

흐름주입분석기술에 의한 푸마르산과 숙신산의 모니터링 기술 개발

손 옥 재^{1,3} · 김 춘 광^{1,3} · 이 종 일^{2,3*}
전남대학교, 물질·생물화학공학과¹, 응용화학공학부², 생물공정기술연구실³
(접수 : 2003. 6. 20. 게재승인 : 2003. 10. 25.)

Development of On-line Monitoring Techniques for Fumaric Acid and Succinic Acid by Flow Injection Analysis

Ok-Jae Sohn^{1,3}, Chun-Kwang Kim^{1,3}, and Jong Il Rhee^{2,3*}

¹Department of Material and Biochemical Engineering, ²Faculty of Applied Chemical Engineering,

³Bioprocess Technology Lab., Chonnam National University, GwangJu 500-757, Korea

(Received : 2003. 6. 20. Accepted : 2003. 10. 25.)

On-line monitoring techniques for fumaric acid and succinic acid were developed by flow injection analysis (FIA). For the determination of fumaric acid, two enzymes, fumarase and malic dehydrogenase were immobilized on VA-epoxy Biosynth E3-carrier and integrated into a FIA-system with a fluorescence detector. For the analysis of succinic acid, isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase were also immobilized on VA-epoxy polymer support and used in a FIA system. The immobilized enzymes in two FIA systems were characterized systematically, e.g. optimum pH and temperature, inhibitory effects etc. Two FIA systems were also used to on-line monitor the concentrations of fumaric acid and succinic acid in biotechnological processes. Good agreement between on-line monitored data and off-line data measured by HPLC showed extensive application of the FIA systems in bioprocesses.

Key Words : Flow injection analysis, fumaric acid, succinic acid, bioprocess

서 론

최근 유전공학의 발전과 더불어 생물 산업의 성장이 꾸준히 이루어지고 있으며 기존의 석유화학기술에 의존하여 생산해오던 물질들을 생물공학기술을 통해 생산하고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다. 각종 생물제품을 생산하는 생물공정의 생산성 향상을 위해 균주 개발, 배지조성의 최적화뿐만 아니라 공정 모니터링 기술에 대한 연구의 필요성이 크게 대두되었다(1). 특히, 생물 공정에서 온라인 모니터링은 공정의 개선, 모델링과 효율적인 제어를 가능하게 하였다(2-3). 생물공정의 온라인 모니터링을 위해 짧은 시간 내에 많은 시료를 자동으로 분석할 수 있는 흐름주입분석 (Flow Injection Analysis; FIA) 기술 개발이 국내외에서 활발히 진행되고 있다(1-4). 특히 생물공정 내 각종 기질이나 생산물의 모니터링을

위해 효소를 이용한 FIA 시스템이 개발되어지고 있다(5-6). 본 연구에서는 각종 미생물에 의해 생산되는 유기산 중 공업적으로 그 중요성이 날로 더해가고 있는 푸마르산과 숙신산을 온라인 모니터링하기 위한 흐름주입분석 기술을 개발하고자 한다.

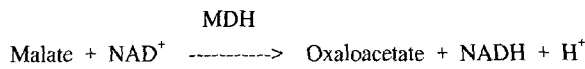
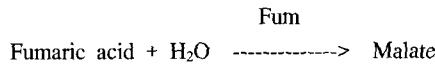
FIA 기술을 이용한 푸마르산 또는 숙신산의 모니터링에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았는데 Almuaid가 푸마르산으로부터 L-형 말릭산을 생산하기 위하여 fumarase를 CPG (controlled pore glass)에 고정화한 후 생산된 L-형 말릭산의 농도를 FIA 시스템을 이용하여 측정하였다(7). Tsukatani 등은 식료품 내 존재하는 숙신산을 분석하기 위하여 isocitrate lyase와 isocitrate dehydrogenase를 APCPG (aminopropyl-controlled pore glass)에 고정화한 효소 반응기를 이용하여 흐름주입분석 기술을 개발하였다(8).

본 연구에서는 푸마르산 생산을 위한 생물공정의 온라인 모니터링을 위해 fumarase (Fum)와 malic dehydrogenase (MDH)를 epoxy 고분자 담체에 고정화한 효소 반응기를 개발하였고 이를 FIA 시스템에 결합하였다. 두 효소 (Fum과 MDH)를 이용한 푸마르산의 측정원리는 아래와 같다.

