

*Aspergillus terreus*에 의해 생합성되는 이타콘산의 생산성 증가를 위한 통계적 생산배지 최적화

장용만 · 신우식 · 이도훈¹ · 김상용¹ · 박철환² · 정용섭³ · 전계택*

강원대학교 BT특성화학부대학, ¹한국생산기술연구원, ²광운대학교 화학공학과, ³전북대학교 응용생물공학부

Statistical Optimization of Production Medium for Enhanced Production of Itaconic Acid Biosynthesized by Fungal Cells of *Aspergillus terreus*

Yong-Man Jang, Woo-Shik Shin, Do-Hoon Lee¹, Sang-Yong Kim¹, Chulhwan Park²,
Yong-Seob Jeong³, and Gie-Taek Chun*

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, South Korea.

¹Korea Institute of Industrial Technology, South Korea.

²Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, South Korea.

³Division of Biotechnology, Chonbuk National University, South Korea.

Abstract Statistical optimization of the production medium was carried out in order to find an optimal medium composition in itaconic acid fermentation process. Itaconic acid utilized in the manufacture of various synthetic resins is a dicarboxylic acid biosynthesized by fungal cells of *Aspergillus terreus* in a branch of the TCA cycle via decarboxylation of cis-aconitate. Through OFAT (one factor at a time) experiments, six components (glucose, fructose, sucrose, soluble starch, soybean meal and cottonseed flour) were found to have significant effects on itaconic production among various carbon- and nitrogen-sources. Hence, using these six factors, interactive effects were investigated via fractional factorial design, showing that the initial concentrations of sucrose and cottonseed flour should be high for enhanced production of itaconic acid. Furthermore, through full factorial design (FFD) experiments, negative effects of KH_2PO_4 and MgSO_4 on itaconic acid biosynthesis were demonstrated, when excess amounts of the each component were initially added. Based on the FFD analysis, further statistical experiments were conducted along the steepest ascent path, followed by response surface method (RSM) in order to obtain optimal concentrations of the constituent nutrients. As a result, optimized concentrations of sucrose and cottonseed flour were found to be 90.4g/L and 53.8g/L respectively, with the corresponding production level of itaconic acid to be 4.36 g/L (about 7 fold higher productivity as compared to the previous production medium). From these experimental results, it was assumed that optimum ratio of the constituent carbon (sucrose) and nitrogen (cottonseed flour) sources was one of the most important factors for the enhanced production of itaconic acid.

Keywords: itaconic acid, medium optimization, factorial design, steepest ascent, response surface method

서 론

이타콘산 (itaconic acid)은 사상성 곰팡이로부터 생산되

는 유기산으로 두 개의 카르복실 그룹과 메틸렌 그룹간의 결합을 이용하여 이합체나 올리고머 (oligomer) 등의 고분자로 중합되는 특성을 가지고 있다(1~3). 따라서 이타콘산은 폴리에스테르 수지나 N-치환 파이롤리딘 및 스티렌부타디엔 등 고분자 물질의 중요한 전구체로서 섬유, 도색제, 세척제 및 제약 산업 등에 널리 사용되고 있다(4~5). 이타콘산이 곰팡이의 대사물질 중에서 처음 동정

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8547, Fax: +82-33-241-4627

e-mail: gtchun@kangwon.ac.kr

된 이래로 그 생합성 기작에 대한 연구가 꾸준히 이루어졌는데, 이타콘산은 해당과정 및 TCA 회로를 거치며 시트르산과 cis-aconitic acid을 중간물질로 하여 디카르복실화 반응에 의해 생합성된다고 발표되었다(6~9). 이타콘산은 2004년에 미국 에너지성 (US DOE)이 발표한 미래의 대체 화학물질들 중에서, 화학적 자료, 시장 데이터, 특성, 효율성 등을 정밀 검토한 후 선정한 10개의 잠재적인 후보군에 포함되어 있을 정도로 시장성이 매우 높은 고부가가치 화학물질이다.

이타콘산은 화학적 방법 또는 미생물 발효를 통한 생물학적 방법을 적용하여 생산할 수 있다. 화학적 방법은 이타콘산의 전구물질인 citric acid나 cis-aconitic acid를 가열 분해하여 이타콘산을 생산하는 방법이다. 이 경우 화학반응 시 수반되는 여러 부산물로 인해, 현재 이타콘산의 산업적인 생산을 위해서는 미생물 발효공정이 주로 적용되고 있다. 이타콘산과 같은 균류 유래의 대사산물을 대량 생산하기 위해서는 생산균주의 배양생리적 특성을 최대한 이용하기 위해 배양조건에 대한 조절, 특히 생산배지의 최적화가 필수적이다. 가장 우수한 이타콘산 생산균주로 알려진 *Aspergillus terreus*에 의한 이타콘산의 생합성 시, 생산배지의 조성은 특별히 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다(10~14). 배지 조성에 대한 최적 조건을 결정하기 위한 지금까지의 대부분의 연구는 하나의 배지성분을 여러 수준으로 놓고 나머지 배지성분들의 농도는 고정시켜 실험하는 방법을 주로 이용해왔다. 이 방법은 주어진 조건에서 특정 성분의 영향을 파악할 수 있다는 장점이 있지만, 다른 성분들의 조건이 동시에 변하면 그 결과를 예측하기 어렵고, 특히 배지성분들 간의 상호작용이 존재할 경우 얻어진 결과가 요소만의 단독효과인지, 또는 다른 요소와의 상호작용에 의한 효과인지를 구분할 수 없게 된다. 무엇보다도 이 방법의 가장 큰 문제점은 최대 생산성을 갖는 최적의 배지조성을 찾기가 매우 어렵다는 점이다.

이러한 문제점을 극복하기 위해 본 연구에서는 통계적 배지 최적화 방법을 도입하였다(15, 16). 즉 생산배지의 조성을 최적화하기 위해 이타콘산의 생산성에 큰 영향을 미치는 주요 배지성분들을 우선 찾아내고, 그 성분들의 교호작용을 확인하기 위해 다양한 통계적 방법을 순차적으로 적용한 후, 어떠한 배지조성에서 이타콘산의 생산성이 최대인지를 반응표면분석법을 적용하여 최종 조사하였다. 생산균주로서 본 연구팀이 개발한 이타콘산의 막투과성 변이주인 *Aspergillus terreus* SEL18-11 균주를 이용하여 통계적 배지최적화 연구를 수행하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 균주보관

본 연구에 사용된 균주는 본 연구팀이 rational screening

방법을 적용하여 개발한 *Aspergillus terreus* (ATCC 20542)의 막투과성 돌연변이주인 SEL18-11균주를 사용하였다. 균주보관은 spore 형성배지인 PDA (potato dextrose agar) plate에 접종하여 6일 동안 28°C에서 배양한 후 solid stock으로 보관하였으며, liquid stock으로 만들 때에는 20% glycerol이 함유된 증류수로 -80°C deep freezer에 냉동 보관하여 필요시마다 해동하여 사용하였다.

