

목질계 농부산물을 이용한 고체발효에서 발효조건 최적화를 통한 구연산 생산 증대

김진우[†]

맥길대학교 바이오시스템공학과, 몬트리올, 캐나다, H9X 3V9
(2014년 1월 23일 접수, 2014년 2월 24일 수정본 접수, 2014년 2월 27일 채택)

Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown on Agricultural by Products

Jin-Woo Kim[†]

Department of Biosystems Engineering, McGill University, Montreal, Canada, H9X 3V9
(Received 23 January 2014; Received in revised form 24 February 2014; accepted 27 February 2014)

요 약

본 실험에서는 농부산물인 밀짚을 고체배지로 사용하여 *Aspergillus niger* NRRL 567에서 구연산 생산 시, 발효조건과 첨가제가 구연산 생산에 미치는 영향을 단일변수(one-factor-at-a-time) 최적화를 이용하여 주요 인자의 순차적 최적화를 수행하였다. 발효 72시간에서 온도, 수분함량, 입자크기, pH와 첨가제 농도를 최적화했을 때, 각각 30 °C, 70%, 0.5~1.0 mm, pH 5.5와 4% 메탄올 첨가조건에서 최대 구연산 생산인 206.0 g/kg 건조중량 (DM)을 확인할 수 있었다. 이는 최적화 이전 구연산 최고 생산인 74.5 g/kg DM 대비 177% 증가한 결과이다. 최적화 실험에서 도출된 조건을 밀짚, 옥수수대과 피트모스(peat moss)에 적용하여 고체발효를 수행하였을 때, 발효 120시간에서 각각 231.8, 213.8, 240.2 g/kg DM 구연산 생산을 확보하였다. 본 실험 결과는 밀짚과 옥수수대 등의 목질계 농부산물을 이용한 구연산 생산 시, 고체발효법이 기존의 액체발효법의 대체가 가능함을 시사하였다.

Abstract – The present study was carried out to evaluate the potential of lignocellulosic byproducts for the production of citric acid through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* NRRL 567. A sequential optimization based on one-factor-at-a-time method was applied to optimize fermentation conditions and media constituents. The results obtained from the optimization indicated that 30 °C, 70% moisture content, 0.5~1.0 mm particle size, pH 5.5 and 4% methanol were found to be the optimum condition at 72 hr fermentation. The application the optimization resulted in an improvement of maximum citric acid production from 74.5 to 206.0 g/kg dry material (DM) from wheat straw. The optimal condition was used to produce citric acid from *A. niger* grown on different lignocellulosic byproducts, including wheat straw, corn stover and peat moss. *A. niger* produced the highest citric acid levels of 231.8, 213.8 and 240.2 g/kg DM at 120 hr fermentation, respectively.

Key words: Solid State Fermentation, Citric Acid, Rice Straw, Optimization, Agricultural by Products

1. 서 론

구연산 (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid)은 다양한 곰팡이 균에 의해 생산되며 상업규모로 생산되고 있는 대부분의 구연산은 *Aspergillus niger*를 이용하여 호기 조건하에서 액체배양을 통해 대량 생산된다[1,2]. 구연산은 식품, 의약품 그리고 화장품 등 다양한 분야에서 사용되고 있으며, 연간 1.8백만 톤 생산이 되며 70%는 식

품용으로 사용되고 있다. 특히, 최근에는 생분해성 고분자의 전구체 또는 원료로서 구연산 및 숙신산 등의 수요가 매년 5% 이상 증가하고 있어 보다 경제적이고 친환경적인 발효법을 이용한 유기산 생산에 관심이 집중되고 있다[3,4].

기존의 액체배양법 이외에 농부산물을 이용한 고체발효법은 유기산과 효소 생산에 있어 부산물 생산 최소화가 가능한 경제적인 발효 공정으로 활용분야가 확대되고 있다[5-8]. 고체발효법은 부착 성장형 미생물에 유리한 배양공정으로 미생물 성장에 필요한 탄소 및 질소원의 공급 이외에 부착표면을 제공하여 곰팡이 균과 같은 균사체 형성 미생물을 유래 산물생산에 널리 적용되고 있다. 특히 밀짚, 옥수수대, 감자 껍질, 오렌지 껍질 및 맥주 생산 부산물(spent brewers grains) 등과 같은 농/산업부산물을 기질로 사용할 수 있다는 장점과

[†]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.