* Corresponding Author : Bioprocess Technology Lab., Chonnam National University, GwangJu 500-757, Korea

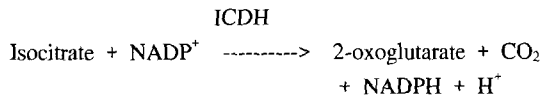
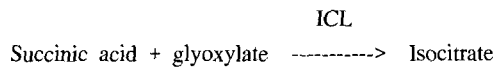
Tel : +82-62-530-1847, Fax : +82-62-530-0846

E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr



위의 반응에서 푸마르산이 Fum의 수화작용에 의해 말릭산으로 전환된 후 말릭산은 MDH와 조효소로 첨가되는 NAD⁺에 의해 산화되어 옥살산과 NADH로 전환된다(7).

한편, 숙신산은 미생물 대사회로중의 하나인 글리옥실산 회로에서 isocitrate lyase(ICL)의 존재하에 글리옥실산과 반응하여 이소시트르산으로 전환된다(8). 생성된 이소시트르산은 isocitrate dehydrogenase(ICDH)에 의해 조효소인 NADP⁺와 함께 산화되어 2-옥소글루타르산으로 전환되며 반응식은 아래와 같다.



위에 언급한 두 종류의 반응식에서 각각 생성된 NADH와 NADPH의 양은 형광분광도계를 사용하여 excitation wavelength 340 nm/emission wavelength 440 nm에서 형광세기를 측정하여 분석할 수 있고 푸마르산과 숙신산의 농도와 상관 지을 수 있다.

본 연구에서는 생물공정내 푸마르산과 숙신산의 농도를 온라인 모니터링하기 위해 Fum, MDH, ICL 그리고 ICDH를 에폭시 고분자 담체에 고정화한 소형효소반응기를 개발하고자 한다. 즉 고정화 효소 반응기를 사용하여 푸마르산-FIA

와 숙신산-FIA 시스템을 구성하고 고정화 효소의 특성을 연구하며 생물공정에서 푸마르산과 숙신산의 농도를 온라인 모니터링 하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 효소

본 연구에서 사용한 효소는 fumarase (EC.1.8.1.4, from Porcine heart), malic dehydrogenase (EC.4.3.1.2, from Bovine heart), isocitrate lyase (EC.4.1.3.1, from *Bacillus stearothermophilus*) 그리고 isocitrate dehydrogenase (EC.1.1.1.42, from Porcine heart)로써 Sigma사에서 구입하였다. 고정화 담체로는 VA-Epoxy E3-Biosynth™ (50 μm, pore volume; 1.3 mL/g, bulk density; 0.32 g/mL, Riedel-Haen Co., Germany)를 사용하였다. 그 외의 시약은 Sigma사 등에서 구입한 분석용 화학제품을 사용하였다.

효소의 고정화

본 연구에서 사용하고자 하는 효소, Fum, MDH, ICL, ICDH는 에폭시 고분자 담체에 각각 고정화 하였다. 각 효소를 고정화하기 위해 우선 주어진 활성을 가진 효소액 40 μL를 360 μL의 인산완충용액 (pH 7.0, 1 M)과 함께 혼합한 후 100 mg의 에폭시 고분자 담체에 첨가하였다. 그리고 4 °C에서 18시간 동안 반응시킨 후 푸마르산 또는 숙신산 분석을 위한 효소반응의 순서에 따라 고정화된 효소를 소형 용기(1 mL, Mobitec Co., Germany) 안에 적재하였는데 두 종류의 고정화 효소가 혼합되지 않도록 중간에 필터 (직경; 6.8 mm, 공극직경; 90 μm)를 사용하였다. 적재 후 고정화되지 않은 효소는 인산완충용액으로 여러 번 세척하여 흘려보냈고 효소 반응기는 FIA장치에 결합하여 사용할 때까지 4°C에 보관하였다(4).

