

مدل تجربی کینتیک رشد آسپرژیلوس نایجر در تخمیر حالت جامد

سید عباس شجاع الساداتی

زهرة حمیدی اصفهانی

ابراهیم واشقانی فراهانی

گروه بیوتکنولوژی، بخش مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

در این تحقیق قارچ آسپرژیلوس نایجر با کد ATCC ۱۰۸۶۴ بر روی سبوس گندم در شرایط متفاوت دما و رطوبت کشت داده شد. درصد گلوکز آمین سوسترای تخمیر شده در فواصل زمانی مشخص اندازه گیری شد. در دما و رطوبتهای متفاوت عوامل رشد (حداکثر بیومس و سرعت رشد مخصوص در فاز لگاریتمی) از رابطه لجستیک بدست آمدند و با استفاده از این دادهها تأثیر دما و رطوبت اولیه سوستر بر روی رشد توسط مدل تجربی بیان شد. نتایج نشان دادند که رشد آسپرژیلوس نایجر در شرایط دمایی ۳۵ °C و رطوبت اولیه ۶۰ درصد بهینه است.

کلمات کلیدی

تخمیر حالت جامد، مدل تجربی، دما، رطوبت، آسپرژیلوس نایجر

An Empirical Model of *A. Niger* Growth in Solid State Fermentation

Z. Hamidi Esfahani

S.A. Shojaossadati

E. Vassshegani Farahani

Biotechnology Group, Chemical Engineering Department,
Faculty of Engineering, Tarbiat Modarres University

Abstract

In the present work the effect of simultaneous temperature and moisture on A. niger growth in the solid state fermentation was modeled. Experiments were designed as a two-factor design. Logistic model was used to calculate growth parameters in SSF. The results depicted that 35°C and 60% were optimum conditions respectively for cultural temperature of A. niger and wheat bran initial moisture. Two polynomial expressions were obtained to model the effect of temperature and moisture simultaneously on both μ_m and x_m of A. niger were inoculated on steamed wheat bran.

Key words

solid state fermentation (SSF), empirical model, temperature, moisture, A. niger

مقدمه

تخمیر حالت جامد مستلزم رشد میکروارگانیسمها بر روی سوبسترای جامد مرطوب در غیاب آب آزاد است. دهه گذشته شاهد تجدید حیات تخمیر حالت جامد (SSF^۱) بوده است [۱].

از مزایای این نوع تخمیر در مقایسه با تخمیر متداول غوطه وری^۲ می‌توان به استفاده از سوبسترای ساده و ارزانتر (معمولاً ضایعات کشاورزی)، حجم کمتر بیوراکتور، فرایند ساده‌تر پایین دستی و تولید فراورده‌های خاص (اسپور، سموم دفع آفات بیولوژی، آنزیمهای هیدرولیتیک، افزودنیهای غذایی و...) اشاره نمود [۱۱-۲].

بهرحال این نوع تخمیر همانند سایر روشهای تخمیر دارای محدودیتهایی است که از مهمترین آنها مشکل ثبت و کنترل عوامل تخمیر همچون دما، pH، رطوبت، بیومس است. حرارت متابولیکی ناشی از رشد میکروارگانیسمها باعث افزایش دما در محیط کشت می‌شود. فقدان آب آزاد، ضریب هدایت حرارتی کم مواد جامد و عدم کارایی روشهای متداول حذف حرارت در سیستم غوطه‌وری باعث شیب حرارتی شدید در تخمیر حالت جامد می‌شود. بنابراین در این نوع تخمیر میکروارگانیسمها در شرایط غیریکنواخت دمایی رشد می‌نمایند [۱۲، ۷، ۳]. در بعضی از بیوراکتورهای حالت جامد مانند بستر آکنده^۳ از هوادهی اجباری بمنظور خنک کردن و کاهش شیب حرارتی استفاده می‌نمایند. سانگسوراساک و میچل^۴ ادعا کردند که در این بیوراکتورها سهم خنک کردن تبخیری در حذف حرارت ۷۸٪ است. ازاینرو این نوع بیوراکتورها در معرض کاهش رطوبت به مقدار زیاد و احتمال خشک شدن سوبسترا هستند (حتی هنگامیکه از هوای اشباع استفاده شود) [۱۲].