함께 용수 사용량이 적고 고농도 산물생산이 가능하여 분리 및 정제 비용이 액체발효법 대비 절감된다는 장점을 지닌다[9-15].

고체발효는 잉여수분(free flowing water)가 최소화된 고체기질에서 발효가 진행되며 세포성장 및 산물생산은 고체기질의 수분함량, 온도, 산도, 입자크기, 부피팽창(swelling) 정도와 통기량에 의해 크게 영향 받는다고 알려져 있다[13-17]. 위와 같은 발효조건 영향인자 이외에 배지성분(탄소, 질소, 인, 염류 등)과 첨가제(에탄올, 메탄올, 지방산)에 의해 구연산 생산은 크게 영향을 받으므로 고체발효에서 산물 생산 증대를 위해서는 발효조건과 함께 배지성분 최적화가 필수적이라 하겠다[8,18].

본 연구의 목적은 *A. niger* NRRL 567에서 농부산물인 밀짚을 고체기질로 활용하구연산 생산 시, 발효조건 최적화를 통한 구연산 생산 증대이다. 이를 위해 기존의 구연산 생산에 유의한 영향을 준다고 알려진 영향인자인 수분함량, 온도, 입자크기, 산도와 첨가제 농도를 순차적으로 최적화를 진행하였다. 또한, 구연산 생산능 평가를 위해 밀짚, 옥수수대와 피트모스(peat moss)를 고체기질로 사용하여 고체발효에 있어 목질계 농부산물의 이용 가능성을 평가하였다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 재료

A. niger NRRL 567는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) 에서 분양받아 계대배양하여 사용하였다. *A. niger*의 포자 (spores) 생산을 위해 potato dextrose agar (Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 7일간 30 °C 정제 배양하였다. 배양 후 7일된 고체배지(plate)에서 0.1% Tween 80 (sigma, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 포자를 회수하여 희석을 통해 접종에 사용하였다.

2-2. 고체발효용 배지

고체발효 실험을 위해 McGill 대학 농장으로부터 밀짚과 옥수수대를 제공받아 당과 염류를 첨가하여 고체기질로 사용하였다. 고체기질에 첨가된 당과 염류 성분은 기존 피트모스(Schultz Company, Ontario, Canada)를 이용한 구연산 생산 최적화 실험에서 도출된 결과에 근거하였으며 첨가량은 아래와 같다(/kg DM): 967.9 g glucose, 15.4 g (NH₄)₂SO₄, 43.9 g KH₂PO₄ and 4.0 g NaCl [12,13].

2-3. 고체발효

고체배지의 수분함량이 구연산 생산에 미치는 영향을 평가하기 위해 7 g의 건조 고체기질에 각각 4.7, 7.0, 10.5, 16.5, 28, 62 ml의 액체배지를 첨가하여 수분함량을 40~90%로 조절하고 밀폐한 후, 121 °C에서 15분간 멸균하였다.

Tween 80로 회수한 1 ml의 포자 용액(1.0×10⁶ spores/ml)을 접종하여 고체발효를 수행하였다. 구연산과 글루코오스 정량을 위해 각 flask에서 고체시료를 채취하여 증류수와 혼합한 후 상등액을 filtration하여 시료로 사용하였다. 순차적 최적화를 위한 기본 발효조건은 수분함량 80%, 배양온도 26.5 °C, 고체기질 산도 4.4로 고정하였다. 고체기질에 첨가된 성분은(NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄과 NaCl이며 각 성분은 20배 농축 용액으로 제조하여 첨가하였다.

