

## 주정박을 이용한 고체발효 조건의 최적화

† 최 기 욱 · 문 세 권 · 김 을 · 장 병 욱 · <sup>1</sup>김 영 란 · <sup>1</sup>정 봉 우  
(주)창해에탄올 창해연구소, <sup>1</sup>전북대학교 화학공학부  
(접수 : 2008. 4. 10., 게재승인 : 2008. 7. 15.)

## Optimization of Solid-State Fermentation Condition Using Distiller's Dried Grain

Gi-Wook Choi<sup>†</sup>, Se-Kwon Moon, Yule Kim, Byung-Wook Jang, Young-Ran Kim<sup>1</sup>, and Bong-Woo Chung<sup>1</sup>  
Changhae Institute of Cassava & Ethanol Research, Changhae Ethanol Co., Ltd.

829, 3-Ga Palbok-dong, Dukjin-ku, Jeonju, 561-203, Korea

<sup>1</sup>Chonbuk National University, School of Chemical Engineering, 664-14, Dukjin-dong, Dukjin-gu, Jeonju, 561-756, Korea  
(Received : 2008. 4. 10., Accepted : 2008. 7. 15.)

To enhance the value as a feedstuff of distiller's dried grain (DDG) and develop fermented feedstuff, we investigated the effects of the culture conditions affecting glucoamylase activity, such as pH in submerged culture and moisture content in solid-state culture. Also, we investigated the optimal mixing ratio of DDG and wheat bran for the production of fermented feedstuff containing high content of amino acids. In culture conditions for high fermented activity, pH and moisture were optimum at pH 4 and 60%, respectively. In the case of mixing ratio, the glucoamylase activity was decreased with increase of DDG content. On the other hand, the content of crude protein was increased slowly. For the development of fermented feedstuff, the optimal mixing ratio of DDG and wheat bran was 1 to 4. Finally, we could produce approximately 1 ton (dry matter) of trial product in incubator of pilot-scale. The glucoamylase activity and the crude protein content were 1,024 U/g and 33.6%, respectively.

**Key Words** : distiller's dried grain, fermented feedstuff, glucoamylase

### 서 론

주정박은 최근 가공기술의 발전으로 아미노산이 건조 후에도 다량 함유되어 있어서 DDG (distiller's dried grain)나 DDGS (distiller's dried grain with soluble) 형태로 사료업자에게 공급되고 있으며, 반추 동물뿐만 아니라, 단위 (單胃) 동물에서도 사용이 증가하고 있다(1-2). 주정박의 주요 성분은 조지방질, 조단백질, 섬유질, 발효 효모 균체, 그리고 각종 미네랄이 함유되어 있어 사료로서 이용성이 증대되고 있고 또한 가치 이용성 증대를 위해 많은 연구들이 보고되고 있다(3-4). 미국의 경우 주정박 생산량은 연간 700만 ton 가량이고, 건조 기술의 발달로 라이신이 주정박에 5% 이상이 함유되어 있어 86% 정도를 자국에서

소비하고 14%를 수출하고 있다. 또한 전 세계적으로 바이오에탄올 생산량 증대 계획으로 사료 원료인 곡물의 가격은 급상승하고 있어 부산물인 주정박 가치는 급상승할 것으로 예상되고 있다(1,4). 국내의 경우 국내 에탄올 산업의 특성상 다양한 원료 (현미, 쌀보리, 고구마, 타피오카 등) 사용으로 인하여, 사용 원료에 따라 성분이 일정하지 못하여 사료 업계에 큰 관심을 받지 못하고 있지만 주정박의 이용에 관한 연구가 보고되고 있다(5). 현재 약 5만 ton 정도의 옥수수 주정박이 배합 사료 원료로 수입되어 젖소, 육우, 돼지 그리고 가금류의 사료로 다양하게 사용되고 있으며, 옥수수 주정박의 경우 옥수수와 동등한 가치를 지닌 것으로 평가되고 있다(6).