با توجه به مطالب فوق اهمیت بررسی تأثیر همزمان دما و رطوبت محیط کشت روی رشد میکروارگانیسم برای مدلسازی و بهینه‌سازی شرایط کشت ضروری به نظر می‌رسد. در تحقیق حاضر از مدل لجستیک^۵ (رابطه ۱) برای رشد اسپرژیلوس نایجر در محیط جامد استفاده شد [۱۳].

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m x \left(1 - \frac{x}{x_m}\right) \quad (1)$$

x: وزن خشک میسیلیوم در هر گرم ماده خشک

μ_m : سرعت رشد مخصوص در فاز لگاریتمی رشد

x_m : حداکثر وزن خشک میسیلیوم در هر گرم ماده خشک

t: زمان تخمیر

مدل لجستیک بیان می‌کند که رشد میکروارگانیسم بوسیله سطح جانبی در دسترس محدود می‌شود و به حداکثر مقدار خود یعنی x_m می‌رسد که در مدل مونود این مقدار پیش بینی نشده است. همچنین در این رابطه μ مستقل از غلظت سوبستراست [۱۴].

در مقالاتی که تاکنون نوشته شده، اثرات جداگانه عوامل دما و رطوبت بر روی رشد میکروارگانیسم بررسی شده است [۱۹-۱۴] که در تعداد محدودی از آنها مدلهایی نیز ارائه شده است [۲۱-۱۹، ۱۲، ۱۱]. لیکن در هیچکدام از آنها تأثیر همزمان رطوبت و دما مطالعه نشده است. در این تحقیق طراحی آزمایش‌ها به صورت طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی انجام شده تا بتواند بیانگر رشد در شرایط دمایی و رطوبتی مختلف باشد.

۱- مواد و روشها

اسپرژیلوس نایجر^۶ با کد ATCC ۱۰۸۶۴ از کلکسیون میکروارگانیسمهای گروه بیوتکنولوژی دانشکده فنی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. اسپورها بر روی محیط PDA کشت داده شدند و به مدت ۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و اسلنهای حاوی اسپور در یخچال تا زمان استفاده قرار گرفتند.

آزمایشها بر روی سبوس گندم آسیاب شده انجام شد. ۵ گرم از سبوس گندم در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری با مقدار مشخصی آب و اسیدکلریدریک بر اساس میزان رطوبت مورد نظر (به منظور حصول pH نهایی ۴/۵) (محیطی مناسب برای رشد قارچ

آسپرزیلوس نایجر) مخلوط شد. نمونه‌ها بمدت یکساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتو کلاو شدند تا علاوه بر استریل شدن، هیدرولیز شده و براحتی توسط میکروارگانسیم مصرف شوند. پس از آن نمونه‌ها با یک میلی لیتر سوسپانسیون اسپور حاوی 10^7 اسپور تلقیح شده و در انکوباتور قرار گرفتند. در این تحقیق از پنج سطح رطوبت (w/w) ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰ و ۶۵ درصد و چهار سطح دمایی ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. برای هر دما و رطوبت ۱۲ نمونه در انکوباتور قرار می‌گرفت، بطوریکه در فواصل زمانی مختلف ۲ نمونه مشابه (از نظر رطوبت و دما) از انکوباتور خارج شد. سپس هر نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد بمدت ۶ ساعت (تا رسیدن به وزن ثابت) خشک شد. سپس گلوکز آمین و رطوبت نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