2-3. 분석방법

구연산 정량은 refractive index detector (RID)와 Aminex HPX-

87H column (7.8×300 mm, Bio-Rad, USA)이 장착된 Waters HPLC를 사용하였다. 이동상은 0.005 N 황상용액을 사용하였으며 구연산 분석을 위한 HPLC 운전조건은 아래와 같다: 0.6 ml/min flow rate; 50 °C column temperature, 20 µl sample injection.

3. 결과 및 고찰

3-1. 수분함량에 따른 영향

고체기질로 사용된 밀짚의 초기 수분함량이 구연산 생산에 미치는 영향을 평가하기 위해 초기 수분함량을 30~90%로 변화시켜 실험을 수행하였다. Fig. 1의 결과와 같이 밀짚의 초기 수분함량이 구연산 생산에 미치는 영향이 유의함을 수 있으며, 수분함량 70% 이하에서 수분함량 증가에 따라 구연산 생산이 크게 증가함을 알 수 있었다. 특히, 수분함량 50% 이하의 경우 구연산 생산이 크게 감소해 16.2 g/kg DM 이하임을 확인할 수 있었다. 한계수준 보다 낮은 수분함량은 고체기질 중의 액체를 통한 물질확산과 가스교환을 감소시켜 구연산 생산저해의 원인이 된다고 보고되고 있다[19]. 발효 72시간에서 수분함량 70% 적용 시, 74.5 g/kg DM를 확인할 수 있었다. 반면 수분함량 80% 이상에서는 구연산 농도가 감소하는 경향을 보였는데, 이는 기존의 피트모스를 이용한 고체발효의 최적 수분함량인 80% 보다 낮은 수치로 파쇄밀짚의 최대 함유량이 피트모스 보다 낮아 80% 이상에서 수분함유 한계를 넘어 잉여수분(free flowing water)이 생성되어 통기율 제한, 산소공급 저해 및 균사체 성장 저해가 발생했다고 판단된다[13].

3-2. 배양온도에 따른 영향

구연산 생산에 미치는 배양온도의 영향을 평가하기 위해 기본 발효조건에서 온도를 변화시켜(20~45 °C) 구연산 생산을 비교하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 발효온도는 구연산 생산에 유의한 효과를 주며, 발효 72시간에서 구연산 생산 최적 온도는 30 °C임을 알 수 있다. 발효온도 30 °C까지 구연산 생산은 92.8 g/kg DM로 증가하나 40 °C 이상의 발효온도에서 급격한 감소를 확인할 수 있었다. 이는

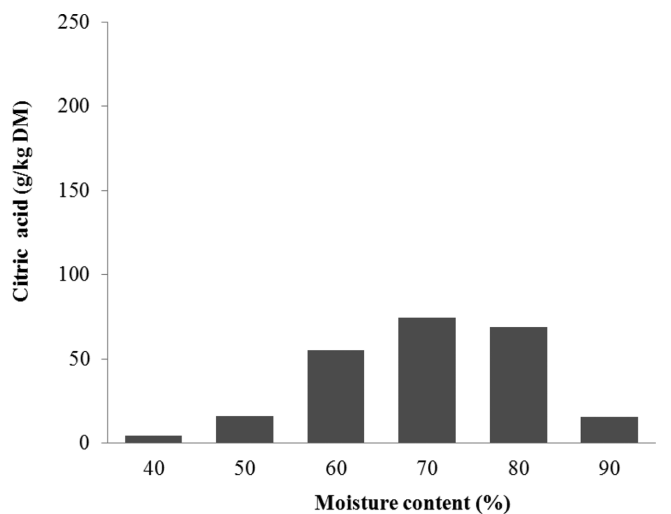


Fig. 1. Effect of the initial moisture content of solid substrate on citric acid production from wheat straw at 72 hr. The other variables were fixed at: fermentation temperature 26.5 °C, particles 0.5~1.0 mm, solid substrate pH of 4.4.

