분생포자를 접종한 후, 150rpm 속도로 진탕배양하여 균체 생성량을 조사하였다(Table 3). 그 결과 *Penicillium* sp. GL-101은 0~0.2% 범위의 황토첨가에서는 황토 첨가량이 증가할수록 균체 생산량이 증가하여 0.2%의 황토 첨가에서 최고의 균체생성량을 나타내었다. 이것은 배양액 중 균체의 pellet 크기가 작을수록 pellet 내부까지 산소의 공급이 용이하며 영양분 흡수율이 증가하기 때문에 0.2%의 황토 농도까지 균체 생성량이 많아진 것으로 사료된다. 그러나 0.5~1.0%의 황토농도에서는 오히려 균체 생성량이 감소하였다. 즉 황토의 농도가 높으면 균체의 성장이 방해받을 것으로 나타났다. 이는 황토의 농도가 높으면 pellet 크기는 작게 형성되어 균체 성장에 유리하지만 배양액의 점성이 증가하여 산소와 영양분 공급이 방해되는 것으로 사료된다(11) 또한 음으로 하전된 황토의 교체입자는 배양액속에 하전된 무기염류의 양을 감소시켜 균체의 성장을 억제할 수 있으며, 교체입자 자체가 균체의 성장을 억제할 수도 있다. 황토가 균체 성장을 억제하는 요인에 대한 정확한 분석은 보다 자세한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

황토의 성분별 pellet 형성에 미치는 영향

황토의 주요성분인 SiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃, CaCO₃, CaSO₄, MgCO₃의 분말을 0.001, 0.01, 0.1, 1.0%(W/V) 농도로 PDB매지에 첨가하여 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 pellet 형성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 4). 그 결과 대체적으로

Table 3. Cell mass of *Penicillium* sp. GL-101 after 4 days culture at various concentrations of loess.

Concentration of loess (%)	Dry cell mass (g/30ml)
0 (control)	0.10±0.01
0.1	0.11±0.01
0.2	0.16±0.02
0.5	0.13±0.01
1.0	0.09±0.01

Table 4. Average pellet sizes after 4 days culture of *Penicillium* sp. GL-101 at different concentrations of major components of loess.

Components of loess and their contents	Pellet diameter (mm)
Al₂O₃ (%)	
0.001	4.6±0.5
0.01	3.9±0.4
0.1	3.0±0.3
1.0	2.1±0.3
CaCO₃ (%)	
0.001	4.0±0.4
0.01	3.0±0.3
0.1	2.2±0.3
1.0	1.8±0.1
SiO₂ (%)	
0.001	3.6±0.4
0.01	3.0±0.3
0.1	2.2±0.3
1.0	1.7±0.2
Fe₂O₃ (%)	
0.001	4.2±0.4
0.01	3.9±0.4
0.1	2.9±0.3
1.0	2.1±0.3
CaSO₄ (%)	
0.001	6.0±0.5
0.01	4.8±0.5
0.1	3.0±0.3
1.0	0.8±0.1
MgCO₃ (%)	
0.001	4.2±0.4
0.01	3.0±0.3
0.1	2.1±0.3
1.0	1.4±0.2

불용성 염의 농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었으며 CaSO₄가 가장 효과적인 것으로 나타났다(Table 4). 특이한 것은 같은 calcium 염인데도 불구하고 CaCO₃보다 CaSO₄를 배지에 첨가하였을 때 *Penicillium* sp. GL-101균주가 더 작은 크기의 pellet을 형성하는 것으로 나타났다.

이상의 결과들을 종합하면 황토는 유리 인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 분생포자의 agglomerate의 형성을 억제하여 pellet의 크기를 작게 하는 효과가 있음을 규명하였다. 이와같이 황토를 미생물의 발효공학에 이용하여 그 효과를 검증한 연구는 국내외에서 아직 보고된 바가 없었다. 그러나 황토가 사상균의 발효에서 pellet 형성을 억제시키는 분명한 기작을 알기 위해서는 보다 폭넓은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