배지 및 배양 조건

사용된 배지는 배양 목적에 따라 성장배지 (growth medium, GM), 생산배지 (production medium, PM)로 구분하였으며, 습식멸균 시 침전과 갈변현상을 방지하기 위해 배지의 당과 무기염류는 농축용액으로 만들어 멸균한 뒤 무균상태에서 나머지 배지 용액과 혼합하여 사용하였다. 플라스크를 이용한 생산배양 시 성장배양은 spore 형성배지인 PDA (potato-dextros agar)에 균을 접종 후 28°C에서 6일간 배양하여 형성된 포자들을 seed로 사용하였다. 즉 포자들을 20% glycerol이 포함된 증류수로 회수하여 30 ml의 성장배지 (GM)가 들어있는 250 ml flask에 10% (v/v)의 부피로 접종한 후, 이를 진탕배양기에서 28°C, 230 rpm으로 3일간 배양하였다. 배양 초반에 사용한 4 종류의 성장배양 배지 (GM-A, GM-B, GM-C, GM-D)의 조성을 Table 1에 제시하였다(최종 결정된 성장배지 조성은 결과 및 고찰에서 제시). 생산배양은 성장배양에서 얻은 균사체를 30 ml의 생산배지 (PM)가 들어있는 250 ml flask에 10% (v/v)의 부피로 접종하여 28°C, 220 rpm으로 7일간 배양하였다. 최적화되기 이전의 생산배지인 PM-1 배지의 조성은 다음과 같다: Glucose 80 g, (NH₄)₂SO₄ 4 g, MgSO₄ 2.1 g, KH₂PO₄ 0.11 g, trace element solution 1 ml, distilled water 1 L. Trace element solution : FeSO₄·7H₂O 5 g/L, NaMoO₄ 0.025 g/L, CaCO₃·5H₂O 0.15 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.18 g/L, ZnSO₄·7H₂O 4.4 g/L. 이 PM-1 배지 성분에 근거해서 결과 및 고찰에서 제시하는 바와 같이 생산배지 조성의 통계적 최적화가 이루어 졌다.

Table 1. The composition of growth medium (A, B ,C, D) (GM-A) (GM-B)

(GM-A)		(GM-B)	
Glucose	20 g l ⁻¹	Sucrose	60 g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2 g l ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g l ⁻¹
C.S.L	0.8 g l ⁻¹	MgSO ₄	1 g l ⁻¹
MgSO ₄	0.8 g l ⁻¹	KH ₂ PO ₄	0.08 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.02 g l ⁻¹	Trace	1 ml l ⁻¹
(GM-C)		(GM-D)	
Glucose	20 g l ⁻¹	Glucose	55 g l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.47 g l ⁻¹	Corn steep liquor	3 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.022 g l ⁻¹	NH ₄ NO ₃	5 g l ⁻¹
MgSO ₄	0.415 g l ⁻¹	MgSO ₄	2 g l ⁻¹
CaCl ₂	0.026 g l ⁻¹	KH ₂ PO ₄	0.02 g l ⁻¹
NaCl	0.015 g l ⁻¹		

균체농도 및 이타콘산 정량분석

균체 농도는 건조중량 (Dry Cell Weight, DCW)을 이용하여 측정하였다. 균일한 시료를 얻기 위해 homogenizer로 균일화 과정을 거친 후, 10 ml의 배양액을 4000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 남아 있는 당 및 염류들을 증류수로 세척한 뒤, 이를 weighing dish에 담아 90°C에서 12시간 건조 후 건조중량을 측정하여 1리터 당 세포농도로 환산하여 나타내었다. 배양액의 이타콘산을 측정하기 위해 진탕 배양된 혼합물을 12000 rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 이물질이 제거된 상등액 600 μ l를 0.45 μ m의 microfilter에 통과시킨 후, 이를 HPLC의 정량분석 시료로 이용하였다. 이타콘산 분석을 위한 HPLC 분석조건은 다음과 같다:

Column : Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μ m) (Kanto Chemical Co., Japan)

Mobile phase : 8% acetonitrile (water:0.15% phosphoric acid)

Column temperature : 40°C by temperature controller.

Detector : M 720 absorbance detector (YOUNGLIN Co., Korea)

Wave length : 220 nm

Flow rate : 1.2 ml/min

Sample loop size : 20 μ l.

요인설계 (Full or fractional factorial design) (FFD), 최급상승법 (SAM) 및 반응표면분석법 (RSM)을 이용한 최적 배지성분 결정 및 통계적 배지농도 최적화

통계적 배지 최적화 방법을 수행하기 전에 우선적으로 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 “one factor at a time (OFAT) method”에 의해 다양한 배지 성분이 이타콘산의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 OFAT 방법에서는 확인할 수 없는 각 성분간의 상호작용의 정도를 확인하는 통계적인 방법인 full 또는 fractional factorial design (FFD)방법을 이용해서 이타콘산의 생산성 증가에 긍정적인 효과를 보이는 최적의 배지 성분을 선정하는 과정을 거쳤다(17, 18).

한편 FFD의 실험에 의해 선별된 배지성분을 이용해서 각 배지성분의 최적 농도를 선정하기 위한 반응표면분석법 (response surface method, RSM)을 곧바로 실행할 경우, 어느 정도의 농도 범위에서 최적의 농도가 존재하는지를 추정하기가 매우 어려운 문제점이 존재한다. 따라서 Fig. 1에 체계적으로 제시한 바와 같이, 최종적인 RSM 실험을 수행하기 전에 최적 농도가 존재하는 근사치를 추정하기 위해서 최급상승법 (steepest ascent method, SAM)을 이용한 배양실험을 먼저 수행하였다(19). 그 후 선별된 배지성분의 최적 농도를 최종적으로 결정하기 위해 배지성분 각각의 농도 변화가 이타콘산 생산성에 미

치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 통계적으로 분석하였다. 이를 위한 실험계획법으로 중심합성계획법 (central composite design, CCD)를 이용하였다(15). 중심합성계획법에서는 중심점 (n_0)의 수는 제한이 없으며 (본 실험에서는 4개의 중점을 사용), 축점 (a)의 수는 2 k로서 (본 실험의 4가지의 배지성분 농도를 조사한 경우를 예를 들면) 총 8개의 축점 실험을 수행하였다. 따라서 4가지 성분의 농도를 최적화시키는 경우, 총 실험횟수는 $2^k + 2k + n_0 = 2^4 + (2 \times 4) + 4$ 가 되므로 28개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다.

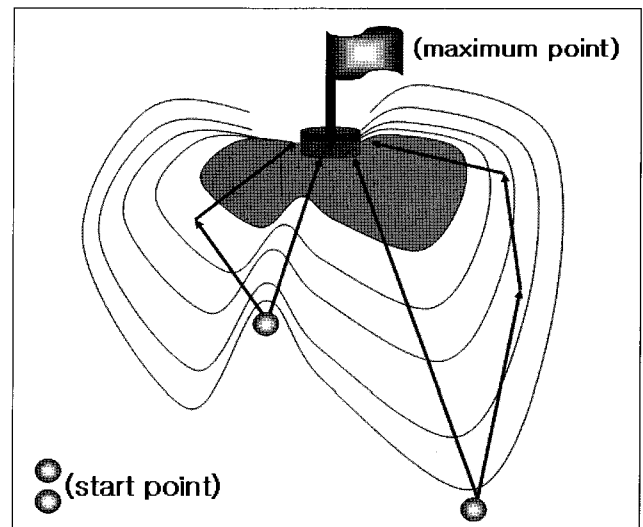


Fig. 1. Schematic diagram of the steepest ascent method (SAM).

