

*Aspergillus Terreus*에 의한 이타콘산 생산을 위한 최적배양조건에 관한 연구

박승원 · 김승욱
수원대학교 유전공학과

Studies on the Optimal Culture Conditions for Itaconic Acid Production by *Aspergillus Terreus*

Seung-Won Park and Seung-Wook Kim

Department of Genetic Engineering, The University of Suwon,
Suwon P. O. Box 77, Korea

ABSTRACT

The production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* NRRL 1960 was studied. The optimal culture conditions, such as pH, inoculum size and medium composition were established. Maximum production of itaconic acid, 19.18g/l, was obtained when the cultivation was carried out at 37°C and pH 2.5 for 7days, with medium containing 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NH₄Cl, 0.2% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) CaCl₂, 0.1% (w/v) MgSO₄ and 0.2% (w/v) NaCl. A proper medium for inoculum culture was found to be 2% (w/v) malt extract. The batch production of itaconic acid with free cells in a stirred-tank reactor was not efficient, compared to the shake-flask culture.

서 론

이타콘산은 폴리에스터 수지 및 여러 고분자 물질의 제조에 필요한 중간물질로서 주로 *Aspergillus terreus*를 이용한 고체배양 및 액체배양에 의해 생산되고 있다. 이타콘산의 생산을 위한 배양배지 및 배양조건에 관한 연구는 많이 이루어져 왔으나, 각 연구자마다 결과가 다른 면이 있어 이의 확립이 필요하며 특히 배지의 성분은 이타콘산의 생산에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 칼슘 이온은 이타타르산의 생산에 관여하는 이타콘산 산화효소를 억제시켜 이타콘산을 생산할 수 있게 하는 것으로 알려져 있다. 이타콘산이 일정 농도 이상으로 생산될 때 균주 자체에 독성을 나타내는데, 이것

은 ammonia로 중화시키면 보다 많은 이타콘산을 생산할 수 있다. 또한 산 내성을 증가시키고 aluminium이온의 독성 제거를 위해 magnesium이온이 사용되었다(1).

Kim(2)은 이타콘산의 최적생산을 위한 배지로서 sucrose, ammonium sulfate, corn steep liquor, magnesium sulfate, calcium chloride 등의 적합한 성분 및 농도를 확립하였고, Kautola 등(3, 4)은 이타콘산의 생산에 glucose의 농도와 ammonium nitrate, magnesium sulfate 등의 금속이온이 미치는 영향을 보고하였다. 그밖에 여러 연구자들이 유리 균체 및 고정화 균체를 이용하여 배지조성과 배양조건을 연구하였다(5-7).

본 연구에서는 *A. terreus*에 의한 이타콘산의 최적

생산을 위한 배양조건 및 배지조성을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

Aspergillus terreus NRRL 1960을 이타콘산 생산 균주로 사용하였으며, 보관용 배지는 malt extract 한чин 배지를 사용하여 37°C에서 7일간 배양한 후 4°C에서 보관하였다.

종균 배양배지로는 2%(w/v) malt extract와 기본 배지를 사용하였다. 기본 배지의 조성은 5% glucose, 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% Corn Steep Liquor, 0.2% MgSO_4 로 구성되어 있으며 pH는 2.0으로 조정하였다. 100ml의 종균 배양 배지가 포함되어 있는 250ml Erlenmeyer 플라스크에 5%(v/v)의 포자를 접종하여 37°C에서 200rpm으로 48시간 동안 종균 배양하였다.

실험방법

이타콘산은 HPLC(Waters Ltd.)를 사용하여 정량하였으며 사용컬럼은 $C_{18} \mu$ -Bondapak(Waters, USA), 용매는 5% acetonitrile, 유량은 1ml/min 이었다. UV-detector를 사용하여 214nm에서 측정하였다. 배지의 glucose농도는 DNS방법(8)을 사용하여 분광광도계(U-1100, Hitachi Ltd.)로 575nm에서 측정하였다. 균체의 건조중량은 배양액을 6500g에서 10분간 원심분리 후 세척, 여과하여 얻은 균체를 80°C에서 24시간 건조하여 측정하였다. 교반식 생물반응기(Applikon, Holland)는 0.5vvm의 통기량과 200rpm의 교반속도로 운전하였고, 조업부피는 1.5ℓ 이었다.