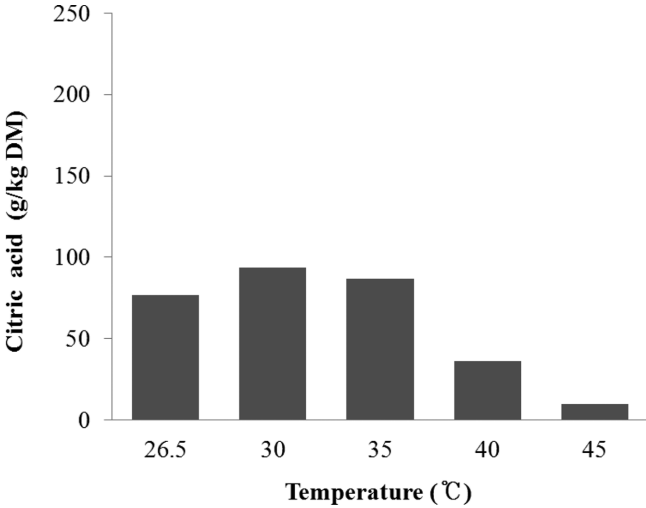


Fig. 2. Effect of fermentation temperature on citric acid production from wheat straw at 72 hr. The other variables were fixed at: fermentation temperature of 30 °C moisture content 70%, particles 0.5~1.0 mm, solid substrate pH of 4.4.

구연산 생산을 위한 TCA 회로의 관련 효소들이 고온에서 활성 저하가 발생하여 구연산 생산이 감소했다고 예상할 수 있다. 또한, 높은 온도에서 수분 증발에 의한 고체기질의 수분 감소가 급격하게 발생하여 포자생성 및 영양분 공급 제한에 의해 구연산 생산 감소가 발생했다고 판단된다[20]. 본 결과는 기준 배양조건인 26.5 °C에서 진행된 고체발효 실험 대비 구연산 생산이 약 16% 증가된 결과이다.

3-3. 입자크기에 따른 영향

고체기질 입자크기는 고체배양 중 통기율, 가스교환, 열전달, 수분 함유량, 채널링 및 미생물 고정에 영향을 주는 인자로 구연산에 영향을 미친다[12]. 파쇄밀짚의 입자크기가 구연산 생산에 미치는 영향을 평가하기 위해 입자크기 0.1~2.0 mm 범위에서 72시간 고체발효를 수행하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 밀짚 입자크기에 따라

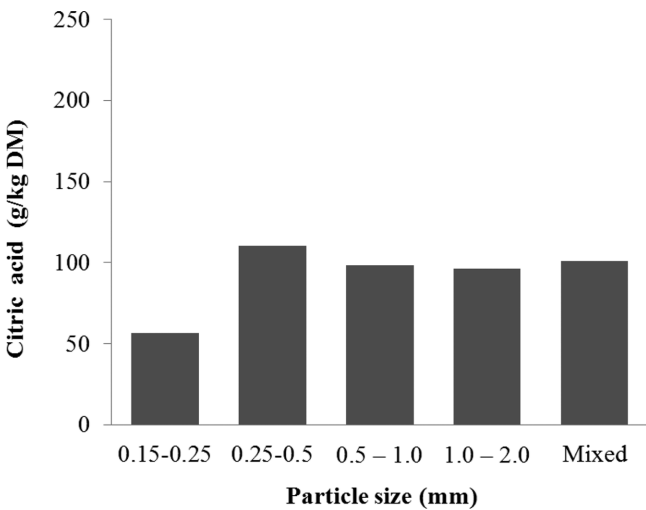


Fig. 3. Effect of the particle size of solid substrate on citric acid production from wheat straw at 72 hr. The other variables were fixed at: moisture content 70%, fermentation temperature 30 °C, solid substrate pH of 4.4.

구연산 생산은 동등 수준이나 입자크기 0.1~0.25 mm 구간에서 구연산 생산이 현저하게 감소함을 보였다. 입자크기 0.25~0.5 mm 구간에서 구연산 최대 생산농도인 106.7 g/kg SSD가 확인되었으며 입자크기가 증가함에 따라 구연산 생산이 감소함을 확인할 수 있었다. Kim[18]에 따르면 고체기질의 입자크기 감소는 입자 표면적 증가에 따른 고착표면 증가와 더불어 수분량을 증가시켜 발효 후반까지 균주의 활성을 유지하여 산물 생산 증가를 가능케 한다고 보고하고 있다. 반면 입자크기 0.2 mm 이상에서는 통기율 감소, 막힘(clogging), 표면적 감소 및 함유량 감소에 따라 구연산 생산이 감소된다고 보고되고 있다. 본 결과는 기존 피트모스를 이용한 실험에서와 같이 0.25~0.5 mm 구간에서 최대 구연산 생산을 보여주며 기준 배양조건인 0.5~1.0 mm 구간 대비 구연산 생산이 11% 증가된 결과이다.