۱-۱- اندازه‌گیری جرم سلولی

جرم سلولی بروش غیرمستقیم اندازه‌گیری گلوکز آمین بدست آمد [۲۲]. در این روش بمنظور هیدرولیز نشاسته و جلوگیری از مزاحمت آن در مرحله رنگ‌سنجی ابتدا ۰/۵ گرم نمونه با ۲۵ml اسید سولفوریک ۱۰M مخلوط شد و پس از بهمزدن بمدت ۰/۵ ساعت نمونه در ۸۰۰۰ rpm بمدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی دکانته شد و جامدات با آب شسته شدند. به منظور هضم کیتین قارچ و تبدیل آن به ان - استیل گلوکز آمین^۷، نمونه شسته شده با ۵ ml اسید کلریدریک ۱۰M مخلوط شد و پس از ۱۶ ساعت قرار گرفتن در محیط آزمایشگاه با ۲۰ ml آب مقطر مخلوط و در دمای ۱۳۰°C بمدت ۲ ساعت قرار گرفت (درهای ظروف کاملاً بسته بودند). ماده هیدرولیز شده ابتدا با سود ۱۰M و سپس با سود ۰/۵M تا pH=6 خنثی شد و برای جداسازی محلول از مواد جامد از سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ rpm بمدت ۷ دقیقه استفاده شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی برای ارزیابی گلوکز آمین بروش رنگ‌سنجی استفاده شد و مراحل بعدی آماده‌سازی نمونه برای رنگ‌سنجی بروش راید و دریسیدیل^۸ [۲۳] انجام شد. منحنی کالیبراسیون برای غلظتهای ۵۰، ۳۰، ۲۰ و ۱۰ گلوکز آمین خالص رسم شد. جذب نمونه‌ها و استانداردها در ۶۲۰ nm (نمونه استاندارد در طول موجهای مختلف اسکن شد و در این طول موج بالاترین جذب را نشان داد) بوسیله اسپکتروفتومتر Cray UV-Visible خوانده شد و سپس مقدار گلوکز آمین نمونه‌ها با استفاده از منحنی کالیبراسیون بدست آمد.

نیشیو و همکارانش^۹ (۱۹۷۹) [۱۷] در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که نسبت ثابتی بین میزان گلوکز آمین و جرم سلولی آسپرزیلوس نایجر کشت داده شده بر روی سبوس گندم وجود دارد. چنانچه هر گرم سلول حاوی ۵۰mg گلوکز آمین است. لذا با داشتن این نسبت و همچنین کم کردن گلوکز آمین سبوس گندم از مقادیر بدست آمده (با فرض اینکه گلوکز آمین سوبسترا در فرایند رشد میکروارگانسیم دخالت نمی‌کند [۱۷])، جرم سلولی میکروارگانسیم در شرایط مختلف کشت بدست آمد.

۱-۲- اندازه‌گیری درصد رطوبت محیط کشت

به روش گراویمتری درصد رطوبت نمونه اندازه‌گیری شد. بطوریکه نمونه‌ها در ۱۰۰ درجه سانتیگراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند.

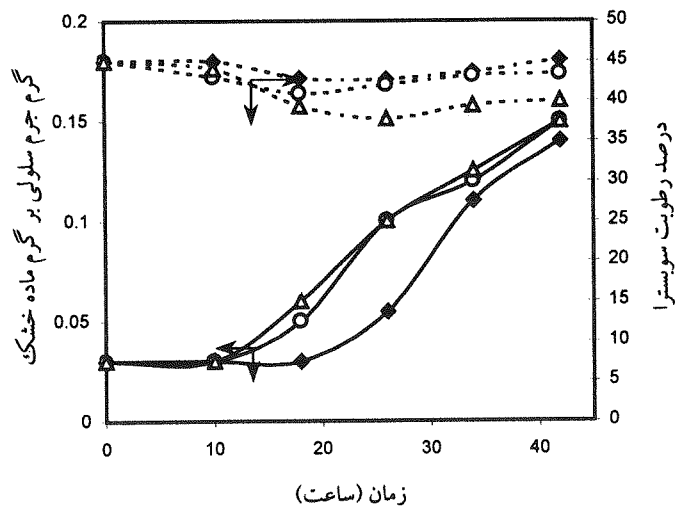
۱-۳- اندازه‌گیری pH سوبسترای جامد

یک گرم از نمونه با ۱۰ میلی لیتر آب بصورت یک مخلوط هموزن درآمد و سپس pH نمونه‌ها با pH متر دیجیتالی اندازه‌گیری شد [۱۸].