발효 사료는 배합사료의 판매 규모 감소에도 불구하고 꾸준히 증가하고 있으며, 동물의 사료 이용성 증대 및 소화 개선, 흡수율 증대 등의 연구들이 보고되고 있다(7-11). 사료의 원료로 사용되는 곡류는 전분 이외에도 수용성 섬유소 등의 성분이 다량 함유되어 있으나, 이들의 소화 흡수율은 단위 동물에서 매우 낮은 실정이며 이와 같은 사료 원료의 이용성 저하를 최소화하고, 가축의 대사증진을 촉진하기 위하여 정제

† Corresponding Author : Changhae Institute of Cassava & Ethanol Research, Changhae Ethanol Co., Ltd., 829, 3-Ga Palbok-dong, Dukjin-ku, Jeonju, 561-203, Korea.  
Tel : +82-63-214-7800, Fax : +82-63-214-7805  
E-mail : changrd@chethanol.com

복합 효소제 첨가에 관한 연구도 진행되고 있다(10-15).

국내 효소 사료 시장은 수입 정제 효소를 혼합한 사료와 밀기울 등 곡류 가공 부산물에 *Aspergillus*속 균주를 배양한 발효 사료로 구분되어 있으며 생산되는 제품은 전분을 당화시키는 glucoamylase와 섬유질 섭취를 돕는 cellulase 및 xylanase 등이 주요 효소성분이다. 식물성 단백질 공급원 및 사료의 이용률 증가를 위해서 주정박 및 발효 사료의 이용이 꾸준히 증가하고 있으며, *Aspergillus*속 균주의 몇몇 종들은 다량의 단백질을 분비하는 능력, 효소의 대량생산에 적합한 발효 특성, 식품 및 사료 사용의 안전성 등의 이유로 발효사료 생산에 많이 이용되고 있다(16-18).

현재 주정박은 단순히 사료 원료의 대체 원료로 국한되어 인식되어 있는데, 발효 부산물로서의 우수성에 관한 연구가 필요하며 전 세계적으로 바이오에탄올 생산량 증가로 부산물인 주정박의 생산량도 증가 할 것으로 보여 보다 체계적인 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 에탄올 생산 부산물인 주정박 가치를 극대화 시키고, 수입에 의존하고 있는 사료 시장에서 보다 경쟁력 있는 효소활성 (glucoamylase activity)과 아미노산 함량이 높은 발효 사료 개발을 위하여 효소 생성능이 우수한 균주를 선별하고 균주의 배양 조건과 주정박과 밀기울의 최적 혼합비 등을 최적화하여 상업적 생산의 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 균주는 glucoamylase 생성능이 좋은 *Aspergillus*속 곰팡이 중 *Aspergillus usarii* mut. *shiro-usarii* (KCTC 6954)를 생물자원센터 유전자은행에서 분양받아 사용하였다. 균주 배양용 평판 배지 및 포자 생성용 사면배지는 PDA (potato dextrose agar)배지를 사용하여 30℃에서 7일간 배양하였으며 균주 활성 유지를 위하여 2주 간격으로 계대 배양하여 4℃에서 보관하여 사용하였다.

액체배양용 포자 현탁액은 PDA배지 100 mL를 함유한 500 mL 플라스크에 포자를 접종하여 30℃에서 7 일간 증식한 포자를 멸균 증류수 50 mL로 현탁하여 제조하였으며 접종원으로 포자 현탁액 0.2% ( $5 \times 10^5$  spore/mL)를 사용하였다.

액체배양은 밀기울 (CJ Cheiljedang Co.) 100 g/L의 배지 100 mL를 함유한 500 mL의 플라스크에 포자현탁액을 접종한 후 진탕배양기에서 32℃ 60 rpm으로 44시간 배양하였고, 고체 배양은 밀기울 또는 밀기울과 DDG (Changhae Ethanol Co., Ltd.)를 혼합한 배지 100 g을 함유한 1 L 플라스크에 액체배양액을 2:1의 비율로 혼합하여 32℃에서 65시간 배양하였다.