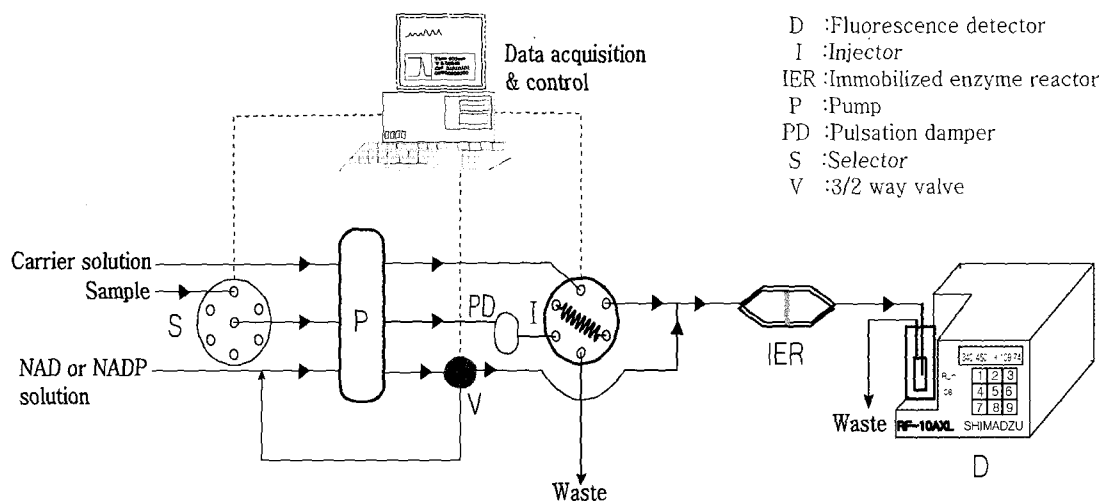


Figure 1. Schematic diagram of a FIA system for the determination of fumaric acid or succinic acid with immobilized enzymes.

FIA 시스템

푸마르산-FIA 시스템과 숙신산-FIA 시스템의 장치구성을 Fig. 1에 나타내었다. 각 FIA 시스템에서 소형 효소반응기는 시료주입기와 형광분광광도계 (Simadzu Co., Japan) 사이에 설치하였다. 시료는 운반용액의 흐름에 의해 주입되며 일정량의 NAD^+ 또는 NADP^+ 용액과 효소반응기에서 혼합되도록 하였다. 효소반응기내에서 반응에 의해 생성된 NADH 또는 NADPH 는 형광분광광도계 (flow-through cell; 25 μL)에 의해 excitation wavelength 340 nm/emission wavelength 440 nm에서 검출하였다. 또한 FIA 시스템의 데이터 처리 및 제어를 위해 LabVIEW 6.1 (National Instrument Co., USA) 소프트웨어를 이용하여 프로그램 하였고 신호 처리를 위해 NI PCI-6024 (National Instrument Co., USA)를 사용하였다. 그리고 각 FIA 시스템을 운전하기 위한 표준조건들은 Table 1에 나타냈으며 특별한 언급이 없으면 표준조건에 의해 실험을 수행하였다.

Table 1 (a). Reference operating conditions of a FIA system for fumaric acid

Parameter	Values
Carrier flow rate (mL/min)	1.0
Sample	
flow rate (mL/min)	0.3
injection volume (μL)	75
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	room temperature
Activity of enzymes immobilized (U)	3.5 U (fumarase) 40 U (malic dehydrogenase)
NAD^+ solution	
concentration (mM)	1.0
flow rate (mL/min)	1.0
addition time (sec)	50
Cycle time (sec)	300
Recording frequency (Hz)	1.00

Carrier buffer solution (pH 9.0): 4.35 g/L K_2HPO_4 , 1.8 g/L NaH_2PO_4 , 3.0 g/L NaCl, 4.0 mL/L hydrazine

Enzyme unit represents the amount of enzymes added initially to epoxy carrier support.

Table 1 (b). Reference operating conditions of a FIA system for succinic acid

Parameter	Value
Carrier flow rate (mL/min)	1.5
Sample	
flow rate (mL/min)	0.3
injection volume (μL)	125
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	room temperature
Activity of enzymes immobilized (U)	5 U (ICL) 40 U (ICDH)
NADP^+ solution	
concentration (mM)	1.0
flow rate (mL/min)	1.0
addition time (sec)	50
Cycle time (sec)	300
Recording frequency (Hz)	1.0

Carrier buffer solution (pH 9.0): 4.35 g/L K_2HPO_4 , 1.8 g/L NaH_2PO_4 , 3.0 g/L NaCl, 5 mM glyoxylate, 0.1 mM cysteine, 2.0 mL/L hydrazine

Enzyme unit represents the amount of enzymes added initially to epoxy carrier support.

생물공정의 모니터링

Rhizopus oryzae KCTC 6946 (Korean Collection for Type Cultures)의 배양을 위해 7.5 L 발효조 (KoBiotech Co., Korea)를 이용하였으며 5.0 L의 발효 부피로 35 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. *Rhizopus oryzae* KCTC 6946에 의해 생산된 푸마르산의 농도를 본 연구에서 개발된 푸마르산-FIA 시스템을 이용하여 온라인 모니터링하였고 오프라인 시료는 HPLC (High Performance Liquid Chromatography: Waters Model-486 UV detector at 210 nm, Aminex HPX-87H ion-exclusion column at 35 $^{\circ}\text{C}$, a carrier solution of 0.008 N H_2SO_4 with 0.6 mL/min, sample injection volume of 25 μL)에 의해 분석하였다. 발효 배지는 (g/L): glucose, 50.0; NH_4SO_4 , 0.5; KH_2PO_4 , 0.25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01, trace element 용액 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 24 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g/L)를 사용하였다. 발효액의 pH는 3 M HCl 용액과 3 N NaOH 용액을 사용하여 5.5로 조절하였다. 한편, FIA 시스템에 주입할 시료로써 cell free 배양액을 얻기 위해 0.2 μm 의 polypropylene microfiltration tubular 샘플링 모듈 (ABC Co., Germany)을 사용하였다.