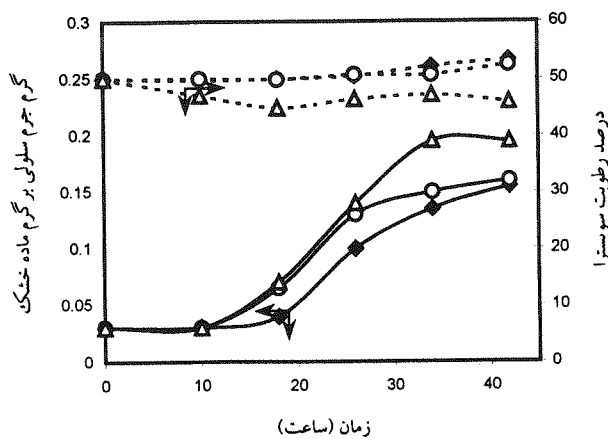
۲- بحث و نتیجه‌گیری

۲-۱- الگوی رشد در رطوبت اولیه ثابت

اشکال ۱ تا ۵ نحوه تغییرات جرم سلولی و میزان رطوبت سوبسترا را در حین رشد *آسپرژیلوس نایجر* بر روی سبوس گندم هیدرولیز شده بروش حرارتی مرطوب را در دماهای ۳۰، ۳۵ و ۴۰°C و در رطوبت ثابت نشان می‌دهند. همانگونه که مشاهده می‌شود در کلیه نمودارها (با شرایط رطوبت اولیه متفاوت) در دمای ۴۰°C کاهش رطوبت سوبسترا نسبت به دماهای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد محسوستر است. لیکن در رطوبت‌های اولیه کمتر از ۵۵ درصد، علیرغم افزایش رطوبت متابولیکی سلولی، رطوبت سوبسترا کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد و در رطوبت‌های اولیه بیشتر از ۵۵ درصد، رطوبت سوبسترا نسبت به رطوبت اولیه افزایش یافته است. احتمالاً علت آن را می‌توان بالا بودن سطح در دسترس در رطوبت‌های کم دانست چنانچه تبخیر با سرعت بیشتری در شرایط رطوبت کم انجام می‌شود. از طرفی دیگر در کلیه نمودارها مشاهده می‌شود که در شرایط دمایی ۳۰ و ۳۵°C رطوبت سوبسترا در حین رشد افزایش می‌یابد که علت آن بالا بودن سرعت تولید رطوبت متابولیکی نسبت به تبخیر از سطح سوبسترا است.



شکل (۱) تأثیر دما بر مقدار رطوبت سوبسترا و جرم سلول در هنگام رشد *آسپرژیلوس نایجر* بر روی سبوس گندم با رطوبت اولیه ۴۵ درصد در دماهای ۳۰°C (◆)، ۳۵°C (○)، ۴۰°C (Δ)

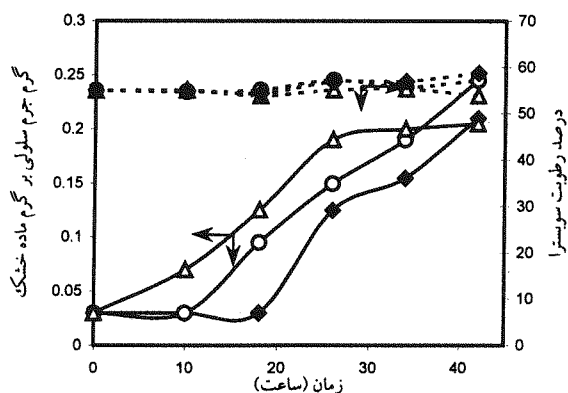


شکل (۲) تأثیر دما بر مقدار رطوبت سوبسترا و جرم سلول در هنگام رشد *آسپرژیلوس نایجر* بر روی سبوس گندم با رطوبت اولیه ۵۰ درصد در دماهای ۳۰°C (◆)، ۳۵°C (○)، ۴۰°C (Δ)

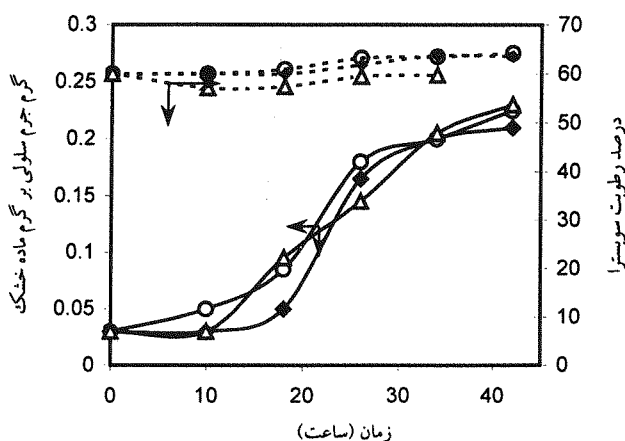
رشد میکروارگانیسم در دمای ۳۰°C در شرایط رطوبتی مختلف کمتر از رشد میکروارگانیسم در دماهای ۴۰°C و ۳۵°C می‌باشد. لیکن رشد میکروارگانیسم در دماهای ۳۵°C و ۴۰°C به میزان رطوبت اولیه و تغییر محتوی رطوبتی در طول تخمیر بستگی دارد. شایان ذکر است که در دمای ۴۵°C تا ۴۲ ساعت (مدت زمان نمونه‌برداری) آسپرژیلوس نایجر رشد محسوسی نداشت.