효소활성 측정

발효가 완료된 고체 배지를 50℃ 이하에서 24시간 동안 건조시킨 후 5 g을 칭량하여 증류수 50 mL를 첨가한 후 진탕 교반기에서 120 rpm으로 60분간 침출하였다. 이 침출액을 여과지 (Advantac No.1)로 여과하여 고형물을 제거하고 여과액을 적정 비율로 희석하여 조효소액으로 사용하였다.

Glucoamylase 효소 활성 측정은 기질용액 (1.25% soluble starch in 40 mM acetate buffer, pH 5) 80 mL을 60℃에서 10분간

예열하고 조효소액 10 mL를 첨가하여 60분간 반응 시킨 후 0.5 N NaOH 10 mL를 가하여 효소 반응을 정지시켜 효소반응에 의하여 생성된 환원당의 양을 Somogyi법(19)으로 측정하여 효소활성을 측정하였다. Glucoamylase 1 Unit(U)은 60분에 환원당으로서 1 g의 glucose을 생성하는데 필요한 효소 양으로 정의하였다.

성분 분석

사료의 일반성분은 AOAC법(20)에 의하여 정량하였고, 수분 함량은 105℃ 상압가열건조법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl 법으로 측정하였다. 아미노산은 ninhydrin법(21)을 이용한 amino acid auto analyzer (Amino acid analyzer S-433, Sykam co., Germany)를 사용하여 분석하였다.

발효 사료 제조

발효 사료를 생산하기 위해서 500 L의 밀기울 액체배지를 함유한 4-KL Fermenter (Changhae ENG Ltd.)에서 액체배양을 하여 얻어진 배양액과 10-KL 처리 용량의 살균기 (Changhae ENG Ltd.)에서 살균된 밀기울과 DDG 혼합 배지 (1 ton; dry matter)를 혼합한 후 2.5 m×15 m×4.5 m (W×L×H) 규모의 배양실에서 32℃로 수분을 공급하면서 65 시간 배양하였다. 배양이 완료되면 50℃ 미만에서 24시간 동안 건조하여 분쇄 후 발효사료를 생산하였다. 발효 사료 생산의 공정은 Fig. 1과 같으며 최종 생산된 제품의 효소활성 및 조단백질을 분석하였다.

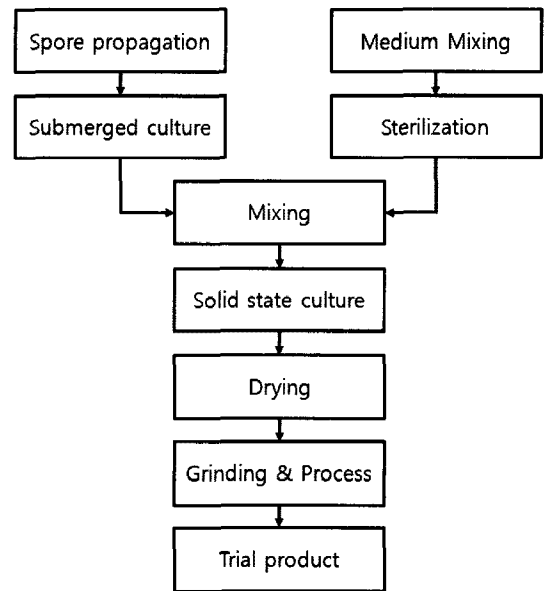


Figure 1. Flow chart for fermented feed stuff.

결과 및 고찰

액체배양 pH의 영향

*Aspergillus*속 균주의 효소 유전자 발현에 영향을 주는 요인은 pH이며 또한 고체배양에 있어서 오염의 우려로 pH에 대한 연구가 보고되고 있다(22-25). 본 연구에 사용된 *A. usarii* mut. *shiro-usarii* 균주의 액체 배양의 효소 활성 최적화를 위해 액체배지의 pH에 따른 고체배양에서 효소 활성의 영향을 실험