중심합성계획법에 의거해 얻은 배양결과를 Design-Expert 6.0 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 배지성분들에 대한 상호 영향을 분석하고, 이 결과를 바탕으로 최고 생산성을 위한 각 배지성분의 최적 농도를 결정하였다. 이 때 전체 model에 대한 유의성은 ANOVA 분석 시 주어지는 P값에 의해 결정되며, P값이 0.05 보다 작을 때 그 유의성이 인정된다고 간주하였다. 최적 배지농도는 2차다항식의 Y값인 이타콘산의 생산농도가 최대가 되는 지점을 3차원 반응표면도와 contour plot을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

성장배양 조성에 따른 생산배양에서의 이타콘산 생산성 비교

문헌에서 조사한 다양한 종류의 성장배양 배지 (GM-A, GM-B, GM-C, GM-D)(Table 1)를 이용해서 성장배양시의 배양형태 (morphology)(Fig. 2) 및 생산배양에서의 이

이타콘산의 생산성(Fig. 3)을 조사하였다 (연구 초반에 사용된 생산배지는 최적화되기 이전의 배지인 PM-1 배지이며, 이 PM-1 배지성분에 근거해서 하기에 고찰한 바와 같이 생산배지 조성의 통계적 최적화가 이루어 졌음). 그 결과 GM-D 배지를 이용하여 성장배양을 수행한 경우, 성장배양의 morphology가 최적의 배양형태인 균사모양(filamentous form)을 이루었고, 최종 생산배양 시 이타콘산의 생산량도 다른 종류의 성장배지에 비해 상대적으로 높게 나타났다(Fig. 3).

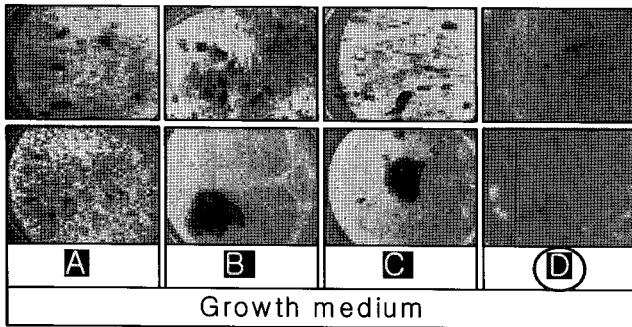


Fig. 2. Morphologies according to various kinds of growth medium (A: GM-A medium, B: GM-B medium, C: GM-C medium, D: GM-D medium).

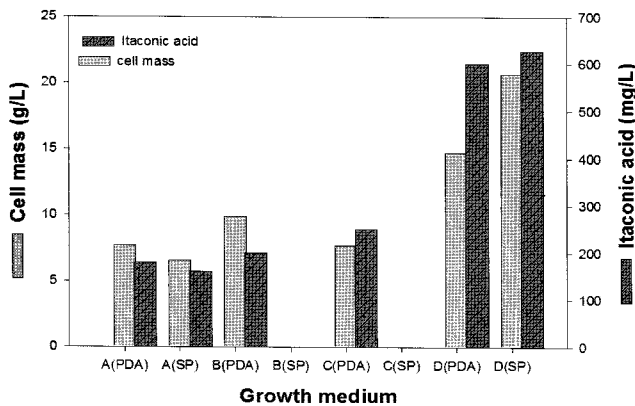


Fig. 3. Production of itaconic acid according to various kinds of growth medium (A: GM-A medium, B: GM-B medium, C: GM-C medium, D: GM-D medium).

주목할 점은 이타콘산 생산성이 모든 경우에서 약 650 mg/L 이하로 비교적 낮게 나타났는데, 이는 본 실험에서 사용했던 PM 생산배지가 최적화되지 않았을 뿐만 아니라, 플라스크 배양조건도 아직 최적화되지 않았기 때문인 것으로 판단된다. 일반적으로 이타콘산 생산에 있어서 배지 최적화 및 배양공정 확립이 매우 필요한데, 이는 공급된 탄소원이 세포성장으로 덜 이용되고, 가능한 한 이타콘산의 생합성 방향으로 많이 이용되도록 생산균주의 대사활동을 효율적으로 조절해 주어야 하기 때문이다(10). 본 실험결과 현재 사용 중인 생산배지의 전체적인 조성이 세포성장 쪽으로 맞추어져 있는 것으로 판단되며, 또

한 배양 중 pH의 지나친 감소 현상 (테이타 미세시)도 이타콘산의 생합성을 저해하고 있는 것처럼 보인다. 따라서 생산균주의 성장을 어느 정도 제한시킬 수 있을 뿐만 아니라, pH도 적정 수준을 유지할 수 있도록 생산배지를 최적화해주어야 하는 것이 이타콘산의 생산성 증가를 위해 무엇보다도 중요한 요인인 것으로 판단되었다(20). 한편 본 실험의 결과에 따라 이후의 생산배지 최적화 실험을 위한 성장배지로서 GM-D 배지조성을 이용하기로 최종 결정하였다.

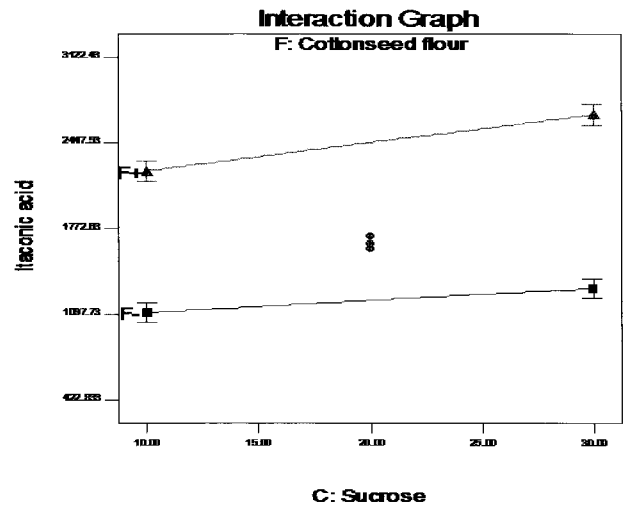


Fig. 4. The effects of sucrose and cottonseed flour on itaconic acid production.

OFAT (One Factor At a Time) 방법을 이용한 질소 원 및 탄소원 조사

통계적 배지 최적화 방법인 반응표면분석법을 통하여 이타콘산의 생산배지 조성을 최적화하기 위해서는 우선 어떠한 배지 성분들이 이타콘산 생산에 중요한 요인이 되는지를 살펴보아야 한다. 이를 위해서 여러 문헌을 참고해서 선정된 이타콘산 생산배지 (PM-1) 조성 (Glucose 80 g, (NH₄)₂SO₄ 4 g, MgSO₄ 2.1 g, KH₂PO₄ 0.11 g, trace element solution 1 ml, 증류수 1 리터)를 기본으로 하여 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인을 고정하여 실험하는 OFAT (one factor at a time)방법에 의해 다양한 탄소원과 질소원들을 조사하였다(Table 2).