3-4. 고체기질 산도에 따른 영향

유기산 생산을 위한 고체배양에서 고체기질의 초기 산도는 유기산 생산에 중요한 변수로 알려져 있다 [21,22]. 고체기질의 초기 산도 변화가 구연산 생산에 미치는 영향을 파악하기 위해 염류배지(salt solution)의 산도를 NaOH와 HCl을 첨가하여 조절한 후 파쇄밀짚과 혼합하여 고체기질의 산도를 변화시켰다. 발효 조건은 앞선 실험의 최대생산 조건인 발효온도 30 °C, 수분함량 70%, 입자크기 0.25~0.5 mm으로 실험을 수행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 고체기질의 산도가 5.5로 증가함에 따라 구연산 생산이 크게 증가하여 최고농도인 158.8 g/kg DM에 도달하였다. 일반적으로 정체 발효인 고체발효는 액체발효와 달리 염기투입에 의한 산도 조절이 없는 pH-stat 환경 확보가 어려워 고체발효 중 생산되는 구연산 및 기타 유기산은 고체기질 산도 증가를 진행시키며 이는 세포성장을 저해하고 구연산 생산 감소의 주요 원인이 된다 [23]. 이에, 고체기질의 초기 산도가 높을 경우, 발효 중 생산되는 유기산에 의한 산도 감소가 지연되어 구연산 생산이 증가된다고 판단할 수 있다. 실험에서 보는 바와 같이 고체기질의 초기 산도는 구연산 생산에 가장 큰 영향인자이며 최적화 이전 수준에 비해 43% 증가한 생산량을 보였다. 고체기질의 초기 산도도 중요하나 발효 중 산도변화도 구연산 생산에 중요한 영향을 준

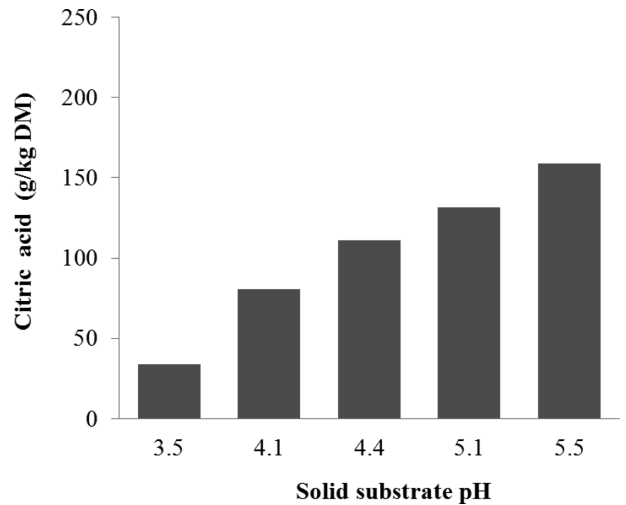


Fig. 4. Effect of the initial pH of solid substrate on citric acid production from wheat straw at 72 hr. The other variables were fixed at: moisture content 70%, fermentation temperature 30 °C, particles size 0.25~0.5 mm (Mixed particle size < 2.0 mm).