하였다. 액체 배지의 pH를 5 N HCl을 이용하여 pH 3, 4, 5, 6으로 조절한 후 44시간 동안 액체배양을 하였고, 이 액체배양액을 다시 밀기울만으로 이루어진 고체배지에 집중하여 65시간 동안 고체배양 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과를 Table 1에 나타내었다. pH에 따른 효소 활성은 pH 4, 5, 6에서 비슷한 결과를 보였으며, 그 중 pH 5에서 효소활성이 가장 우수하였는데 이는 glucoamylase의 경우 최적 활성 조건이 pH 5이므로 액체배지의 pH가 효소활성에 영향을 미친 것으로 판단된다(24-25). 고체배양 시 가장 고려되어야 할 부분인 잡균의 오염을 방지하기 위해서는 효소활성을 유지하면서 오염 방지를 위해 pH를 낮출 수 있는 범위를 선정하는 것이 가장 중요하다. 따라서 본 연구에서는 낮은 pH 조건에서 효소 활성을 유지할 수 있는 pH 4를 최적 액체배지 조건으로 선정하였다.

Table 1. Effect of initial pH on glucoamylase production

Initial pH	Final pH	Glucoamylase activity [U/g]
3	4.31	1,169
4	4.62	1,226
5	5.52	1,229
6	6.07	1,225

#### 고체발효배지 수분의 영향

본 연구에 사용된 *A. usamii* mut. *shiro-usamii*는 고체 배양 시 적정 수분양이 필요한데 이는 균사 성장과 공기 공급에 영향을 주기 때문이다. 따라서 본 실험에서는 고체배지의 수분 함량에 따른 효소 활성의 차이를 살펴보았다. pH 4의 액체배지에서 배양된 액체배양액을 밀기울 고체배지에 혼합한 후 수분 함량이 각각 50, 55, 60, 65%인 혼합물을 조성하여 배양을 한 후 각각의 배양물의 효소활성을 측정하였다. Table 2를 보면 수분 함량이 60%일 경우 가장 높은 효소활성 (1,304 U/g)을 나타내었으며, 그 이상 또는 그 이하의 경우 효소활성이 저하되는 결과를 나타내었다. 발효 사료를 개발하기 위한 본 연구에서는 수분 함유량이 60%가 최적 조건임을 확인할 수 있었다.

Table 2. Effect of moisture content on glucoamylase activity of solid fermentation medium

Moisture content [%]	Glucamylase activity [U/g]
50	994
55	1,281
60	1,304
65	1,087

#### 고체 발효 배지 조성

DDG와 밀기울을 일정 비율 (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40% DDG)로 혼합한 고체배지에서 배양한 고체배양물의 효소 활성, 조단백질 함량 및 아미노산 성분의 차이를 확인하고 최적 혼합 비율을 확인하기 위하여 Table 3과 같이 배지를 조성하였다. Table 3과 같이 혼합한 배지의 수분은 40%이며 이 고체배지와 액체배양액을 2:1의 비율로 혼합하여 60%의 수분을 함유한 배양 조건을 충족시킬 수 있었다. 32°C에서 65시간 배양 후 균사의 배양 상태를 확인하고, 실온에서 24시간 건조 후 효소 활성, 조단백질 함량, 아미노산 성분별 함량을 분석하였다.

Table 3. Composition of mixture media

Material	Contents					
DDG [g]	10.5	15.5	21.0	26.0	31.0	41.5
Wheat bran [g]	100	94.5	89.0	83.0	78.0	67.0
Distilled water [g]	56.0	57.0	57.0	57.5	58.0	58.5
Total weight [g]	166.5	167	167	166.5	167	167
Dry weight [g]	100.1	100.0	100.4	99.8	100.1	100.3
Moisture [%]	40.0	40.2	40.1	40.3	40.3	40.3