80 g/L로 첨가한 탄소원들 가운데 이타콘산 생산에 효과가 큰 요인으로 glucose, fructose, sucrose, soluble starch 들을 찾을 수 있었고, 그 중에서도 sucrose와 glucose의 영향이 가장 큰 것으로 나타났다(Table 2). 한편 4 g/L로 첨가된 질소원 중에서는 soybean meal과 cottonseed flour (Pharmamedia)에서 가장 높은 생산성을 나타내었다. 특히 cottonseed flour에서 가장 높은 생산성을 보였는데, 이는 cottonseed flour에 높은 농도로 함량 되어 있는 Ca의 영향으로 생산성이 높아진 것으로 추측된다(21). 배지

구성요소들 가운데 성분 하나만 바뀌어도 생산성이 확연히 달라지는 것으로 보아 생산균주인 *A. terreus*에 의한 이타콘산의 생합성이 배지성분 및 농도와 매우 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 이타콘산의 생산성을 효과적으로 높이기 위해서는 무엇보다 생산배지의 최적화 연구가 우선적으로 이루어져 함을 알 수 있었다. OFAT 실험은 하나의 요인만을 변화시키고 다른 요인들은 고정시켜 실험을 수행하므로, 요인간의 상호작용이 고려되지 않아 최적의 결과를 도출하는데 근본적인 한계가 있다. 따라서 OFAT 방법으로 찾은 6가지 배지성분들에 대한 상호작용의 정도와 각 요인들의 주된 효과를 분석하기 위해 통계적 방법인 요인설계 (factorial design) 방법을 적용하였다.

Table 2. Itaconic acid production according to various carbon and nitrogen sources

Carbon sources	IA (mg ^l ⁻¹)	Nitrogen sources	IA (mg ^l ⁻¹)
glucose	2875	ammonium nitrate	273.98
fructose	722	peptonized milk	153
sucrose	3181	soytone peptone	919.36
maltose	608	casein enzyme hydrate	233.27
lactose	0	ammonium phosphate mo.	349.88
galactose	0	ammonium chloride	539.17
soluble starch	1208	yeast extract	178.76
glycerol	0	ammonium carbonate	321.13
sodium starch	0	soybean meal	1843.76
cottonseed oil	0	cottonseed enzymatic hydrolysate	1659.96
peanut oil	0	fish meal	465.11
olive oil	0	cottonseed flour	2550.78
proflo oil	0	soybean flour	1564.97
lard oil	379	pharmamedia	2270.15
wheat germ oil	0	corn steep solids	935.23
almond oil	0	skim milk	340.91
sunflower oil	0	ammonium sulfate	201.53
sesame oil	0	ammonium hydroxide	191.18
soybean oil	0	trytone	390.59
vegetable oil	0	ammonium tartrate	262.48
con oil	0	corn gluten meal	955.01
		ammonium phosphate di.	360.92
		malt extract	948.57

부분요인설계 (fractional factorial design)를 이용한 이타콘산 생산배지 최적화

많은 배지성분을 조사해서 중요한 인자를 가능한 한 신속하게 선별하기 위해서는 각 배지성분의 주된 효과와 각각의 상호작용에 대한 정보를 얻는 것이 중요하다. 특히 실험의 규모를 줄이면서 많은 요인에 대한 정보를 얻을 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이를 위해 본 연구에서는 우선적으로 2^m 요인설계법 실험의 1/2 반복 (2^{m-1}) 만을 실험하는 부분요인설계법을 적용하여 배지 최적화 연구를 수행하였다(22). 일차적으로 OFAT 실험의 결과 이타콘산 생산성에 가장 큰 영향을 줄 수 있는 6가지의 요인 (glucose(A), fructose(B), sucrose(C), soluble starch(D),

soybean meal(E), cottonseed flour(F))들의 상하한 값 (-1, 1)을 임의로 설정한 후(Table 3), 이들을 서로 조합한 후, 3개의 중점(0, 0)까지 포함하는 35 종류의 배양조건 (Table 4)에서 이타콘산의 생산성을 조사하였다.

Table 3. Definition and trial levels of factors in fractional factorial design

Factor	Variable	-1	0	1
A	Glucose (gl ⁻¹)	10	20	30
B	Fructose (gl ⁻¹)	10	20	30
C	Sucrose (gl ⁻¹)	10	20	30
D	Soluble starch (gl ⁻¹)	10	20	30
E	Soybean meal (gl ⁻¹)	2	4	6
F	Cottonseed flour (gl ⁻¹)	2	4	6

Table 4. Experimental matrix for the fractional factorial design

Exp.	A	B	C	D	E	F	IA(mgl ⁻¹)	Exp.	A	B	C	D	E	F	IA(mgl ⁻¹)
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1461.23	23	0	0	0	0	0	0	1652.22
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1838.99	24	-1	1	-1	1	-1	-1	422.833
3	1	1	1	1	-1	-1	1317.21	25	-1	-1	-1	-1	1	1	2275.4
4	-1	-1	1	1	-1	-1	528.398	26	1	1	-1	-1	1	1	2583.65
5	-1	1	1	-1	1	1	2877.24	27	0	0	0	0	0	0	1610.34
6	-1	1	-1	1	1	1	2644.52	28	-1	-1	1	1	1	1	2392.47
7	1	1	1	-1	-1	1	2142.78	29	1	1	-1	1	-1	1	1977.06
8	1	1	-1	-1	-1	-1	1177.95	30	-1	1	-1	-1	1	-1	1552.31
9	1	-1	-1	1	-1	-1	1052.67	31	-1	-1	-1	-1	-1	-1	716.245
10	1	-1	1	1	1	-1	1475.16	32	0	0	0	0	0	0	1709.6
11	-1	1	1	1	-1	1	3096.55	33	1	-1	-1	1	1	1	2835.57
12	1	-1	1	-1	1	1	2988.33	34	-1	1	1	1	1	-1	1551.22
13	-1	-1	1	-1	1	-1	1988.16	35	1	1	1	1	1	1	3122.43
14	-1	-1	-1	1	-1	1	2180.9								
15	1	1	-1	1	1	-1	1239.41								
16	1	-1	1	-1	-1	-1	1153.28								
17	1	-1	1	1	-1	1	2267.72								
18	-1	-1	1	-1	-1	1	2453.59								
19	1	1	1	-1	1	-1	1835.11								
20	-1	-1	-1	1	1	-1	1278.19								
21	1	-1	-1	-1	1	-1	1439.87								
22	-1	1	1	-1	-1	-1	575.36								

Table 5. Analysis of variance for the factors of the fractional factorial design

Factor	Effect	Sum of square	Mean square	F value	P value
A	153.286	1.880E+005	1.880E+005	9.61	0.0173
B	44.496	15839.15	15839.15	0.81	0.398
C	318.013	8.091E+005	8.091E+005	41.37	0.0004
D	20.1759	3256.52	3256.52	0.17	0.6954
E	607.266	2.950E+006	2.950E+006	150.86	0.0001
F	1239.69	1.229E+007	1.229E+007	628.68	0.0001
CF	124.959	1.249E+005	1.249E+005	6.39	0.0394
CE	-20.362	3316.98	3316.98	0.17	0.6928
EF	-69.66	38830.13	38830.13	1.99	0.2016
Fractional factorial model					0.0001
R-squared		0.9927			
C.V.		7.72			