결과 및 고찰

성장곡선

배양 시간에 따른 균체, 이타콘산 및 glucose의 농도와 pH의 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보여주듯이 균체의 농도 및 이타콘산의 생산은 7일 후에 각각 6.16 g/l , 11.96 g/l 로 최대치를 나타냈고, pH는 약 2.0을 유지하였다.

접종량의 영향

일반적으로 생산 배지에 접종되는 접종량에 따라 균체의 성장 및 배지의 환경 등에 변화를 주어 이타콘산의 생산에 영향을 미칠 수 있다.

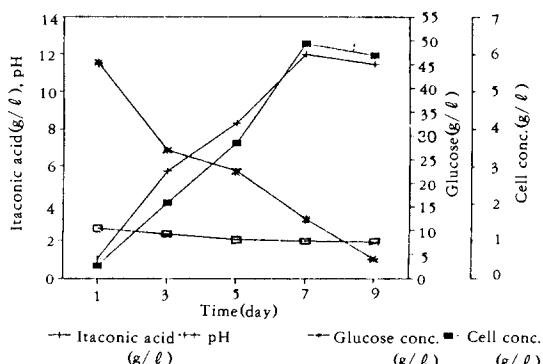


Fig. 1. Batch culture profile of *A. terreus*. The experiment was carried out with basal medium, at 37°C for 9 days.

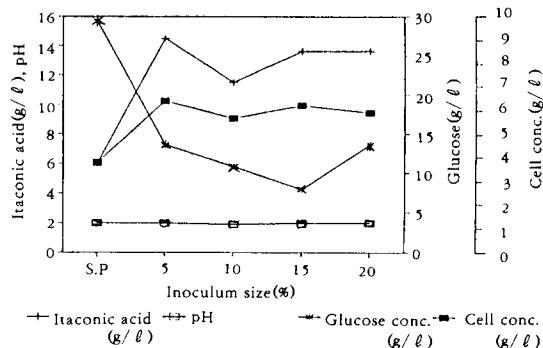


Fig. 2. Effect of inoculum size on the production of itaconic acid. The experiment was carried out with basal medium, at 37°C for 7 days. S.P.: Spore suspension 5, 10, 15, 20: Inoculum size(% v/v).

포자 혼탁액 ($10^8/\text{ml}$) 및 5%(v/v), 10%(v/v), 15%(v/v)와 20%(v/v)의 inoculum으로 생산 배지에 각각 접종하여 이타콘산 생산을 검토했을 때, 5%(v/v)의 접종량이 가장 적합한 것으로 나타났다 (Fig. 2).

탄소원의 영향

Table 1은 이타콘산의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 나타낸 것이다. 탄소원으로 glucose, sucrose, starch, α -cellulose, xylose, 그리고 fructose를 사용했을 때, glucose와 sucrose 이외의 탄소원에서는 낮은 이타콘산의 생산을 보였다. 탄소원으로 glucose를 사용했을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

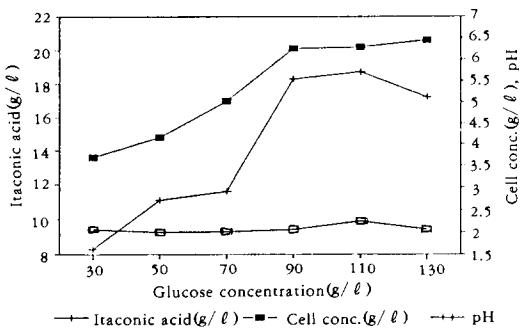


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the production of itaconic acid. The experiment was carried out with basal medium containing 0.3% (w/v) ammonium sulfate, 0.2% (v/v) C. S. L. and 0.2% (w/v) magnesium sulfate, at 37°C for 7 days.