۲-۲- الگوی رشد در دمای ثابت

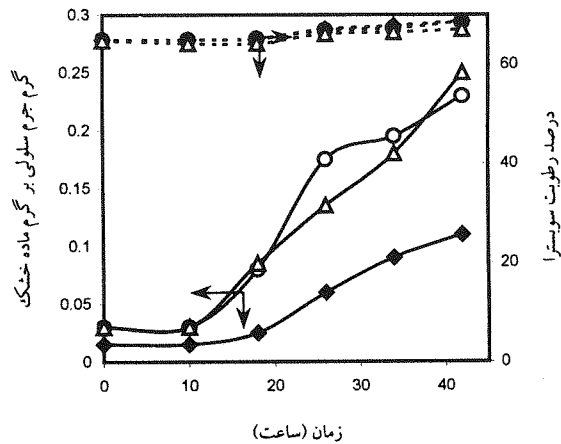
اشکال ۶ تا ۸ نحوه تغییرات جرم سلولی را در مدت رشد آسپرژیلوس نایجر بر روی سیوس گندم با رطوبتهای اولیه مختلف ۶۵، ۶۰، ۵۵، ۵۰ و ۴۵ درصد را نشان می‌دهند. چنانچه مشاهده می‌شود در دماهای مختلف کشت، با افزایش رطوبت اولیه سوبسترا از ۴۵ درصد تا حدی مشخص، رشد میکروارگانیسم افزایش می‌یابد. ولی با افزایش بیشتر رطوبت اولیه سوبسترا، رشد کاهش می‌یابد. حد نهایی رطوبت اولیه مطلوب برای رشد میکروارگانیسم به دمای محیط کشت بستگی دارد که ناشی از تأثیر متقابل رطوبت و دما در رشد میکروارگانیسم می‌باشد. کاهش رشد در سطوح رطوبتی بالای سوبسترا بدلیل کاهش خلل و فرج سوبسترا و بدنبال آن کاهش نفوذ اکسیژن در سوبسترا می‌باشد [۱۸].



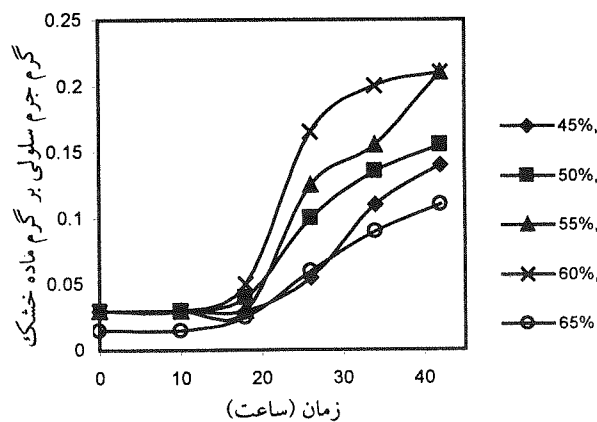
شکل (۳) تأثیر دما بر مقدار رطوبت سوبسترا و جرم سلول در هنگام رشد آسپرژیلوس نایجر بر روی سیوس گندم با رطوبت اولیه ۵۰ درصد در دماهای ۳۰°C (◆)، ۳۵°C (○)، ۴۰°C (Δ).