결과 및 고찰

푸마르산-FIA 시스템의 특성

고정화 효소 Fum/MDH를 적재한 소형 반응기를 푸마르산-FIA 시스템에 결합하여 고정화 효소의 조작 안정성 (operational stability)을 살펴보았다. Table 1(a)과 같은 표준 조건에서 분석시료로 0.5 g/L의 푸마르산 용액을 반복, 주입하여 210회 (약 18시간) 정도 측정하는 동안 피크의 높이가 천천히 감소하여 초기 피크 높이의 87%에 이르렀다. 그러나 고정화 효소를 4 $^{\circ}\text{C}$ 냉장 보관했을 때 효소의 활성은 10일 경과 후에도 초기값의 95% 이상을 유지하였다.

한편, FIA 시스템의 조작시 효소 반응기의 성능은 운반용액의 조건, 즉 pH, 온도 등에 의해 영향을 받는다. 따라서 고정화 효소의 활성을 최대로 할 수 있는 운반용액의 pH를 조사하는 것은 매우 중요하다. 균주에서 분리, 정제된 효소, Fum와 MDH의 최적 pH는 7.5-8.5인 것으로 보고 되고 있다 (13). 그러나 Almuaibed의 연구에서 고정화된 Fum와 MDH의 최적 pH가 10-11로 이동하는 것을 알 수 있었다(7). 또한 Rhee등은 자일리톨의 분석을 위해 xylitol oxidase (XYO)를 예폭시 고분자 담체에 고정화 하였는데 고정화 효소, XYO의 최적 활성조건은 pH가 알칼리 영역인 8.5 부근에서 나타났다 (4). 따라서 운반용액의 pH에 따른 고정화 효소 Fum/MDH의 활성 변화를 조사하기 위해 용액의 pH 범위를 6.0-10.5까지 변화하여 실험하였다. 운반용액의 pH는 Table 1(a)에 나타난 표준완충용액에 5 M HCl이나 5 N NaOH를 사용하여 조절하여 실험에 사용하였는데 고정화 효소 Fum/MDH의 활성은 Fig. 2에서와 같이 pH 9.0에서 가장 높았다. 그러므로 본 연구에서 고정화 효소 Fum/MDH의 최적 pH는 알칼리 영역으로 이동함을 볼 수 있었고 이는 Almuaibed와 Rhee 등의 다른 고정화 효소에 대한 결과와 일치하였다(4, 11).

FIA 시스템에서 시료의 주입량은 피크 높이에 영향을 주며 시료의 주입량이 증가할수록 피크의 높이도 증가한다(4,

9, 10). 본 연구에서는 Table 1(a)에 주어진 조작 조건하에서 시료의 주입량을 75 μL , 125 μL , 250 μL 로 변화시켜 가며 푸마르산 농도에 따른 피크 높이를 조사하였다. Fig. 3에서 시료의 주입량이 증가함에 따라 피크의 높이도 증가하였다. 그러나 시료 주입량의 증가로 인해 피크의 높이가 증가하더라도 형광 분광계 내 flow-through cell 안에서 NADH의 체류 시간이 증가하게 되어 총 분석시간이 길어지게 되므로 피크 높이와 총 분석 시간을 고려하여 적절한 시료 주입량 (본 연구에서는 75 μL) 을 선택하여야 한다.

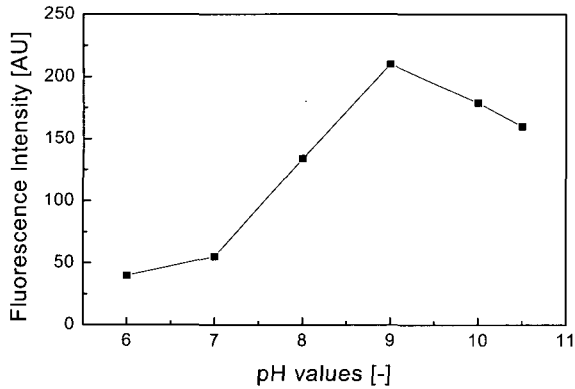


Figure 2. Effects of pH values on the activity of the immobilized enzymes, Fum and MDH.