Table 1. Effect of carbon source on the production of itaconic acid.

Carbon source	Final pH	Dry wt.(g/l)	Itaconic acid(g/l)
Glucose	1.67	6.2	11.48
Sucrose	1.77	5.5	9.48
Starch	1.96	3.2	1.89
Xylose	2.29	3.2	1.53
α -cellulose	2.39	2.1	1.01
Fructose	2.42	0.4	1.21

Culture was carried out at 37°C for 7days in the production medium containing 0.3% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% (v/v) C. S. L. and 0.2% (w/v) MgSO_4 .

Glucose 농도의 영향

Glucose의 농도를 30~130g/l로 변화시켰을 때, 110g/l 까지는 이타콘산의 생산이 점차로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보인다(Fig. 3). 이타콘산의 생산량을 보면 glucose 110g/l를 사용했을 때 18.7g/l($Y_{p/s}=17\%$)로 사용된 glucose 농도 중 최대치를 얻었으나, 이타콘산 생산량과 생산물 수율($Y_{p/s}$)을 고려하면 glucose 농도 50g/l에서 11.1g/l($Y_{p/s}=22.2\%$)로 가장 적합한 농도인 것을 알 수 있었다.

초기 pH의 영향

Fig. 4는 초기 pH를 1.5~5.0으로 변화시켰을 때 이타콘산의 생산에 미치는 영향을 보여준다. 이타콘

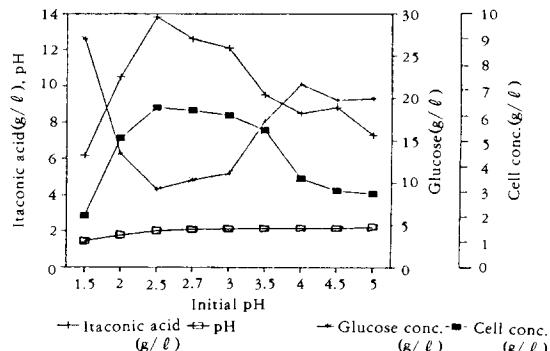


Fig. 4. Effect of initial pH on the production of itaconic acid. The experiment was carried out with production medium containing 5% (w/v) glucose, 0.3% (w/v) ammonium sulfate, 0.2% (v/v) C. S. L. and 0.2% (w/v) magnesium sulfate, at 37°C for 7 days.

산의 생산은 pH 2.5에서 가장 높게 나타났으며, 균체량도 역시 가장 높았다. 이러한 결과는 전에 보고되었던 논문들마다 약간씩 차이가 있음을 알 수 있다.

예를 들면 Larsen과 Eimhjellen(9)은 *A. terreus*를 초기 pH 2.1에서 배양했을 때 가장 많은 이타콘산을 생산함을 보고했다. 또한 Rychter와 Wase(10)는 초기 pH가 *A. terreus*의 성장과 이타콘산의 생산에 미치는 영향을 연구하였는데, 이들은 pH 2.0에서 균체가 거의 성장하지 못할 뿐만 아니라, 이타콘산도 생산하지 못함을 보고하였고, 높은 pH에서는 pellet 형태로 자람을 관찰하였다.

본 실험에서 관찰한 바로는 최적 pH인 2.5에서는 균사 형태로, pH 3.0 이상에서는 pellet 형태로 자랐으며, pH가 높아질수록 pellet의 크기가 증가함을 알 수 있었다. 결과적으로 이타콘산의 최적 생산을 위해서 균체의 성장은 pellet 형태보다는 균사 형태가 적합함을 알 수 있다.

무기 질소원의 영향

각종 무기 질소원을 0.3% (w/v)씩 첨가하여 이타콘산 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다(Table 2). 무기 질소원으로는 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등의 ammonium염이 효과적이었는데 이는 이타콘산이 과다로 생산될 때 발생되는 독성을 제거하는 효과 때문인 것 같다(11).