Table 4에 제시한 바와 같이 다양한 실험조합에 따라 이타콘산의 생산량이 최저 422.83 mg/L에서 최고 3122.43 mg/L까지의 넓은 범위 내에 존재하는 것으로 나타났다. 이 결과를 fractional factorial model에 적용시켜 통계적으로 분석하였는데, 그 결과인 분산분석표 (Analysis of variance, ANOVA), effect list 및 각 요인들의 통계값을 Table 5에 제시하였다. 모델식의 P-value가 0.0001로 통계적으로 매우 유의한 범위에 있으며, 변수변화량 (CV)의 값은 7.72이므로 실험의 정확성과 신뢰도가 양호하며, R^2 은 0.9927로서 이타콘산의 실제값과 요인모델의 예상한 값이 거의 일치함을 확인할 수 있었다. 각 요인들인 배지성분들의 수준이 낮은 수준에서 높은 수준으로 변화했을 경우에 대한 각 요인들에 대한 effect를 살펴보면, 탄소원 중에서 sucrose(C)가 318.013으로서 이타콘산 생산성에 미치는 효과가 가장 컸고, 질소원 중에서는 cottonseed flour(F)가 1239.69로서 가장 높은 효과를 보였다. 상호작용에 대한 영향을 살펴보면 sucrose(C)와 soybean meal(E), soybean meal(E)과 cottonseed flour(F)의 두 조합에서 각각의 경우에 대한 effect가 -20.36, -69.669로서 이타콘산 생산성이 감소하는 부정적인 영향을 보인 반면, sucrose(C)와 cottonseed flour(F)의 조합에서는 124.959로서 긍정적인 영향이 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 통계적으로 매우 유의한 ($P < 0.01$) 요인들을 살펴보면 sucrose(C), soybean meal(E), cottonseed flour(F)로 나타났고, 이 3가지 요인 상호간의 상관관계에 있어서는 sucrose(C)와 cottonseed flour(F)의 교호작용만이 유의하고, 나머지 요인들 간의 교호작용은 통계적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다. 또한 sucrose(C)와 cottonseed flour(F)의 각각의 농도 변화가 이타콘산 생산성에 미치는 영향을 도식적으로 조사하였다. Fig.4에 제시한 바와 같이 sucrose(C)와 cottonseed flour(F)의 농도가 모두 증가함에 따라 이타콘산의 생산성이 함께 증가하는 것으로 예측되었다. 따라서 이 두 요인을 이타콘산 생산배지 최적화를 위한 탄소원과 질소원으로 최종 결정할 수 있었다.

전체요인설계 (full factorial design)을 이용한 이타콘산 생산배지 최적화

Fractional factorial design을 통해 6가지 중요한 배지 성분들 중에서 이타콘산 생산성 향상에 중요한 2가지 성분 (sucrose와 cottonseed flour)을 최종 결정할 수 있었다. 이 2가지 성분에 더하여 세포성장에 필수적인 배지성분인 인(P) 성분과 황(S) 성분을 최적량으로 공급하기 위해 KH_2PO_4 , $MgSO_4$ 성분의 농도를 다양하게 변화시키는 실험을 수행하였다. 즉 총 4가지의 배지성분 (sucrose(A), cottonseed flour, KH_2PO_4 (C), $MgSO_4$ (D))에 대하여 full factorial design 실험을 수행함으로써 각각의 성분들의 주된 효과와 상호영향을 조사해 보았다.

Table 6에 각 배지성분들의 level을 제시하였고, 각각의 실험조합 (배양조건)에 대한 이타콘산의 생산성을 Table 7에 나타내었다. 2번 조합에서 이타콘산 생산성이 2463 mg/L로서 가장 높았고, 7번 조합에서 가장 낮게 나타났다 (1057 mg/L). 이 두 조합을 비교해 보았을 때 두 조합 모두 sucrose(A)와 cottonseed flour(B)는 같은 농도로 첨가되었고, 단지 KH_2PO_4 (C)와 $MgSO_4$ (D)가 다른 농도로 첨가된 실험조합이다. 즉 생산성이 가장 높은 2번 조합에서는 $MgSO_4$ 와 KH_2PO_4 가 모두 낮은 농도이고, 7번 조합의 경우는 두 성분 모두 높은 농도로 첨가되었다. 이러한 배지조성의 차이로 인해 이타콘산의 생산성이 약 2.3배 정도로 큰 차이가 났음은 주목할 만하다.

Table 6. Definition and trial levels of factors in full factorial design

Factor	Variable	-1	0	1
A	Sucrose (g/l)	30	45	60
B	Cottonseed flour (g/l)	6	9	12
C	KH_2PO_4 (g/l)	3	4.5	6
D	$MgSO_4$ (g/l)	3	4.5	6

Table 7. Experimental matrix for the full factorial design and itaconic acid production for each experiment.

Exp.	A	B	C	D	IA (mg/l)
1	-1	-1	1	-1	1195
2	1	1	-1	-1	2463
3	1	-1	1	1	1156
4	-1	-1	-1	-1	1136
5	-1	-1	-1	1	1067
6	-1	1	1	-1	1851
7	-1	-1	1	1	1057
8	-1	1	-1	-1	2071
9	1	-1	-1	-1	1444
10	1	-1	-1	1	1299
11	1	1	1	1	1486
12	-1	1	1	1	1639
13	0	0	0	0	1609
14	-1	1	-1	1	1794
15	0	0	0	0	1600
16	1	-1	1	-1	1340
17	1	1	1	-1	1858
18	1	1	-1	1	2009

더욱 자세히 분석하기 위해 상기의 18 가지의 배양조건에서 얻은 결과를 full factorial model에 적용시켜 통계분석한 결과를 Table 8에 제시하였다. Full factorial model에 대한 P-value는 < 0.0001 로 통계적으로 매우 유의한 것으로 확인되었고, R^2 이 0.9972로 실제 실험값과 요인 모델이 예상한 값과 거의 일치하는 것으로 나타났다. 각각의 배지성분들의 level이 낮은 수준에서 높은 수준으로 이동할 때 이타콘산 생산성에 미치는 영향을 살펴보면, sucrose와 cottonseed flour가 각각 155.62, 684.56

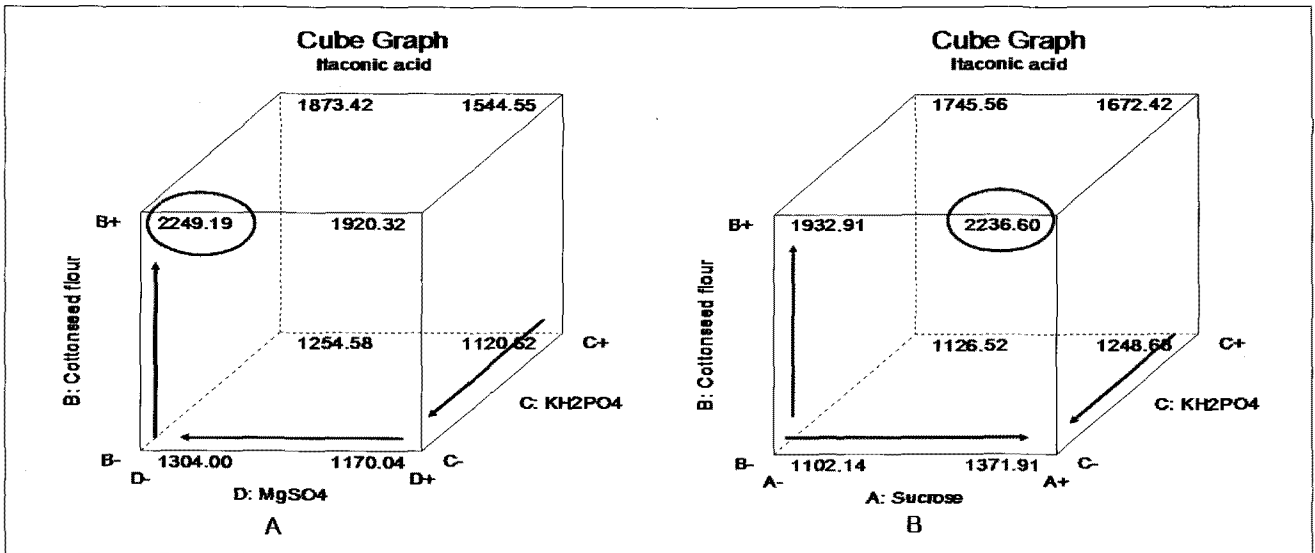


Fig. 5. Cube graphs showing the effects of (A) cottonseed flour, MgSO₄ and KH₂PO₄ and (B) cottonseed flour, sucrose and KH₂PO₄ on itaconic acid production.