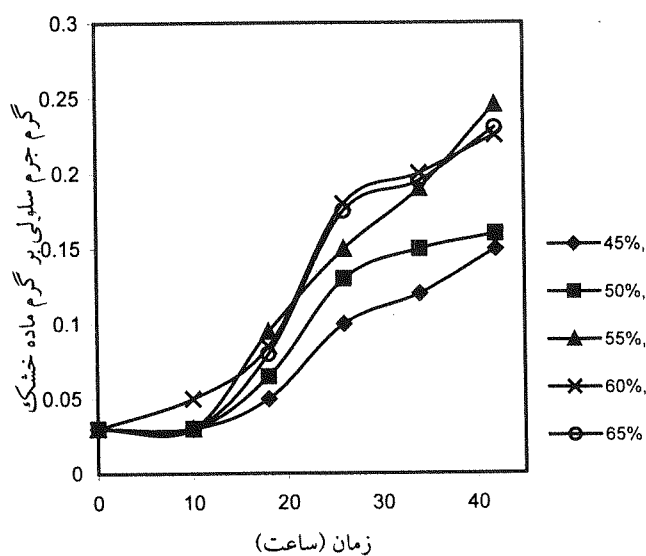
شکل (۴) تأثیر دما بر مقدار رطوبت سوبسترا و جرم سلول در هنگام رشد آسپرژیلوس نایجر بر روی سیوس گندم با رطوبت اولیه ۶۰ درصد در دماهای ۳۰°C (◆)، ۳۵°C (○)، ۴۰°C (Δ).



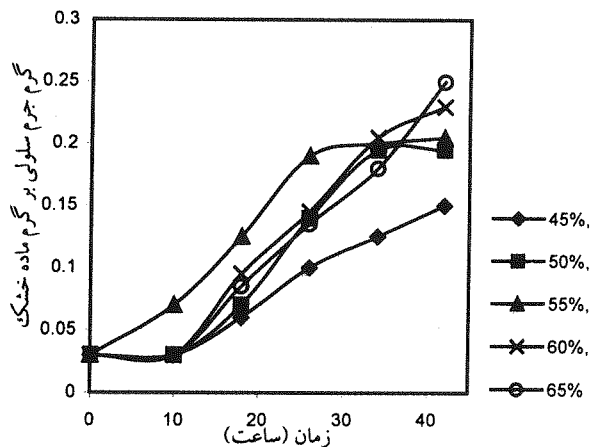
شکل (۵) تأثیر دما بر مقدار رطوبت سوبسترا و جرم سلول در هنگام رشد آسپرژیلوس نایجر بر روی سیوس گندم با رطوبت اولیه ۶۵ درصد در دماهای 40°C (Δ)، 35°C (\square)، 30°C (\diamond).



شکل (۶) تأثیر رطوبت اولیه سوبسترا بر روی رشد آسپرژیلوس نایجر در دمای 30°C .



شکل (۷) تأثیر رطوبت اولیه سوبسترا بر روی رشد آسپرژیلوس نایجر در دمای 35°C .



شکل (۸) تأثیر رطوبت اولیه سوبسترا بر روی رشد آسپرژیلوس نایجر در دمای ۴۰°C.

۲-۳- مدل تجربی رشد

بمنظور محاسبات وبدست آوردن مدل از نرم افزار SPSS تحت ویندوز نسخه ۹/۰۵ استفاده شد. ابتدا رابطه لجستیک به صورت زیر ساده شد.

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \mu_m x \left(1 - \frac{x}{x_m}\right) \\ \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \cong \frac{\Delta \ln x}{\Delta x} \end{cases} \Rightarrow \frac{\Delta \ln x}{\Delta x} = \mu_m x \left(1 - \frac{x}{x_m}\right) \quad (2)$$

رابطه خطی (۲) از رابطه غیرخطی (۱) بدست آمده است. به منظور بدست آوردن $\frac{\Delta \ln x}{\Delta x}$ از روابط دیفرانسیل مطابق روابط (۳) استفاده شد. در رابطه (۲)، μ_m عرض از مبدا و $\frac{-\mu_m}{x_m}$ شیب نمودار، برحسب x است در شرایط رطوبتی و دمایی مختلف μ_m و x_m بدست آمد.

$$\begin{cases} \frac{\Delta \ln x}{\Delta t} = \frac{\ln(x_{n+1}) - \ln(x_n)}{t_{n+1} - t_n} & \text{زمان صفر} \\ \frac{\Delta \ln x}{\Delta t} = \frac{\ln(x_n) - \ln(x_{n-1})}{t_n - t_{n-1}} & \text{زمان نهایی تخمیر} \\ \frac{\Delta \ln x}{\Delta t} = \frac{1}{2} \left[\frac{\ln(x_{n+1}) - \ln(x_n)}{t_{n+1} - t_n} + \frac{\ln(x_n) - \ln(x_{n-1})}{t_n - t_{n-1}} \right] & \text{سایر زمانیها} \end{cases} \quad (3)$$