Lookwood와 Ward(1)의 보고에서는 NH_4NO_3 나

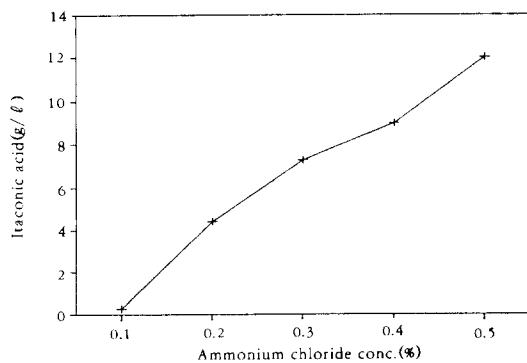


Fig. 5. Effect of ammonium chloride concentration on the production of itaconic acid. The experiment was carried out with production medium containing 5% (w/v) glucose and 0.2% (w/v) magnesium sulfate, 37°C for 7days.

Table 2. Effect of inorganic nitrogen source on the production of itaconic acid.

Inorganic nitrogen source	Final pH	Residual glucose(g/l)	Dry wt. (g/l)	Itaconic acid (g/l)
None	2.15	8.98	3.56	0.03
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.62	5.16	9.04	4.1
NH ₄ Cl	1.41	6.6	8.96	7.31
NH ₄ NO ₃	1.75	3.5	11.13	0.97
KNO ₃	5.42	1.26	17.1	0.1
NaNO ₃	4.43	1.12	11.9	1.64

Culture was carried out at 37°C for 7days in the production medium containing 5% (w/v) glucose, 0.2% (v/v) C. S. L and 0.2% (w/v) MgSO₄.

(NH₄)₂SO₄가 좋은 무기 질소원으로 나타났으나, 본 실험에서는 NH₄Cl이 좋은 무기 질소원임을 알 수 있었다.

또한 KNO₃나 NaNO₃와 같은 alkali nitrate 첨가시에는 alkali 금속이온에 의해 이타콘산 생산이 저해 된다는 Milson과 Meers(12)의 보고와 다르게 무기 질소원이 첨가되지 않은 경우보다 증가된 이타콘산 생산량을 보였다. 그러나 이같은 결과에도 불구하고 이때의 이타콘산 생산량은 매우 낮았는데 이는 nitrate 첨가로 균체 증식에 glucose가 소모되어 이타콘산 생산량이 저하된 것으로 보인다.

또한 NH₄Cl의 농도별 효과는 Fig. 5에 나타나 있

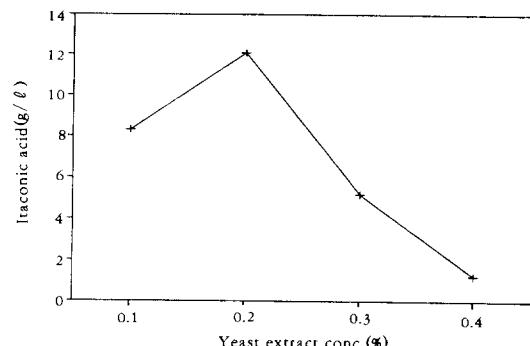


Fig. 6. Effect of yeast extract concentration on the producton of itaconic acid. The experimt was carrie out with production medium containing 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) ammonium chloride and 0.2% (w/v) magenesium sulfate, at 37°C for 7days.

Table 3. Effect of organic nitrogen source on the production of itaconic acid.

Organic nitrogen source	Final pH	Residual glucose(g/l)	Dry wt. (g/l)	Itaconic acid (g/l)
None	2.05	9.75	1.85	1.48
C. S. L	1.57	6.6	9.1	11.9
Yeast extract	1.51	1.58	13.3	12.65
Tryptone	1.71	5.41	7.8	7.40
Peptone	1.91	8.25	4.2	2.88

Culture was carried out at 37°C for 7days in the production medium containing 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NH₄Cl and 0.2% (w/v) MgSO₄.

는데 NH₄Cl이 증가함에 따라 이타콘산도 증가함을 알 수 있었고, 본 실험에서는 이타콘산 생산을 위한 무기 질소원으로 0.5% NH₄Cl로 결정했다.