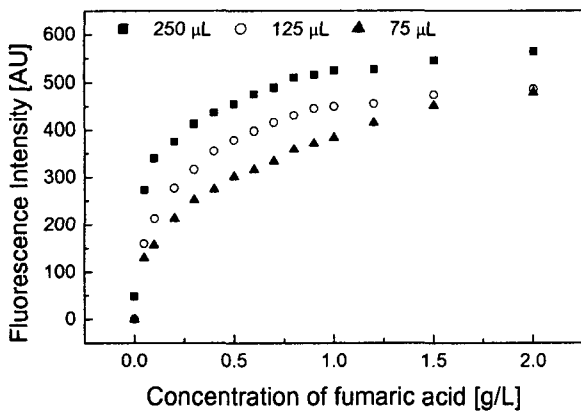


Figure 3. Effects of sample injection volume on the peak heights of the FIA system for fumaric acid.

운반용액의 흐름속도는 FIA 시스템의 고정화 효소반응기 내에서 효소와 기질인 푸마르산의 반응 속도에 커다란 영향을 미친다(4). Kim 등의 연구에서 운반용액의 흐름속도가 증가할수록 피크의 높이와 선형성이 증가하였다(11). 그러나 푸마르산-FIA 시스템에서 용액의 유량을 0.7-1.3 mL/min 로 변화시켰을 때 Fig. 4에서 보는 것과 같이 유속이 증가할수록 피크의 높이가 감소하였다. 이러한 현상은 유속이 증가할수록 튜브 속에서 시료 및 반응 생성물의 분산(dispersion)이 증가하고 효소반응기 내에서 시료의 체류시간도 감소하기 때문인 것으로 생각된다.

푸마르산을 옥살산으로 전환하는 반응에는 운반용액의 유속뿐만 아니라 조효소로 첨가되는 NAD⁺의 농도와 주입량이 커다란 영향을 미친다. 시료와 함께 효소 반응기에 주입되는 NAD⁺의 농도 (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mM)를 다르게 하여 Table 1(a)의 조건하에서 실험을 수행하였다. NAD⁺의 농도가 증가함에 따라 피크의 높이도 증가하였다(Fig. 5). 그러나 NAD⁺는 값비싼 시약으로 높은 농도의 NAD⁺를 사용할 경우 푸마르산-FIA의 조작비용을 상승하게 하므로 본 연구에서는 1 mM의 NAD⁺용액을 사용하였다. 한편, 1 mM NAD⁺용액을 사용하고 NAD⁺의 유입속도(0.5, 1.0, 1.5 mL/min)를 변화시켰을 때 유속의 증가에 따른 푸마르산 농도의 피크 높이는 거의 차이가 없는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5). 이것은 NAD⁺의 유량 증가로 효소 반응기 내로 유입되는 NAD⁺의 양이 증가하였더라도 완충용액의 총 유속 (완충용액 유량 과 NAD⁺ 유량의 합)이 증가하여 피크의 높이가 감소되므로 NAD⁺의 유량이 0.5-1.5 mL/min 로 변할 때 피크높이의 변화가 없는 것으로 생각된다.

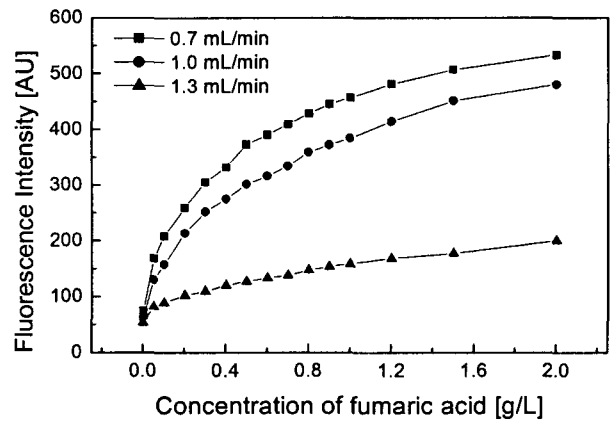


Figure 4. Effects of carrier buffer flow rates on the peak heights of the FIA system for fumaric acid.