با الهام از روابط تجربی ارائه شده [۴ و ۲۰] بمنظور بیان ارتباط بین دما و پارامترهای کینتیک بنظر می‌رسید شاید بتوان از چند جمله ایها نیز برای بیان ارتباط همزمان دما و رطوبت بهره گرفت. از اینرو چند جمله ایها با درجات مختلف آزمون

شدند و در نهایت چند جمله‌ایهای زیر بهترین برازندگی را برای μ_m و X_m نشان دادند. برازندگی این مدلها در اشکال ۹ و ۱۰ بوضوح مشاهده می‌شود. از این مدلها می‌توان در طراحی بیوراكتورها استفاده کرد.

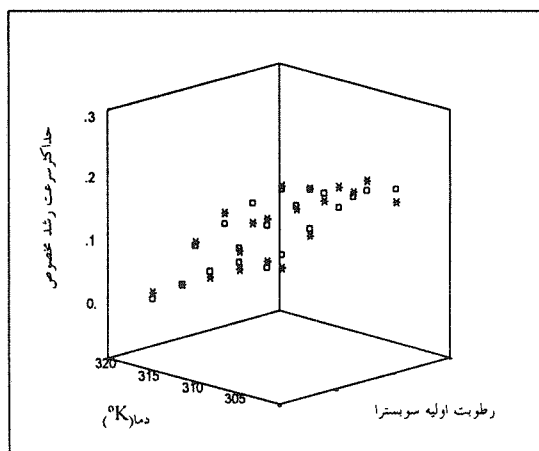
$$X_m = -1.185M^3 + 94.244TM^2 - 0.91818T^2M^2 + 0.002981717T^3M^2 - 3.22730 \times 10^{-6}T^4M^2 \quad (4)$$

$$\mu_m = -3.279M^9 + 47.595TM^2 - 0.463T^2M^2 + 0.001501437T^3M^2 - 1.62293 \times 10^{-6}T^4M^2$$

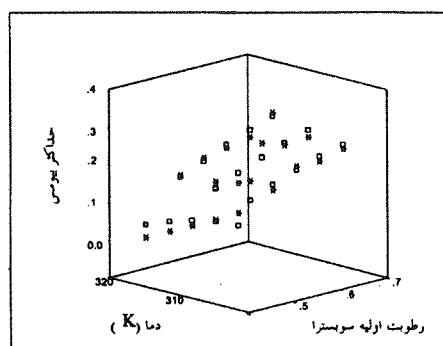
M : درصد رطوبت سوبسترا

T : دما برحسب کلوین

با توجه به مقادیر μ_m و X_m در شرایط مختلف دما و رطوبت اولیه سوبسترا، دما و رطوبت بهینه برای کشت *آسپرژیلوس نایجر* بر روی سبوس گندم به ترتیب برابر 35°C و ۶۰ درصد است. شکل‌های ۹، ۱۰ و ۱۱ نیز مؤید این نتیجه می‌باشد.



شکل (۹) حداکثر سرعت رشد مخصوص (μ_m) در شرایط مختلف: □ داده‌های تجربی، * داده‌های حاصله از مدل.



شکل ۱۰ - حداکثر بیومس (X_m) در شرایط مختلف: □ داده‌های تجربی، * داده‌های حاصله از مدل.

شکل (۱۰) حداکثر بیومس (X_m) در شرایط مختلف: □ داده‌های تجربی، * داده‌های حاصله از مدل.

1-Solid state fermentation
2-Submerged
3-Packed bed bioreactor
4--Sangsurasak and Mitchel
5-Logistic

6-*Aspergillus niger*
7-N-acetyl glucoseamine
8- Ride and Drysdale
9- Nishio et al.