유리인산 생산균을 생물비료화 하기위한 노력의 일환으로 인산가용화능이 우수한 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양시 pellet 형성에 미치는 황토의 영향을 조사하였다. *Penicillium* sp. GL-101의 분생포자를 황토를 포함하는 PDB배지에 접종하여 50rpm의 낮은 속도로 교반하여 배양하면 무정형의 불규칙적인 pellet을 형성하는 반면에 150rpm의 높은 속도에는 구형의 규칙적인 pellet을 형성하였다. 또한 0~1.5%(W/V) 범위의 황토 첨가시에는 황토의 농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었으며, 1.5% 황토 농도에서 0.4±0.1mm의 가장 작은 pellet이 형성되었다. 이 결과는 황토를 첨가하지 않을 경우에 비하여 7배 작아진 것이다. 그러나 황토 농도가 2.0% 이상되면 pellet의 크기가 오히려 증가하였다. 또한 황토의 주성분인 불용성 염의 분말을 0~1.0% 농도로 배지에 첨가하여 pellet 형성에 미치는 영향을 조사한 결과 염의 농도가 높을수록 작은 크기의 pellet이 형성되었으며, CaSO₄를 첨가했을 때 가장 작은 크기의 pellet을 형성하였다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 생물화학공학 학술연구조성비 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Paul, E. A. and F. E. Clark (1989), *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, New York.
2. Dubey, S. K. and S. D. Billore (1992), Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) as Inoculant and Their Role in Augmenting Crop Productivity in India - A Review, *Crop Res Hisar*, 5, 11.
3. Tiwari, V. N., A. N. Pathak, and L. K. Lehri (1993), Rock Phosphate - Superphosphate in Wheat in Relation to Inoculation with Phosphate Solubilizing Organism and Organic Waste, *Ind. J. Agr. Res.*, 27, 137-145.
4. Agasmani, C. A., Mudlagiriappa, and M. N. Sreenivasa (1994), Response of Groundnut to Phosphate Solubilizing

- Microorganisms, *Groundnut News*, 6, 5.
5. Illmer, P., A. Barbato, and F. Schinner (1995), Solubilization of Hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing Microorganisms, *Soil Biol. & Biochem.*, 27, 265-270.
 6. Sayer, J. A., S. L. Raggett, and G. M. Gadd (1995), Solubilization of Insoluble Metal Compounds by Soil Fungi: Development of a Screening Method for Solubilizing Ability and Metal Tolerance, *Mycol Res.*, 99, 987-993.
 7. Illmer, P. and F. Schinner (1995), Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates-solubilization Mechanisms, *Soil Biol. & Biochem.*, 27, 257-263.
 8. Varsha, N., T. Jugnu, and H. H. Patel (1993), Solubilization of Natural Rock Phosphates and Pure Insoluble Inorganic Phosphates by *Aspergillus awamori*, *Ind. J. Exp. Biol.*, 31, 747-749
 9. Varsha, N., T. Jugnu, and H. H. Patel (1995), Mineral Phosphate Solubilization by *Aspergillus aculeatus*, *Ind. J. Exp. Biol.*, 33, 91-93.
 10. 최명철, 정종매, 사동민, 임선옥, 강선철 (1997), 토양에서 분리한 *Penicillium* sp. GL-101에 의한 난용성 인산염의 가용화, *한국농화학회지*, 40, 329-333.
 11. Byrne G. S. and O. P. Ward (1989), Effect of Nutrition on Pellet Formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 912-914.
 12. Adamek, L. (1963), Submerged Cultivation of the Fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.). *Folia Microbiologia*, 10, 255-257
 13. Inch, J. M. M. and A. P. J. Trinci (1987), Effects of Water Activity on Growth and Sporulation of *Paecilomyces farinosus* in Liquid and Solid Media. *J. Gen. Microbiol.*, 113, 247-252.
 14. Humphreys, A. M., P. Matewele, A. P. J. Trinci, and A. T. Gillespie (1989), Effects of Water Activity on Morphology, Growth and Blastospore Production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in Fed-batch Culture. *Mycol. Res.*, 92, 257-264.
 15. Kleespies, R. G. and G. Zimmermann (1992), Production of Blastospores by Three Strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in Submerged Culture. *Biocontrol Sci. and Technol.*, 2, 127-135.
 16. 류도옥 (1995), 황토의 신미, 행림출판, 서울, pp. 1-429.
 17. 한기학, 박준규, 정이근, 이춘수, 윤정희, 김원출, 이상규 (1988), 토양화학 분석법, 삼미인쇄사, pp. 1-450.
 18. Elmayergi, H. (1975), Mechanisms of Pellet Formation of *Aspergillus niger* with an Additive. *J. Ferment. Technol.*, 53, 722-729
 19. Wainwright, M. P., A. P. J. Trinci. and D. Moore (1993), Aggregation of Spores and Biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in Liquid Culture and the Effect of Anionic Polymers on This Process. *Mycol. Res.*, 97, 801-806.
 20. Jimenez-Tobon, G. A., M. J. Penninckx, and R. Lejeune (1997), The Relationship between Pellet Size and Production of Mn(II) Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in Submerged Culture, *Enzyme Microbiol. Technol.* 21, 537-542.
 21. Metz, B. and N. W. F. Kossen (1977), The Growth of Molds in the Form of Pellets; A Literature Review. *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 781-799.