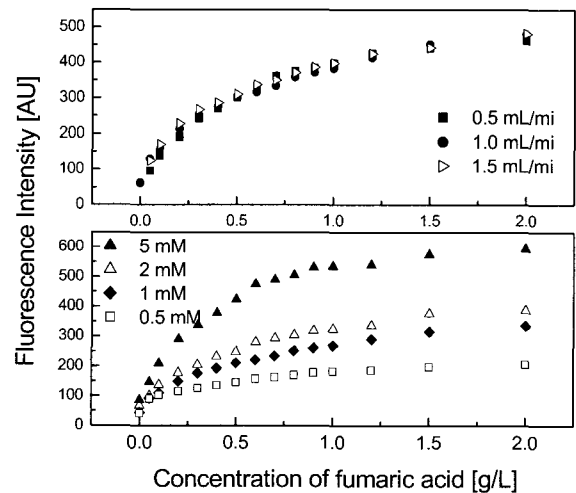


Figure 5. Effects of NAD concentrations and flow rates on the peak heights of the FIA system for fumaric acid.

미생물 유래 효소의 활성은 온도에 크게 의존하며 통상 미생물의 최적 배양온도에서 최대 활성을 나타낸 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서 고정화 효소, Fum/MDH의 반응온도에 따른 활성변화를 조사하였는데 22℃에서 35℃까지 반응온도가 증가할수록 활성이 증가하였고 그 이상의 온도에서는 FIA 시스템의 튜브 내에 작은 공기방울이 형성되어 피크 검출에 어려움이 있었다.

푸마르산을 생산 또는 소모하는 생물공정의 발효액 중에는 각종 기질 (glucose, starch), 염 (CaCO₃, K₂HPO₄, MgSO₄) 및 질소원 ((NH₄)₂SO₄, urea)과 발효 대사물질 (acetate, citrate, ethanol, lactate, succinate 등)이 함유되어 있다. 본 연구에서는 이러한 물질들이 고정화 효소, Fum/MDH의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 실험을 위해 0.5 g/L 푸마르산을 표준 시료로 사용하여 피크높이를 측정하였으며 0.5 g/L의 푸마르산 용액에 각종 기질, 염 및 질소원을 첨가하여 나타나는 피크 높이를 Table 2에 보였다. 2.0 g/L 초산이 존재하는 경우 피크 높이는 30 % 정도 감소하였는데 이는 시료의 pH 값이 감소함에 따른 효소 활성의 감소로 생각된다. 한편 각종 금속이온들은 효소, Fum와 MDH에 활성제 또는 저해제로 작용하는데(12) 고정화 효소의 활성을 증가시키고 수명을 연장시키기 위해 운반용액에 각종 활성제 (imidazole (IMD), dithiothreitol (DTT), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), semicarbazid hydrochloride (SCAD), triton X-100, sodium azide)를 첨가하였다. Table 1(a)과 같은 표준조건으로 푸마르산-FIA 시스템을 조작하고 0.5 g/L의 푸마르산을 주입하였을 때 운반용액에 첨가된 첨가제의 효소 활성에 대한 영향을 Table 3에 보였다. EDTA 첨가시 고정화 Fum/MDH의 활성은 증가되었고 SCAD의 농도가 높을수록 피크의 높이도 증가하였으나 1 mM의 IMD 와 5 mM의 Na-azide는 고정화 효소의 활성을 억제하였다. Glucose oxidase (GOD)를 에폭시 고분자 담체에 고정화하여 GOD-FIA를 개발한 Kim 등(9)의 연구에서는 계면활성제인 triton X-100은 시료와 효소반응기 내부에 적재된 효소와의 접촉을 용이하게 하여 편류현상 (channelling)을 억제하므로 고정화 GOD의 활성제로 작용하였으나 본 연구에서는 triton X-100은 고정화 효소, Fum/MDH의 활성을 저해하였다.

Table 2. Effects of some components (substrates, salts and metabolites) contained in sample on the activity of the immobilized enzymes, fumarase and malic dehydrogenase

Components added to sample	Relative peak height [%]	Components added to sample	Relative peak height [%]
None	100	10 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	100
40 g/L CaCO ₃	96	50 g/L glucose	101
2.0 g/L K ₂ HPO ₄	94	50 g/L starch	100
1.0 g/L MgSO ₄	100	1.0 g/L urea	98
2.0 g/L acetate	70	2.0 g/L lactate	101
1.0 g/L citrate	93	1.0 g/L succinate	96
10 g/L ethanol	100	all compounds	97

The peak height of 0.5 g/L fumaric acid without addition of salts, substrates and metabolites was set to 100 % as reference value.