مراجع

- [1] M. Moo-Young, A.R. Moreira, R.P. Tengerdy, Principles of solid substrate fermentation, In: J.E. Smith, D.R. Berry, B. Kristiansen, (Eds.), Filamentous Fungi. Edward Arnold, London (1983).
- [2] R.M. Burke and J.W.G. Cairney, Carbohydrase production by the ericioid mycorrhizal fungus *hymenoscyphus ericae* under solid-state fermentation conditions, Mycol. Res., Vol. 101, 1135-1139 (1997).
- [3] C. Creuly, C. Larroche, and J. B. Gros, Bioconversion of fatty acids into methyl ketones by spores of *penicillium roqueforti* in a water – organic solvent two – phase system, Enzyme Microb. Technol., Vol. 14, 669-678 (1992).
- [4] H.W. Doelle, D.A. Mitchell and C.E. Rolz, Solid Substrate Cultivation, Elsevier Applied Science, England, (1992).
- [5] C.W. Hesseltine, Biotechnology report. solid-state fermentation, Biotechnol. Bioeng., Vol.14, 517-532 (1972).
- [6] L. Ikasari, and D. A. Mitchell, Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid – state fermentation Enzyme microb, Technol., Vol. 19, 171-175(1996).
- [7] V. K. Joshi and D. K. Sandhu, Preparation and evaluation of an animal feed by - product produced by solid-state fermentation of apple pomace, Bioresource Technol, Vol. 56, 251-255 (1996).
- [8] J.H., Kim, M. Hosobuchi, M. Kishimoto, T. Seki, T. Yoshida, H. Taguchi and D.D.Y. Rya, Cellulase production by solid-state culture system. Biotechnol. Bioeng., Vol. 27, 1445-1450 (1985).
- [9] L. P., Ooijkaas, J. Tramper and R. M. Buitelaar, Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid – state fermentation, Enzyme Microb. Technol., Vol. 22, 480-486 (1998).
- [10] W.F.M. Röling, F.P. Schuutmans, K.H. Tiomtius, A.H. Stouthamer and H.W.V. Vereseveld, Influence of prebrining treatments on microbial changes during the baceman stage in Indonesian kacang (soy sauce) production, J. Ferment. Bioeng. Vol.77, 400-406 (1994).
- [11] D.M. Stuart, D. A. Mitchell and J. D. Litster, Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: operating variables affect performance through their effects on transport phenomena, Biotechnol Bioeng., Vol. 63, 383-391 (1999).
- [12] P. Sangsurasak and D. A., Mitchell, Validation of a model describing two-dimensional dynamic heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors, Biotechnol Bioeng., Vol. 60, 739-749 (1998).
- [13] N. Okazaki, S. Sugama and T. Tanaka, Mathematical model of surface culture of koji mold, J. Ferment. Technol., Vol. 58, 471-476 (1980).
- [14] G. Saucedo-Castaneda, M. Gutierrez-Rojas, G. Bacquet, M. Raimbault and G. Viniegra-Gonzalez, Heat transfer simulation in solid substrate fermentation, Biotechnol Bioeng., Vol. 35, 802-808 (1990).
- [15] L. Ikasari, D.A. Mitchell and D. M. stuart, Response of *Rhizopus oligosporus* to temporal temperature profiles in a model solid – state fermentation system, Biotechnol. Bioeng., Vol. 64, 722-728 (1999).
- [16] H. Narahara, Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Ueda and H. Taguchi, Growth and enzyme production in a solid – state culture of *Aspergillus oryzae*, J. Ferment. Technol., Vol. 60, 311-319 (1982).
- [17] N. Nishio, K. Tai and S., Nagai, Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation, European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 8, 263-270 (1979).
- [18] M. Raimbault and D. Alazard, Culture Method to study fungal growth in solid fermentation, European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 9, 1999-209 (1990).
- [19] J. Sargantanis, N.M. Karim, V. G. Murphy, D. Ryoo, and R. P. Tengerdy, Effect of operation conditions on solid substrate fermentation, Biotechnol Bioeng., Vol. 42, 149-158 (1993).
- [20] S. Rajagopalan and J.M. Modak, Heat and mass transfer simulation studies for solid state fermentation processes, Chem. Eng. Sci., Vol. 49, 2187-2193 (1994).
- [21] P. Sangsurasak and D. A. Mitchell, Incorporation of death kinetics into a 2-dimensional dynamic heat transfer model for solid-state fermentation, J Chem Technol. Biotechnol., Vol. 64, 253-260 (1995).
- [22] C. Desgranges, C. Vergoignan, M. Georges and A. Durand, Biomass estimation in solid-state fermentation. Appl. Microb. Biotechnol., Vol. 35, 200-205 (1991).
- [23] J. P. Ride and R. B. Drysdale, A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiological Plant Pathology, Vol. 2, 7-15 (1972).