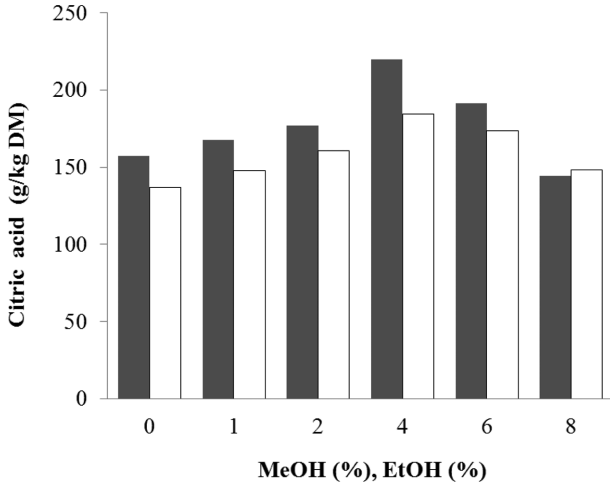


Fig. 5. Effect of additives (Methanol ■, Ethanol □) on citric acid production from wheat straw at 72 hr. The other variables were fixed at: moisture content 70%, fermentation temperature 30 °C, particles size 0.25~0.5 mm, solid substrate pH of 5.5.

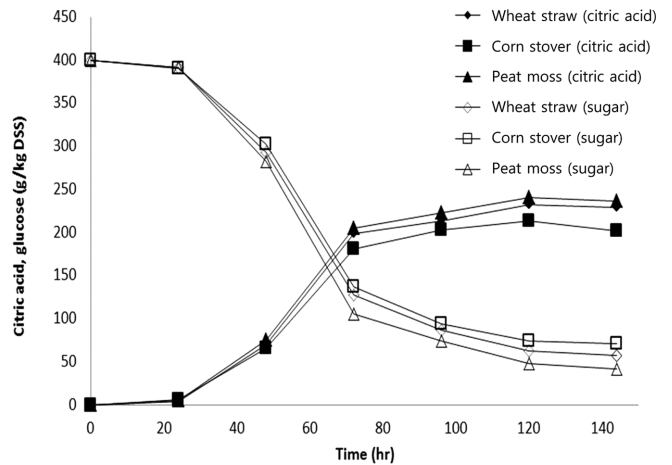


Fig. 6. Time course behavior of citric acid production and residual glucose under the optimal fermentation condition (◆: what straw-citric acid, ■: corn stover-citric acid, ▲: peat moss-citric acid, ◇: wheat straw - residual glucose, □: corn stover - residual glucose, △: peat moss-residual glucose). Moisture content 70%, fermentation temperature 30 °C, particles size 0.25~0.5 mm, solid substrate pH of 5.5, 4% methanol.

다고 판단 됨으로 향후 pH-stat 운전을 위한 고체발효장치 개발이 필수적이라 하겠다.

3-5. 첨가제에 따른 영향

구연산 생산은 methanol, ethanol, phytate, vegetable oil, oximes, n-dodecane과 fluoroacetate와 같은 첨가제에 의해 증가된다고 보고되고 있다[19,21]. 이들 중, 에탄올, 메탄올과 지방산이 구연산 생산 증가를 위한 첨가제로 가장 널리 사용되었으며 다양한 균주를 대상으로 1~8%(w/w) 첨가 시, 구연산 생산이 증대된다고 보고되고 있다. 본 실험에서는 두 가지 첨가제가 구연산에 미치는 영향을 파악하기 위해 0~10%(w/w) 에탄올과 메탄올을 각각 고체기질에 첨가하여 구연산 생산에 미치는 영향을 평가하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 각각의 농도가 4%로 증가함에 따라 구연산 농도는 비례하여 증가하며 에탄올에 비해 메탄올이 구연산 생산 증대 효과가 큼을 알 수 있다. 각각의 농도 4% 이상에서 구연산 생산은 다시 감소함을 볼 수 있는데, 이는 Roukas[19]이 보고한 carob pod를 이용한 고체발효에서 메탄올의 첨가농도와 일치하는 결과임을 확인할 수 있다. 첨가제 농도 최적화를 통해 최적화 이전 수준에 비해 27.1% 증가한 생산량을 확인할 수 있었다. 일반적으로 메탄올을 첨가는 세포의 투과도(permeability) 증가에 따른 영양성분과 산물의 투과를 용이하게 하여 구연산 생산 증대에 기여한다고 알려져 있다. 또한 메탄올은 TCA 회로 전단계 중간체인 acetyl-CoA pool을 증가시켜 구연산 생산량을 증대시킨다고 보고되고 있다. 반면, 에탄올의 경우 구연산(TCA) 회로에서 구연산 생산에 기여하는 citrate synthetase 활성을 증대시키고 aconitase의 역반응을 감소시켜 구연산 생산을 증대한다고 알려져 있다[22].