로서 긍정적인 효과를 보인 반면, KH₂PO₄와 MgSO₄에서는 각각 -212.6, -231.42로서 부정적인 것으로 나타났다. 한편 배지성분 상호간의 영향은 모든 실험조합에서 부정적으로 나타났다. 본 실험에서 sucrose(A), cottonseed flour(B), KH₂PO₄(C)와 MgSO₄(D) 요인들의 변화에 따른 이타콘산 생산량(Y)에 대한 최종 모델식을 다음과 같이 얻을 수 있었는데, 적합결여검증 test 결과, 1차항은 P<0.01로서 모든 요인들이 유의하였으며, 요인 상호간의 교차항에 있어서는 AB 항만이 유의성이 있으며 나머지 항들은 모두 유의성이 없는 것으로 나타났다.

$$Y = 1554.59 + 77.81A + 342.28B - 106.3C - 115.71D - 20.17AB - 65.55AC - 28.59AD - 81.59BC - 48.73BD$$

Table 8. Analysis of variance for the full factorial design factor

Factor	Effect	Sum of square	Mean square	F value	P value
A	155.62	96871.89	96871.89	80.36	0.0001
B	684.56	1.874E+006	1.874E+006	1555.32	<0.0001
C	-212.6	1.808E+005	1.808E+005	149.98	<0.0001
D	-231.42	2.142E+005	2.142E+005	177.70	<0.0001
AB	-40.34	6511.28	6511.28	5.40	0.0591
AC	-131.1	68758.02	68758.02	57.04	0.0003
AD	-57.18	13075.35	13075.35	10.85	0.0165
BC	-163.18	1.065E+005	1.065E+005	88.35	<0.0001
BD	-97.46	37988.03	37988.03	31.51	0.0014
Full factorial model					<0.0001
R-squared		0.9972			
C.V.		2.23			

Fig. 5에 이 4가지 배지성분들의 농도 변화에 따른 이타

콘산 생산성의 변화 정도를 cube graph를 이용하여 나타내었다. Fig. 5(A)로부터 KH₂PO₄와 MgSO₄는 모두 낮은 농도로, cottonseed flour는 높은 농도로 배지에 첨가되어야 이타콘산의 생산성이 증가함을 알 수 있었고, Fig. 5(B)로부터 sucrose와 cottonseed flour는 높은 농도로 첨가되어야 하지만, KH₂PO₄의 농도는 낮아져야 이타콘산의 생산성이 증가한다는 것을 관찰할 수 있었다.

최급상승법 (steepest ascent method)(SAM)을 이용한 이타콘산 생산배지 최적화

이타콘산의 생산농도가 최고인 값을 나타내는 최고점까지 가는 길은 많겠지만 가장 빨리 접근할 수 있는 길은 가장 가파른 경사도를 보여주는 길이 될 것이다 (steepest ascent method, SAM). 따라서 상기의 full factorial 실험에서 얻은 1차모델식을 근거로 하여 가장 가파른 경사도를 보여주는 기울기를 구하여, 이타콘산의 생산성이 최대를 보여주는 근사적인 지점을 찾고자 상기의 4가지 요인 (sucrose, cottonseed flour, KH₂PO₄, MgSO₄)을 이용하여 축차실험 (sequential experiments)을 수행하였다(19). Table 9에 최급상승법 (SAM) 실험을 수행하기 위한 실험 설계표를 나타내었고, Table 10에 각 배지성분들의 수준 변화에 따른 축차 배양조건과 이타콘산의 생산성을 제시하였다. 상기의 full factorial design의 중심점을 최급상승법의 시작점으로 하여 생산배양을 수행하였는데, 그 결과 sucrose와 cottonseed flour는 농도가 증가함에 따라 이타콘산의 생산성이 증가하는 경향을 보였고, 반면 KH₂PO₄와 MgSO₄는 두 가지 모두 농도가 감소할 때 이타콘산의 생산성이 증가하는 것으로 관찰되었다. 특히 Table 10에서 KH₂PO₄와 MgSO₄의 농도가 0이었을 때 이타콘산의

생산성이 가장 높았음은 주목할 만한데, 이로부터 이 두 가지 요인이 *A. terreus*의 이타콘산 생합성을 뚜렷하게 저해하고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

Table 9. Experimental design of the steepest ascent method (SAM) for medium optimization

Items	Sucrose (g/l)	Cottonseed flour (g/l)	KH ₂ PO ₄ (g/l)	MgSO ₄ (g/l)
Center point	45	9	4.5	4.5
Origin step	15	3	1.5	1.5
Main effect	155.62	684.56	-212.6	-231.41
Coefficient	77.81	342.28	-106.3	-115.71
Slope	3.12	13.74	-4.26	-4.64
New step	46.86	41.23	-6.4	-6.96
New step/10	+4	+4	-0.6	-0.6
New step/20	+2	+2	-0.3	-0.3

Table 10. 4-factor experimental matrix for the steepest ascent method (SAM) and itaconic acid production for each experiment

Exp.	sucrose (g/l)	cottonseed flour (g/l)	KH ₂ PO ₄ (g/l)	MgSO ₄ (g/l)	IA (mg/l)
0	45	9	4.5	4.5	863
1	47	11	4.2	4.2	1076
2	49	13	3.9	3.9	1348
3	51	15	3.6	3.6	1430
4	53	17	3.3	3.3	1436
5	55	19	3	3	1500
6	57	21	2.7	2.7	1557
7	59	23	2.4	2.4	1644
8	61	25	2.1	2.1	1729
9	63	27	1.8	1.8	1782
10	65	29	1.5	1.5	1915
11	67	31	1.2	1.2	1928
12	69	33	0.9	0.9	2217
13	71	35	0.6	0.6	2634
14	73	37	0.3	0.3	2899
15	75	39	0	0	3380

상기 결과에 근거해서 이번에는 KH₂PO₄와 MgSO₄ 두 요인인 배지성분으로 첨가하지 않은 채로, 다른 두 요인인 sucrose와 cottonseed flour 만을 첨가하여 최급상승법에 의한 축차실험을 수행하였다. 그 결과를 Table 11에 제시하였는데, 4번 배지조건에서 이타콘산 생산성이 4235 mg/l로 가장 높게 나타났고, sucrose와 cottonseed flour가 4번 실험조건 이상으로 첨가될 경우에는 이타콘산의 생산성이 점차 감소하는 것으로 관찰되었다.