숙신산-FIA 시스템의 특성

Tsukatani 등은 숙신산의 농도를 분석하기 위한 흐름주입분

석 장치에서 운반용액으로 HEPES 완충용액 (pH 7.0, 10 mM glyoxylate, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM cysteine)을 사용하였다(8). 그러나 본 연구에서 에폭시 고분자 담체에 고정화된 효소 ICL/ICDH를 적재한 효소반응기에서 HEPES 운반용액은 숙신산등과 반응하여 염을 생성하므로써 용액의 흐름을 방해하였다. 또한, HEPES는 값비싼 시약으로써 FIA 시스템에서 비교적 소모가 많은 운반용액으로 사용하기에 부적합하다. 따라서 저렴한 가격과 성능이 우수한 운반용액을 찾기 위해 각종 운반용액을 제조하여 숙신산-FIA 시스템의 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 많은 종류의 운반 용액 중에서 인산나트륨 완충용액이 고정화 효소 ICL/ICDH의 활성을 가장 높게 증대시켰고 시스템과 글리옥실산을 첨가한 후 숙신산-FIA 시스템에 적용하였을 때 염을 생성하지 않았다. 따라서 본 연구에서는 인산나트륨 완충용액을 숙신산-FIA 장치의 운반용액으로 사용하였다.

Table 3. Influence of some components added to carrier buffer solution on the activity of the immobilized enzymes, fumarase and malic dehydrogenase

Components added to carrier buffer	Relative peak height [%]	Components added to carrier buffer	Relative peak height [%]
No	100	0.05 mM DTT	99
1 mM IMD	55	0.1 mM DTT	96
3.4 mM EDTA	111	1 g/L SCAD	108
5 mM Na-azide	85	2 g/L SCAD	121
10 mM Na-azide	69	4 g/L SCAD	147
15 mM Na-azide	67	8 g/L SCAD	167
0.5 g/L Triton X-100	91	---	---

The peak height of 0.5 g/L fumaric acid with addition of activating or inhibitory compounds to the standard buffer solution was set to 100 % as reference value.

숙신산-FIA 시스템에서도 푸마르산-FIA 시스템에서와 같이 에폭시 고분자 담체에 고정화된 효소 ICL/ICDH의 조작 안정성을 먼저 조사하였다. 숙신산 1 g/L를 분석 시료로 하여 FIA 시스템에서 Table 1(b)와 같은 조작 조건에서 연속 측정하였다. 초기 피크높이를 기준으로 24시간 동안 모니터링 한 결과 고정화 효소의 활성은 초기 활성의 94 %를 유지하였고, 4℃ 냉장 보관시 저장 안정성은 30일 동안 초기 활성의 95 % 이상 유지되었다.

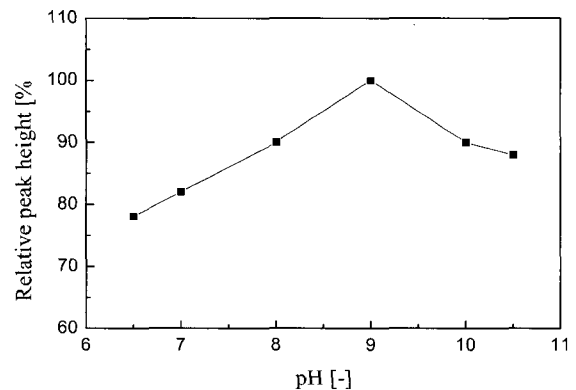


Figure 6. Effects of pH values on the activity of the immobilized enzymes, ICL and ICDH.

ICL과 ICDH의 최적 pH는 6.8과 7.0이지만 APCPG에 ICL과 ICDH를 고정화했을 때 최적 pH는 7.0에서 나타났다(8). 다른 연구에서 VA-epoxy 담체에 고정화한 효소들의 최적 pH는 대개 알칼리 영역으로 이동하였으므로(4, 9, 10) 본 연구에서도 pH에 따른 고정화 효소 ICL/ICDH의 활성 변화를 조사하였다. 운반용액의 pH 범위를 6.0에서 10.5까지 변화시키고 Table 1(b)의 조건으로 실험하였는데, Fig. 6에 보인 것과 같이 에폭시에 고정화된 효소 ICL/ICDH 활성은 pH 9.0에서 최대값을 얻을 수 있었으며, pH 7.0에서는 최대 피크 높이의 20 % 정도 감소되는 것을 볼 수 있다.

분석시료의 주입량을 75 μ L, 125 μ L, 250 μ L로 변화했을 때 숙신산-FIA 장치의 성능을 관찰하였다. 푸마르산-FIA에서처럼 시료 주입량이 증가할수록 피크의 높이가 증가하고 폭도 넓어졌다. 한편, 운반용액의 유량을 0.5-1.6 mL/min로 변화시켰을 때 숙신산 농도에 따른 피크 형태를 관찰한 결과 유속의 증가와 함께 피크 높이는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 그리고 운반용액 유속 1.0 mL/min에서 숙신산 농도에 따른 피크 높이는 가장 좋은 선형성을 보였다.