3-7. 구연산 생산 검증

본 실험에서는 *A. niger* NRRL 567을 이용한 구연산 생산증대를 위해 구연산 생산에 유의한 영향을 미친다고 알려진 발효조건 및 배지성분을 순차적으로 최적화하였다. 밀짚을 이용한 고체발효에서 단일변수 최적화를 통해 도출된 최적조건은 배양온도 30 °C, 수분함

량 70%, 고체기질 크기 0.25~0.5 mm, 산도 5.5와 4% 메탄올을 첨가로, 상기의 조건에서 72시간 발효하여 구연산 최대생산량 206.0 g/kg DM를 얻을 수 있었다. 앞선 실험에 따르면 피트모스를 이용한 고체발효에서 구연산 생산 최적조건은 배양온도 35 °C, 수분함량 80%, 고체기질 크기 0.25~0.5 mm, 산도 5.5와 1.5% 메탄올을 첨가였으며 상기의 조건에서 구연산 최대 생산량 225.0 g/kg DM을 보고하고 있다.

밀짚을 이용한 고체발효에서 결과의 재현성을 확인하기 위해 동일 균주를 이용해 상기의 최적조건에서 밀짚, 옥수수대(corn stover)와 피트모스를 대상으로 고체발효를 진행하였다. 옥수수대는 밀짚과 동일한 발효조건을 적용하여 발효를 진행하였으며, 피트모스는 기존 실험에서 도출된 최적조건에 기반하여 발효를 진행하여 그 결과를 비교하였다[12]. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 밀짚을 이용한 고체발효의 경우, 발효 72시간에서 기존 최적화 실험의 결과에 유사한 198.4 g/kg DM을 재확인하였으며 발효 120시간에서 구연산 최대값인 231.8 g/L를 얻을 수 있었다. 피트모스를 이용한 고체발효의 경우 발효 120시간에서 240.2 g/kg DM의 최대 구연산 생산농도를 보였다. 반면, 옥수수대를 이용한 고체발효에서는 피트모스와 밀짚 대비 낮은 구연산 생산농도를 보였는데, 이는 적용된 고체 발효조건 밀짚을 대상으로 도출된 것에 기인한다고 판단된다. 피트모스의 경우 섬유질 함량이 66% 이상으로 수분함량이 높은 특징을 지니므로 밀짚과 옥수수대 대비 *A. niger* 성장과 구연산 생산에 필요한 수분을 지속적으로 공급함에 구연산 생산이 높았던 것으로 해석된다[23].

4. 결 론

구연산의 활용범위 확대에 따른 생산량 증가에 따라, 기존의 액체 발효가 아닌 농부산물 활용이 가능하고 용수의 사용이 적은 고체발효법이 친환경적이고 경제적인 발효공정으로 주목을 받고 있다. 본 실험에서는 고체발효에서 널리 사용되는 목질계 농산물인 밀짚과 옥수수대를 고체기질로 사용하여 발효조건과 배지성분 최적화를 통해

구연산 생산을 효과적으로 증대시킬 수 있었다. 밀짚을 이용한 고체 발효에서 단일변수 최적화 방법을 적용하였을 때, 발효 72시간에서 최대 구연산 생산농도는 206.0 g/kg DM로 최적화 이전 수준인 74.5 g/kg DM에 비해 2.8배 증가함을 확인할 수 있었으며 구연산 생산에 유의한 효과를 주는 독립변수를 규명할 수 있었다. 향후, 단일변수 최적화에서 영향이 크다고 판단되는 변수들은 반응표면 분석법에 적용하여 조건 최적화, 변수간 상관관계 및 최대값 예측에 활용이 가능하다고 하겠다. 본 실험에서는 구연산 생산을 위해 농부산물을 이용한 고체발효에서 외부에서 공급된 당을 이용하여 고체발효를 수행하였으나, 향후 밀짚과 옥수수대와 같은 농부산물에서 lignocellulosic enzyme 생산균주(*Trichoderma reesei* 등)와 구연산 생산균주(*Aspergillus niger* 등)의 혼합배양(co-culture)을 이용하여 외부에서 글루코오스와 같은 발효당 공급이 최소화된 고체발효 시스템 개발도 가능하다 하겠다.