조단백질 함량은 DDG 비율이 증가할수록 28%에서 33%로 조금씩 증가하였으며, 효소활성은 고체배지 조성의 DDG 비율이 증가할수록 1,600 (U/g)에서 500 (U/g)으로 크게 저하되었다(Fig. 2). 아미노산 성분 분석 결과(Table 4) DDG 함량이 20%일 경우 최대 아미노산 함량 (28.44%)을 나타내었고 축산 사료의 가치에 영향을 미치는 라이신의 경우도 DDG 20% 함유 고체배지 배양물에서 최대임을 나타내었다. 또한 최적혼합물 배지의 고체배양 전후의 구성 아미노산을 비교해 보면 *A. usamii* mut. *shiro-usamii*에 의해 배양된 배양물의 아미노산 함량이 배양 전보다 2배 이상 증가하는 결과를 보여주었다(Table 5). 밀기울의 경우 발효 전과 후의 조단백, 조지방 등의 성분들이 증가하고 동물 생육에 필요한 각종 활성물질들의 비율이 증가되는 연구가 보고되었다(26). 아미노산 함량 측면에서만 보면 원가가 저렴하고 아미노산 함량이 풍부한 DDG가 사료로서의 가치가 우수하나 본 연구의 목적인 발효 사료로서의 효소활성이 매우 떨어짐으로 최적 혼합 비율은 20% DDG 함유가 적당하다고 사료된다. 이때 효소 활성, 조단백질 함량, 총 아미노산 함량은 각각 1,019 U/g, 30.44%, 28.44%였다.

Table 4. Analysis of amino acid in fermented mixture

Amino acid	Contents of DDG [% (w/w)]						
	0	10	15	20	25	30	40
Aspartic acid	1.70	2.63	2.79	3.06	3.09	3.03	2.98
Threonine	1.00	1.41	1.46	1.62	1.34	1.57	1.52
Serine	0.96	1.55	1.61	1.80	1.75	1.76	1.72
Glutamic acid	2.24	4.90	5.36	5.86	5.70	5.73	5.76
Glycine	1.00	1.38	1.48	1.58	1.58	1.57	1.55
Alanine	1.07	1.64	1.72	1.90	1.90	1.87	1.84
Cysteine	0.09	0.21	0.20	0.23	0.25	0.22	0.23
Valine	0.94	1.46	1.55	1.72	1.77	1.69	1.69
Methionine	0.08	0.25	0.23	0.27	0.29	0.27	0.27
Isoleucine	0.63	1.00	1.07	1.19	1.25	1.18	1.18
Leucine	1.28	2.20	2.33	2.60	2.67	2.57	2.53
Tyrosine	0.51	0.94	0.97	1.14	1.17	1.10	1.10
Phenylalanine	0.70	1.24	1.33	1.50	1.55	1.47	1.47
Lysine	0.87	1.20	1.32	1.41	1.36	1.38	1.34
Histidine	0.35	0.60	0.65	0.67	0.70	0.69	0.68
Arginine	0.89	1.56	1.66	1.86	1.87	1.80	1.81
Total	14.31	24.18	25.73	28.44	28.24	27.92	27.66

Table 5. Amino acid contents of fermented feedstuff

Amino acid	Before fermentation			After fermentation
	DDG	Wheat bran	Mixture*	Mixture*
Aspartic acid	2.88	0.96	1.34	3.06
Threonine	1.16	0.46	0.60	1.62
Serine	1.39	0.59	0.75	1.80
Glutamic acid	6.00	2.02	2.82	5.86
Glycine	1.49	0.76	0.91	1.58
Alanine	1.86	0.67	0.91	1.90
Cysteine	0.18	0.09	0.11	0.23
Valine	1.87	0.68	0.92	1.72
Methionine	0.29	0.05	0.10	0.27
Isoleucine	1.35	0.45	0.63	1.19
Leucine	2.76	0.89	1.26	2.60
Tyrosine	1.16	0.22	0.41	1.14
Phenylalanine	1.63	0.59	0.80	1.50
Lysine	0.90	0.58	0.64	1.41
Histidine	0.65	0.33	0.39	0.6
Arginine	2.05	0.71	0.98	1.86
Total	27.62	10.05	13.56	28.44

\*: mixture = 20% DDG+80% wheat bran.