유기 질소원의 영향

다양한 유기 질소원을 0.2% (w/v)씩 각각 첨가하여 이타콘산 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다. Table 3에서 보는 바와 같이 기본 배지에 사용되었던 질소원인 corn steep liquor보다는 yeast extract에서 좋은 결과를 얻었다. 그밖의 유기 질소원도 이타콘산의 생산을 증가시켰으나 yeast extract나 corn steep liquor에 비해 낮았다. 또한 yeast extract의 농도의 영향은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 0.2% (w/v)까지는 증가하다가 그 이후에는 감소하

Table 4. Effect of metal ion on the production of itaconic acid.

Metal ion	Final pH	Glucose (g/l)	Dry wt. (g/l)	Itaconic acid (g/l)
none	1.26	0.63	16.29	2.80
NaCl	1.43	19.28	10.90	13.20
CaCl ₂	1.31	0.65	14.24	15.01
FeSO ₄	1.52	46.61	4.53	1.02
ZnSO ₄	1.35	4.83	15.01	6.44
KCl	1.31	1.89	13.24	1.93
MnSO ₄	1.30	2.01	14.28	6.52
MgSO ₄	1.31	0.2	13.36	11.45
CuSO ₄	2.22	48.0	2.1	0.60

Culture was carried out at 37°C for 7days in the production medium containing 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NH₄Cl and 0.2% (w/v) yeast extract.

Table 5. Effect of concentration of CaCl₂, MgSO₄, and NaCl on the production of itaconic acid.

Metal ion conc. (%)	Final pH	Glucose (g/l)	Dry wt. (g/l)	Itaconic acid (g/l)
CaCl ₂ 0.05	1.79	0.41	12.17	16.0
0.1	1.69	0.70	12.74	16.49
0.2	1.72	0.30	14.35	15.01
0.3	1.66	0.43	12.06	12.77
0.4	1.86	15.20	5.59	1.14
MgSO ₄ 0.05	1.73	7.02	9.37	9.47
0.1	1.64	0.37	12.67	13.12
0.2	1.62	0.28	15.30	11.50
0.3	1.77	0.29	14.29	10.70
0.4	1.89	3.43	14.56	4.63
CaCl ₂ (0.1)+MgSO ₄ (0.1)	1.52	0.27	13.95	17.90
CaCl ₂ (0.1)+MgSO ₄ (0.1)+NaCl(0.2)	1.49	0.35	13.90	19.18

Culture was carried out at 37°C for 7days in the production medium containing 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NH₄Cl and 0.2% (w/v) yeast extract.

는 것을 알 수 있었다.

따라서 유기 질소원으로는 0.2% yeast extract를 사용하기로 결정했다.

Table 6. Optimal culture condition on the itaconic acid production.

Inoculum size	5% (v/v)
Initial pH	2.5
Carbon source	5% (w/v) glucose
Inorganic nitrogen source	0.5% (w/v) NH ₄ Cl
Organic nitrogen source	0.2% (w/v) Yeast extract
Metal ion	0.1% (w/v) CaCl ₂ +0.1% (w/v) MgSO ₄ +0.2% (w/v) NaCl

금속이온의 영향

각종 금속 염을 0.2% (w/v)씩 첨가하여 이타콘산 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다. Table 4에서 알 수 있듯이 CaCl₂를 첨가했을 때 가장 높은 이타콘산을 생산하였고, 그밖에 NaCl, MgSO₄도 좋은 결과를 보여 주었다.

CaCl₂는 이타타르산 생산에 관여하는 이타콘산 산화효소를 억제하여 보다 많은 기질이 이타콘산으로 전환될 수 있다고 알려져 있다. 또한 magnesium은 산에 대한 내성을 증가시켜 aluminium ion의 독성을 제거하는데 유용한 것으로 알려져 있다 (1).