References

1. Haq, I., Khurshid, S., Ali, K., Ashraf, H., Qadeer, A. and Rajoka, I., "Mutation of *Aspergillus niger* for Hyper Production of Citric Acid from Black Molasses," *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**(1), 35-37(2001).
2. Betiku, E. and Adesina, O. A., "Statistical Approach to the Optimization of Citric Acid Production Using Filamentous Fungus *Aspergillus niger* Grown on Sweet Potato Starch Hydrolyzate," *Biomass Bioenerg.*, **55**, 350-354(2013).
3. Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A. and Lebeault, J. M., "Solid State Fermentation for the Synthesis of Citric Acid by *Aspergillus niger*," *Bioresour. Technol.*, **74**(2), 175-178(2000).
4. Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., 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).
5. Honda, Y., Hattori, T., Kirimura, K., Alvarez, V. F., Gonzalez, A. C. and Torres, N. V., "Visual Expression Analysis of the Responses of the Alternative Oxidase Gene (aox1) to Heat Shock, Oxidative, and Osmotic Stresses in Conidia of Citric Acid-producing *Aspergillus niger*," *J. Biosci. Bioeng.*, **113**(3), 338-342(2012).
6. 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).
7. Angumeenal, A. R. and Venkappayya, D., "An Overview of Citric Acid Production," *LWT-Food Sci. Technol.*, **50**(2), 367-370(2013).
8. Barrington, S., Kim, J. S., Wang, L. and 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).
9. 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).
10. 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).
11. Kim, J. W., "Effect of Buffers on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 in Solid Substrate Fermentation," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(5), 874-878(2012).
12. 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).
13. Barrington, S., Kim, J. S., Wang, L. and Kim, J. W., "Optimization of Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 567 Grown in a Column Bioreactor," *Korean J. Chem. Eng.*, **26**(2), 422-427(2009).
14. Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M. and Gokhale, D. V., "Production of Acidic Lipase by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation," *Process Biochem.*, **38**(5), 715-721(2002).
15. Kumar, D., Verma, R. and Bhalla, T. C., "Citric Acid Production by *Aspergillus niger* van. Tieghem MTCC 281 Using Waste Apple Pomace as a Substrate," *J. Food Sci. Technol.*, **47**(4), 458-460(2010).
16. Rezaei, P., Darzi, G. and Shafaghat, H., "Optimization of the Fermentation Conditions and Partial Characterization for Acidothermo Philic α -amylase from *Aspergillus niger* NCIM 548," *Korean J. Chem. Eng.*, **27**(3), 919-924(2010).
17. 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).
18. Roukas, T., "Citric Acid Production from Carob Pod by Solid-state Fermentation," *Enz. Microb. Tech.*, **24**(1), 54-59(1999).
19. 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).
20. Betiku, E. and Adesina, O. A., "Statistical Approach to the Optimization of Citric Acid Production Using Filamentous Fungus *Aspergillus niger* Grown on Sweet Potato Starch Hydrolyzate," *Biomass Bioenerg.*, **55**, 350-354(2013).
21. Jianlong, W. and Ping, L., "Phytate as a Stimulator of Citric Acid Production by *Aspergillus niger*," *Process Biochem.*, **33**(3), 313-316(1998).
22. 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).
23. Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M. and Tyagi, R. D., "Utilization of Different Agro-industrial Wastes for Sustainable Bioproduction of Citric Acid by *Aspergillus niger*," *Biochem. Eng. J.*, **54**(2), 83-92(2011).