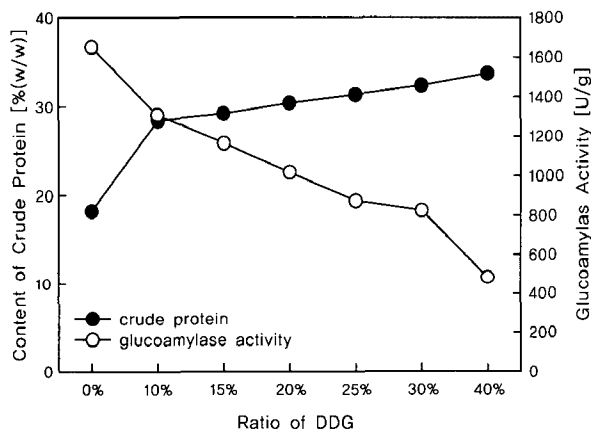


Figure 2. Effect of DDG ratio on crude protein and glucoamylase activity.

발효 사료 제조

효소활성이 우수하며 아미노산 함량이 우수한 발효 사료를 생산하기 위하여 pH 4의 액체 배지에서 배양한 액체배양액 500 L와 1 ton의 혼합배지 (20% DDG+80% 밀기울)를 혼합 후 고체 배양하였다. 고체배양의 산업적 생산을 위하여 pilot scale로 32℃에서 수분을 공급하며 65시간 동안 배양하였으며 배양 완료 후 50℃ 미만에서 24시간 간접 건조하여 생산된 발효 사료의 분석 결과 효소활성과 조단백질 함유량이 각각 1,024 U/g, 33.6%이었다.

요 약

본 연구는 에탄올 생산 부산물인 주정박의 사료로서의 가치를 향상시키고 효소 활성을 유지하면서 아미노산이 다량 함유된 발효 사료를 개발하기 위한 고체 발효 조건을 최적화 하는

데 목적을 두었다. 사용된 균주의 pH에 대한 영향을 살펴본 결과, pH 4에서 효소 활성이 우수하였으며 또한 이 조건은 낮은 pH 조건이므로 잡균에 대한 오염도 예방 할 수 있어 본 실험의 최적 액체배양 조건임을 확인할 수 있었다. 고체 배양을 위한 배양 조건 탐색에서는 60%의 수분을 함유한 고체 배양에서 가장 좋은 효소 활성의 결과를 나타내었으며 적정 배지 조성을 위한 혼합 비율 탐색의 경우 밀기울 함량이 높고 DDG 함량이 낮을수록 효소 활성은 좋았으나 아미노산 함량은 낮은 반면, DDG 함량이 높고 밀기울 함량이 낮을수록 효소 활성은 낮았지만 아미노산 함량은 높은 결과를 나타내었다. 따라서 효소활성 (≥ 1,000 U/g) 및 아미노산 함량 (≥ 28%)이 적당한 고체 발효 배지 조성의 비율은 DDG와 밀기울이 1 : 4 였다. 이렇게 해서 얻어진 결과로 약 1 ton 정도의 발효 사료 시제품을 생산하였으며 시제품의 효소활성과 조단백질 함량은 각각 1,024 U/g과 33.6%였다.