반응표면분석법 (RSM)을 적용한 이타콘산 생산배지 성분의 농도 최적화

상기의 최급상승법 실험에 의해 이타콘산 생산배지 성분들의 최적 농도를 근사적으로 찾을 수 있었다(Table

11의 4번 배지조건). 따라서 이 부근에서 통계적 반응표면분석 (response surface method, RSM)을 적용하여 생산 배지를 최적화시키기 위하여 2개의 중요한 요인인 sucrose와 cottonseed flour를 이용하여 중심합성계획 (central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 반응표면분석의 목적은 독립변수인 배지성분의 각각의 농도 변화에 따라 종속변수인 이타콘산 생산성이 어떻게 영향을 받는가를 설명해주는 함수관계를 구함으로써, 이타콘산 생산성이 최대가 되는 각 배지성분들의 최적 농도를 찾고자 함이다. 본 실험에서는 Table 12에 제시한 바와 같이 -1(low)과 +1(high) level사이의 실제 농도의 차이가 10 g/l가 되도록 중심합성계획을 설계하였다. 한편 각 배지성분의 농도 변화에 따른 이타콘산 생산농도의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 2차 회귀모형식을 사용하였다. 중심합성계획에 사용된 실험중점은 상기 실험인 최급상승법을 통해 얻은 최적 배지조합인 sucrose 91 g/l와 cottonseed flour 55 g/l를 이용하였다. 독립변수인 sucrose 농도와 cottonseed flour 농도에 대해 (-a, -1, 0, 1, a)등 5단계로 부호화하고, 13가지 종류의 실험조건을 결정하였다(Table 13). 즉 5개의 중심점 (0, 0)과 4개의 축점 ((-a, 0), (a, 0), (0, -a), (0, a)), 그리고 4개의 요인실험점 ((-1, 1), (1, 1), (1, -1), (-1, -1))을 설정하였다.

Table 11. 2-factor experimental matrix for the steepest ascent method (SAM) and itaconic acid production for each experiment

Exp.	sucrose (g/l)	cottonseed flour (g/l)	KH ₂ PO ₄ (g/l)	MgSO ₄ (g/l)	IA (mg/l)
0	51	15	0	0	2811
1	61	25	0	0	3230
2	71	35	0	0	3724
3	81	45	0	0	3920
4	91	55	0	0	4235
5	101	65	0	0	4107
6	111	75	0	0	3983
7	121	85	0	0	3775
8	131	95	0	0	3766
9	141	105	0	0	3000
10	151	115	0	0	2811
11	161	125	0	0	2236
12	171	135	0	0	1906
13	181	145	0	0	1609
14	191	155	0	0	1455
15	201	165	0	0	1320

Table 12. Coding and assigned concentrations (g/l) of the variables of different levels of central composite design ($\alpha=1.415$)

Factor	Coded levels				
	-a	-1	0	1	a
Sucrose	83.93	86	91	96	98.07
Cottonseed flour	47.93	50	55	60	62.07

Table 13. Experimental matrix of the central composite design (CCD) and itaconic acid production for each experiment

No.	Sucrose (g/l)	Cottonseed flour (g/l)	IA (mg/l)
1	0	0	4300
2	0	0	4256
3	0	-a	3355
4	-a	0	3841
5	-1	-1	3891
6	1	1	3485
7	0	a	2803
8	1	-1	3679
9	a	0	3407
10	-1	1	2854
11	0	0	4147
12	0	0	4467
13	0	0	4500

Table 13에 중심합성계획법에 의해 수행된 배양결과인 각각의 배지조합에 대한 이타콘산의 생산성을 제시하였다. 탄소원인 sucrose를 83.93~98.07 g/l, 질소원인 cottonseed flour를 47.93~62.07 g/l의 다양한 배지조건에서 실험한 결과, 이타콘산의 생산성이 2803~4500 mg/L 범위인 것으로 관찰되었다. 이상의 실험에 의해 얻어진 이타콘산의 생산농도를 중심합성계획법에 의해 선정된 이차함수의 형태로 표현하였다. 이차다항식의 각 항에 대한 회귀계수는 Design-Expert 6.0 S/W을 사용하여 다중 회귀분석 하였는데, 그 결과 얻어진 최종 모델식은 다음과 같다. 여기서 A는 sucrose, B는 cottonseed flour을 의미하며, AB는 이들 성분 간의 교호작용을 의미한다.

Y = Itaconic acid

$$\text{생산량} = 4334.7 - 24.4A - 251.2B - 323.4A^2 - 596B^2 + 210.9AB$$

Table 14. Analysis of variance for the response surface quadratic model

Factor	Sum of square	Mean square	F value	P value
A	4772.38	4772.38	0.12	0.7389
B	5.052E+005	5.052E+005	12.74	0.0091
A ²	7.278E+005	7.278E+005	18.35	0.0036
B ²	2.472E+006	2.472E+006	62.33	<0.0001
AB	1.779E+005	1.779E+005	4.49	0.0719
CCD model				0.0007
R-squared		0.9282		
C.V.		5.28		

이 모델식의 특성을 Table 14의 분산분석표를 통해 살펴보면 P-value는 0.0007로서 통계적으로 매우 유의하다는 것을 알 수 있다. 또한 요인변화량 (CV)의 값이 5.2로 실험의 정확성과 신뢰도가 높으며, R²는 92%로서 이타콘산의 생산성에 대한 실험값과 모델식이 예측한 값이

거의 일치한다는 것을 확인할 수 있었다. 본 모델식을 이용하여 두 성분의 최적 조합을 찾기 위해 3차원 반응표면분석을 수행한 결과인, sucrose와 cottonseed flour의 농도 변화에 따른 이타콘산의 생산성 변화경향을 Fig. 6에 나타내었다. 이타콘산의 최적 생산조건은 sucrose 90.43 g/l, cottonseed flour 53.84 g/l인 것으로 파악되었고, 이 지점에서의 이타콘산의 생산성은 4360 mg/l로 예측되었다. 주목할 점은 반응표면분석에 의해 추정된 배지성분의 최적 농도가 앞서 실험한 최급상승법의 측차실험을 통해 근사적으로 얻은 최적 조건과 별로 다르지 않다는 사실인데, 이로부터 배지성분의 농도 최적화를 위해 선행 적용한 최급상승법 실험이 매우 효과적이었음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 통계적 배지 최적화 작업을 체계적으로 수행한 결과, 탄소원 (C-source)인 sucrose와 질소원 (N-source)인 cottonseed flour 간의 C/N 비율 (ratio)이 이타콘산의 생산성에 큰 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었으며, 이 비율을 통계적으로 최적화한 결과 이타콘산의 생산성이 초기 배지 조건에 비해 약 7배 정도 증가한 최적의 생산배지 조성을 결정할 수 있었다.

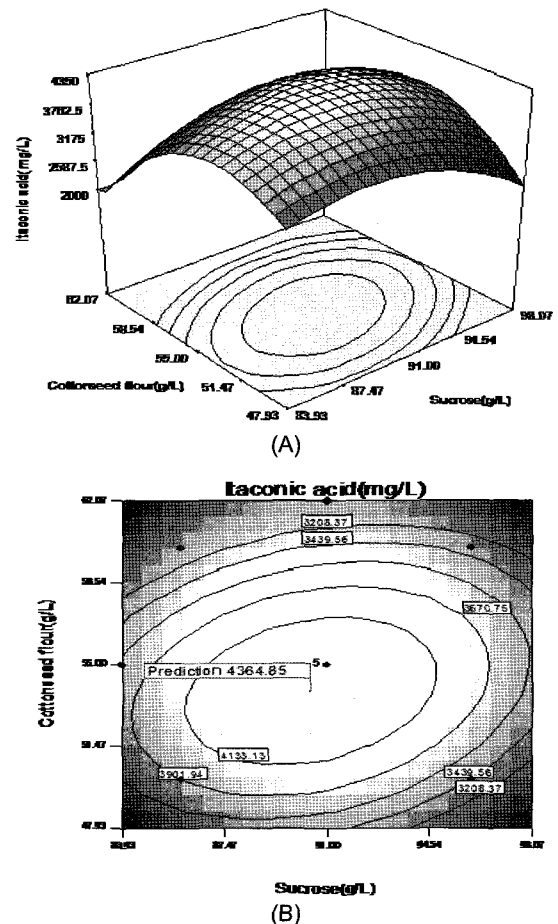


Fig. 6. Itaconic acid production represented as (A) 3-D response surface and (B) contour plot as a function of the concentration of sucrose and cottonseed flour.