이타콘산 생산에 커다란 영향을 미치는 CaCl₂와 MgSO₄의 농도에 따른 이타콘산의 생산을 조사하였으며, 또한 NaCl의 첨가에 대한 이타콘산의 생산도 조사하였다(Table 5). 그 결과 CaCl₂와 MgSO₄의 최적 농도는 각각 0.1% (w/v)로 나타났다. 이들을 혼합하여 첨가했을 때 이타콘산의 생산이 증가되었으며, 특히 여기에 0.2% (w/v) NaCl을 첨가했을 때 가장 높은 19.18g/l의 이타콘산을 생산하였다.

이상의 결과를 종합한 *A. terreus*에 의한 이타콘산의 생산에 대한 최적 조건은 Table 6에서 보는 바와 같다. 특히 최적 배지 성분은 지금까지 주로 사용된 성분들과는 다른 NH₄Cl, yeast extract, NaCl 등을 사용하여 이타콘산의 생산을 향상시킬 수 있었다.

종균 배양 배지의 영향

각각 다른 종균 배양 배지에서 *A. terreus*를 활성화 시켰을 때 이타콘산 생산에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하였다. 지금까지 실험을 수행해 왔던 종균배지인 2% (w/v) malt extract와 기본 배지, 그리고 이미 이전 실험에서 밝혀졌던 최적화된 배지에서 균체를 활성화시켰다. 앞의 결과에서 최적 pH가 2.5이었기 때문에, 종균 배양의 경우도 초기 pH를 2.0과 2.5로 조절하여 비교해 볼 필요가 있었다. 그래서 종균 배양 배지의 pH를 2.0과 2.5로 조절하

Table 7. Effect of starter culture medium on the production of itaconic acid.

Starter culture medium	pH	Glucose (g/l)	Dry wt. (g/l)	Itaconic acid (g/l)
Malt extract (pH 2.0)	1.62	8.4	10.63	18.0
Malt extract (pH 2.5)	1.64	6.33	9.6	19.2
Basal medium (pH 2.0)	1.64	18.39	11.74	4.13
Basal medium (pH 2.5)	1.58	16.5	10.84	8.64
Optimized medium (pH 2.0)	1.50	18.9	12.18	4.27
Optimized medium (pH 2.5)	1.53	18.6	18.6	13.58

Culture was carried out at 37°C for 7days in the production medium containing 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NH₄Cl, 0.2% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) CaCl₂, 0.1% (w/v) MgSO₄ and 0.2% (w/v) NaCl.

고, 각 조건에서 활성화시켜 inoculum으로 활성화된 배지에 접종했을 때 이타콘산의 생산의 영향을 살펴보았다.

그 결과 Table 7에서 보는 바와 같이, pH 2.5의 malt extract에서 활성화시킨 inoculum을 사용한 경우에 가장 많은 19.2g/l의 이타콘산 생산을 확인할 수 있었다. 균체의 성장 형태는 종균 배양에서 사용된 배지나 pH에 관계없이 모두 균사 형태로 자랐으나, 조금씩 형태가 다른 것을 관찰할 수 있었다. 예를 들면 malt extract에서 활성화되었던 균체는 초기 pH와 관계없이 본 배양에서 균사 형태로 자라는 것을 볼 수 있었고, pH 2.0의 기본 배지와 최적 배지에서 활성화되었던 균체는 본 배양에서 1mm 정도의 pellet과 균사체가 함께 존재함을 확인할 수 있었으며, pH 2.5에서 활성화되어었던 균체는 본 배지에서 균사 형태로 자라며 배지에 전반적으로 퍼져서 사람을 확인하였다.

이같은 결과로써 균사 형태로 자란 균체가 pellet으로 자란 균체보다 많은 이타콘산을 생산함을 알 수 있었는데, 이는 균사 형태로 자라는 것이 pellet 형태로 자라는 것보다 물질 전달 등이 원활하게 이루어지기 때문인 것으로 생각된다.

교반식 생물 반응기에서의 이타콘산의 생산
플라스크 배양에서 확립된 최적 조건을 토대로 A.