REFERENCES

- Fontaine, J., U. Zimmer, P. J. Moughan, and S. M. Rutherford (2007), Effect of heat damage in an autoclave on the reactive lysine contents of soy products and corn distillers dried grains with solubles. Use of the results to check on lysine damage in common qualities of these ingredients, *J. Agr. Food. Chem.* **55**, 10737-10734.
- Rausch, K. D. and R. L. Belyea (2006), The future of coproducts from corn processing, *Appl. Biochem. Biotech.* **128**, 47-86.
- Ganesan, V., K. A. Rosentrater, and K. Muthukumarappan (2007), Modeling the flow properties of DDGS, *Cereal. Chem.* **84**, 556-562.
- Song, M. H. (2005), Nutritional components and nutritive value of corn-DDGS about milk cow, beef cattle, pig, and fowl, *Kofeed*, **15**, 44-51.
- Chiang, Y. H., T. H. Kang, K. H. Lee, and I. D. Lee (1982), Chemical composition and metabolizable energy in distillers sweet potato and naked barley, *Korean J. Anim. Sci.* **24**, 248-252.
- Ryu, W. J. (2007), Recently supply and demand & price trend of DDGS, *Kofeed*, **24**, 68-73.
- Kim, D., J. P. Fan, D. Choi, H. Park, and G. D. Han (2007), Effects of fermented rice bran addition on the quality improvement of pork, *Korean J. Food, Sci. Technol.* **39**, 608-613.
- Park, B. K., J. M. Gil, J. B. Kim, B. J. Hong, C. S. Ra, and J. S. Shin (2003), Effects of fermented Feedstuff with wet brewer's grain and soybean on fattening performance and carcass grade in Hanwoo steers, *J. Anim. Sci. & Technol.(Kor)* **45**, 397-408.
- Kim, J. S. and M. S. Heu (2004), Preparation and Keeping quality of proteolytic enzymes from seafood processing wastes, *J. Kor. Fish. Soc.* **37**, 259-268.
- Kim, H. J., J. H. Cho, Y. J. Chen, J. S. Yoo, S. O. Shin, Y. Huang, and I. H. Kim (2007), Effects of plant protein source containing multienzyme on performance and milk characteristics in sow, *J. Anim. Sci. & Technol.(Kor.)* **49**, 745-752.
- Shim, Y. H., B. J. Chae, and J. H. Lee (2003), Effects of dietary carbohydrase enzyme complex and microbial phytase supplementation on productivity and nutrient digestibility in growing pigs, *J. Anim. Sci. & Technol.(Kor)* **45**, 569-576.
- Morgavi, D. P., C. J. Newbold, D. E. Beever, and R. J. Wallace (2000), Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid, *Enzyme. Microb. Tech.* **26**, 171-177.
- Colombatto D., F. L. Mould, M. K. Bhat, and E. Owen (2003), Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets - A biochemical and in vitro rumen degradation assessment, *Anim. Feed. Sci. Tech.* **107**, 201-209.

14. Eun, J. S., K. A. Beauchemin, and H. Schulze (2007), Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage, *J. Dairy. Sci.* **90**, 1440-1451.
15. Moon, B. J., Y. K. Kim, C. T. Cho, and D. J. Kim (1989), Study on the feeding value of fermented feed by *Trichoderma viride*, *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* **13**, 264-270.
16. Mamma, D., E. Kourtoglou, and P. Christakopoulos (2008), Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry, *Bioresource. Technol.* **99**, 2373-2383.
17. Sandhya, C., A. Sumantha, G. Szakacs, and A. Pandey (2005), Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation, *Process. Biochem.* **40**, 2689-2694.
18. Debing, J., L. Peijun, F. Stagnitti, X. Xianzhe, and L. Li (2006), Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment, *Ecotox. Environ. Safe.* **64**, 244-250.
19. Somogyi M. (1952), Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
20. AOAC (1995), Official Methods of Analysis, 16th ed, AOAC International, Arlington.
21. Moore, S. and W. H. Stein (1948), Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acid, *J. Biol. Chem.* **176**, 367-388.
22. Rosfarizan, M. and A. B. Ariff (2006), Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* link S44-1 using sucrose as a carbon source under different pH conditions, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **11**, 72-79.
23. Lai, L. T., T. Tsai, T. C. Wang, and T. Cheng (2005), The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures, *Enzyme. Microb. Tech.* **36**, 737-748.
24. Anto, H., U. B. Trivedi, and K. C. Patel (2006), Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate, *Bioresource. Technol.* **97**, 1161-1166.
25. Wang, Q., X. Wang, X. Wang, and H. Ma (2008), Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation, *Process. Biochem.* **43**, 280-286.
26. Kye, S. H., S. S. Kim, and K. M. Chee (1985), A study on improving protein quality of wheat bran by fermentation with *Aspergillus oryzae*, *Korean J. Nutr.* **18**, 234-241.