요 약

*Aspergillus terreus*에 의한 이타콘산 생산 발효공정에서 생산균주의 성장을 어느 정도 제한시킴으로써 배양생리학적 특성이 이타콘산 생합성 쪽으로 치우치도록 통계적 방법을 적용하여 itaconic acid의 생산배지 조성을 최적화하는 연구를 수행하였다. 이타콘산은 TCA 회로를 거쳐 합성된 cis-aconitic acid의 디카르복실화 반응에 의해 생합성되는 고부가 화학원료물질이다. 우선 One factor at a time (OFAT) 방법을 이용하여 이타콘산의 생산성 증가에 크게 영향을 미치는 중요한 탄소원들로 sucrose, glucose, fructose와 soluble starch를 확인할 수 있었고, 질소원 들로는 cottonseed flour와 soybean meal을 찾을 수 있었다. Fractional factorial design을 통하여 이들 6가지 요인들 간의 상호작용의 정도를 확인한 결과 sucrose와 cottonseed flour간의 상호작용의 정도가 가장 컸고, 나머지 요인들 간의 상호작용의 정도는 작거나 혹은 이타콘산 생산에 오히려 부정적인 결과를 나타냈다. 또한 full factorial design (FFD) 실험을 통해 생산배지에 KH_2PO_4 와 MgSO_4 가 과량 첨가되면 이타콘산의 생산성이 심각하게 저해됨을 알 수 있었다. FFD의 1차모델식을 근간으로 하여 최급 상승법 (steepest ascent method, SAM)을 적용하여 sucrose, cottonseed flour, KH_2PO_4 및 MgSO_4 의 최적 농도로 향하는 가장 가파른 기울기를 구함으로써, 신속하고 효율적으로 최적 농도지점에 대한 정보를 얻을 수 있었다. SAM이 제시해주는 농도 부근에서 반응표면분석 (response surface method, RSM)을 적용하여 각 배지성분의 농도를 최적화시키기 위해, 2개의 중요한 요인인 sucrose와 cottonseed flour를 이용하여 중심합성계획 (central composite design, CCD) 실험을 수행하였다. 그 결과 이타콘산의 최적 배지 조건은 sucrose 90.4 g/L, cottonseed flour 53.8 g/L인 것으로 관찰되었고, 이 농도에서 이타콘산의 생산성은 초기 사용된 배지에서의 생산성에 비해 약 7배 증가한 4360 mg/l로 나타났다. 이로부터 탄소원 (C)으로 사용한 sucrose와 질소원 (N)으로 사용한 cottonseed flour 간의 C/N 비율이 이타콘산의 생산성에 큰 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국에너지관리공단 (Energy Technology Innovation Project), 2단계 BK21 사업, 강원대학교 생명공학연구소의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 1월 14일, 게재승인 : 2009년 2월 23일

REFERENCES

1. Kobayashi, T. and Nakamura, I. (1964), Dynamic in mycelial concentration of *Aspergillus terreus* K26 in steady state of continuous culture, *J. Ferment. Technol.* **44**, 264-274.
2. Naihu, J. and Wang, S. S. (1986), Continuous itaconic acid production by *Aspergillus terreus* immobilized in a porous disk bioreactor, *Appl. Micro. Biotechnol.* **23**, 311-314.
3. Kokufuta, E., Suzuki, S., and Nakamura, I. (1988), Flocculation of *Aspergillus terreus* with polyelectrolyte complex and production of itaconic acid with the flocculate mycelia, *J. Ferment. Technol.* **60**, 433-439.
4. Reddy, C. S. and K., R. P. Singh (2002), Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated *Aspergillus terreus* SKR 10, *Bioresour. Tech.* **85**, 69-71.
5. Bressler, E. and S. Braun (2000), Conversion of citric acid to itaconic acid in a novel liquid membrane bioreactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **75**, 66-72.
6. Jaklitsch, W. M., C. P. Kubick, and M. C. Scrutton (1991), The subcellular organization of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*, *J. Gen. Microbiol.* **137**, 533-539.
7. Winskill, N. (1983), Tricarboxylic acid cycle activity in relation to itaconic acid biosynthesis by *Aspergillus terreus*, *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2877-2883.
8. Bentley, R. and Thiessen, C. P. (1939), Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. I. Tracer studies with ^{14}C -labeled substrates, *J. Biol. Chem.* **226**, 673-687.
9. Bentley, R. and Thiessen, C. P. (1957), Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. II. Early stages in glucose dissimilation and the role citrate, *J. Biol. Chem.* **226**, 689-701.
10. Eimhjillen KE and Larsen H. (1955), The mechanism of itaconic acid formation by *Aspergillus terreus*. II. The effect of substrates and inhibitors, *Biochem.* **60**, 139-147.
11. Kautola, H., Vassilev, N., and Linko, Y.-Y. (1989), itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* on sucrose medium, *Biotechnol. Lett.* **11**, 313-318.
12. Kautola, H., Rymowicz, W., Linko, Y.-Y., and Linko, P. (1991), itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* with varied metal addition, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 154-158.
13. Kautola, H., Vahvaselka, M., Linko, Y.-Y., and Linko, P. (1985), itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose and glucose, *Biotechnol. Lett.* **7**, 167-172.
14. Rychtera, M. and D. A. J. Wase (1981), The growth

- of *Aspergillus terreus* and the production of itaconic acid in batch and continuous cultures. The influence of pH, *J. Chem. Biotechnol.* **31**, 509-521.
15. Box, G. E. P. and J. S. Hunter (1957), Multifactor experimental design for exploring response surface, *Ann. Math. Stat.* **28**, 195-242.
 16. Cochran, W. G. and G. M. Cox. (1957), Experimental design, John Wiley & Sons Inc., New York, U.S.A., 335-375.
 17. Box GEP and Hunter JS (1978), Fractional factorial design at two levels. In: Statistics for experimenters. New York: John Wiley & Sons, 374-418.
 18. J. A. Cornell (1990), Experiments with mixtures, designs, models and the analysis of mixture data, 2nd edn., Wiley, New York.
 19. Kleijnen, J. P. C., den Hertog, D., and Angun, E. (2004), Response surface methodology's steepest ascent and step size revisited, *European Journal of Operational Research* **159**, 121-131.
 20. Dowlathabad MuralidharaRao, S. M. D. Jaheer Hussain, V. Pandu Rangandu, K. Subramanyam, G. Sivarama Krishna and A. V. N. Swamy (2007), Fermentative production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* using Jatropha seed cake, *African Journal of Biotechnology* **6**, 2140-2142.
 21. <http://www.calorie-count.com/calories/item/12007.html>
 22. Aracil, J. (1997), Use of Factorial design of Experiments in the determination of Adsorption Equilibrium constants: Methyl Iodide on charcoals, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **38**, 143-151.