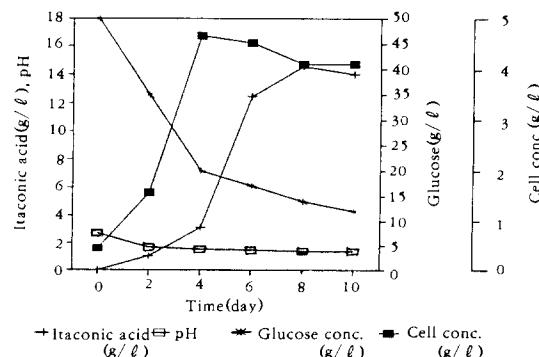


Fig 7. Production of itaconic acid by mycelium in the stirred-tank reactor operated with batch culture.

*terreus*를 교반식 생물 반응기(조업부피 1.5l)에서 배양하였다. 이때 통기속도는 0.5vvm, 교반속도는 200rpm이었으며, 온도는 37°C에서 유지하였다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 *A. terreus*의 균체량은 6일까지 계속 증가하였으며 그 이후는 거의 같은 수준이거나 감소함을 알 수 있었고, 이타콘산의 생산은 8일째 가장 높은 14.56g/l를 나타내었다. 이 실험에서 균체의 wall growth가 목격되었다.

교반식 생물 반응기에서의 운행상의 문제점으로 나타난 wall growth는 균체가 성장하면서 발생하는 foam에 의하여 발생하는 것으로 생각되며, 이를 극복하기 위하여 이타콘산의 생산이나 균체의 성장에 영향을 미치지 않는 antifoam의 첨가가 요구되었다. 교반식 생물 반응기에서의 *A. terreus*의 성장은 균체가 균사 형태로 자라기 때문에 균체가 기계적인 전단 응력에 영향을 받을 뿐 아니라, 배양액의 점도가 높아져 산소 전달에 영향을 주어 이타콘산의 생산이 저해되었다고 생각된다. 이를 해결하기 위해 유동층 생물반응기의 이용 또는 적절한 고정화 방법의 사용이 요구된다.

요 약

Aspergillus terreus NRRL 1960에 의한 이타콘산의 생산에 관해 연구하였다. pH, 접종량, 배지조성 등의 최적조건을 확립하였다. 이타콘산의 최대생산량은 37°C, pH 2.5의 조건에서, 5% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) NH₄Cl, 0.2% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) MgSO₄, 0.2% (w/v) NaCl을 포함하는 배지에서 7일만에 19.18g/l를 얻을 수 있

었다. 종균배양 배지로서 2% malt extract가 적합하였다. 교반식 반응기에서 유리균체에 의한 이타콘산의 회분식 생산은 플라스크 배양에 비해 비효율적이었다.

감 사

본 연구는 생물공정연구센터의 지원(1992)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. L. B. Lockwood and G. E. Ward(1945), *Ind. Eng. Chem.*, **37**, 405.
2. Y. S. Kim(1990), MSc Thesis, Korea University.
3. H. Kautola, B. Gronlund, H. Horitsu, Y. -Y. Linko and P. Linko(1987), Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnol., **1**, 106.
4. H. Kautola, W. Rymowicz, Y. -Y. Linko and P. Linko(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 154.
5. H. Horitsu, Y. Takahashi, J. Tsuda, K. Kawai and Y. Kawano(1983), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 358.
6. H. Kautola, N. Vassilev and Y. -Y. Linko (1990), *J. Biotechnol.*, **13**, 315.
7. N. Vassilev, H. Kautola and Y. -Y. Linko (1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 201.
8. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
9. H. Larsen and K. E. Eimhjellen(1955), *Biochem. J.*, **60**, 135.
10. M. Rychter and D. A. J. Wase(1981), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **31**, 509.
11. A. Wiseman, *Principles of Biotechnology*, 2nd ed., 18, Surrey Univ. Press, N.Y.
12. P. E. Milson and J. L. Meers(1985), *Biotechnology*, (H. -J. Rehm and G. Reed, eds), **3**, 681, Verlag Chemie, Weinheim.