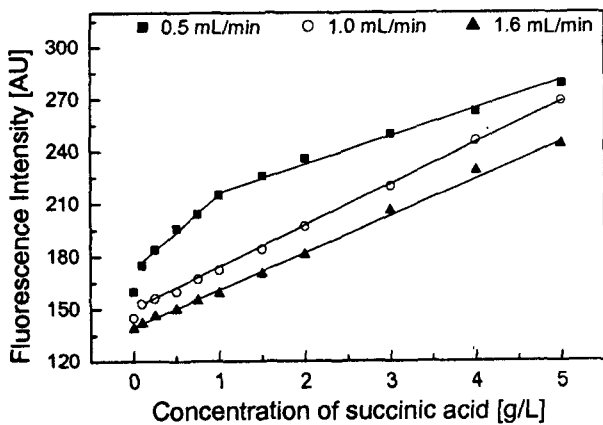


Figure 7. Effects of carrier buffer flow rates on the peak heights of the FIA system for succinic acid.

본 연구에 사용된 효소 IDH (isocitrate dehydrogenase, EC.4.3.1.2 from porcine heart)는 이소시트르산을 옥살산으로 전환하기 위해 조효소로 NADP⁺를 사용한다. NADP⁺가 효소 반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 NADP⁺의 몰농도 (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mM)와 유량 (0.2, 0.5, 1.0 mL/min)을 변화시키면서 숙신산 농도에 따른 피크의 높이를 조사하였다. Fig. 8에서 5.0 mM의 NADP⁺용액이 시료와 함께 주입되었을 때 피크의 높이가 가장 높았으나 1.0 mM의 NADP⁺용액의 유입 시에도 숙신산 검출에 적당한 피크높이와 검출한계를 보였다. 또한 NADP⁺용액의 유량이 증가할수록 숙신산 농도에 따른 피크 높이도 증가하였으나 민감도 (숙신산 농도에 따른 피크 높이의 기울기)는 크게 증가하지 않았다.

효소의 활성에 영향을 미치는 인자중의 하나인 반응온도에 따른 고정화 효소 ICL/ICDH의 활성변화를 조사하였다. Fig. 9에서 푸마르산-FIA 시스템에서와 같이 반응온도가 22 °C에서 35 °C로 증가할수록 숙신산의 농도에 따른 피크 높이가 증가함을 볼 수 있었다.

각종 생물공정에서 배양액 중에 용해되어 있는 염 (K₂HPO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, FeSO₄ 등)은 분석시료인 숙신산과 함께 흐름주입분석장치에 주입되는데 각종 염에 따른 고정화 효소의 활성변화를 2 g/L 숙신산을 사용하여 조사하였다(Table 4(a)). 또한 숙신산 발효공정에서 부산물로 생산되는 대사물질 (acetate, fumarate, malate, oxaloacetate, citrate 등)과 숙신산 발효에 사용되는 기질 (glucose, fructose, mannose 등)이 효소반응에 미치는 영향도 조사하여 Table 4 (b), (c)에 나타내었다. 그리고 푸마르산-FIA 시스템에서와 같이 효소의 활성제 또는 저해제로 알려진 IMD, DTT, EDTA, SCAD, triton X-100 및 Na-azide를 운반용액에 첨가하고 Table 1(b)와 같은 숙신산-FIA 시스템의 운전조건에서 2 g/L 숙신산의 피크높이를 조사하여 효소의 활성에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. Triton X-100은 푸마르산-FIA 시스템에서 고정화 효소 Fum/MDH에 저해제로 작용한 반면 숙신산-FIA 시스템에서는 고정화 효소 ICL/ICDH에 활성제로 작용하여 피크높이가 5% 정도 증가하였다.

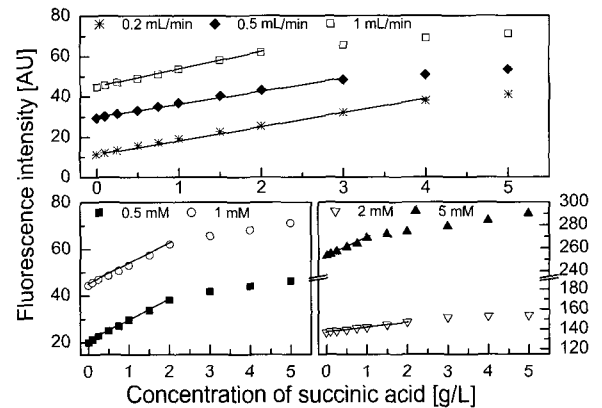


Figure 8. Effects of NADP concentrations and flow rates on the peak heights of the FIA system for succinic acid.

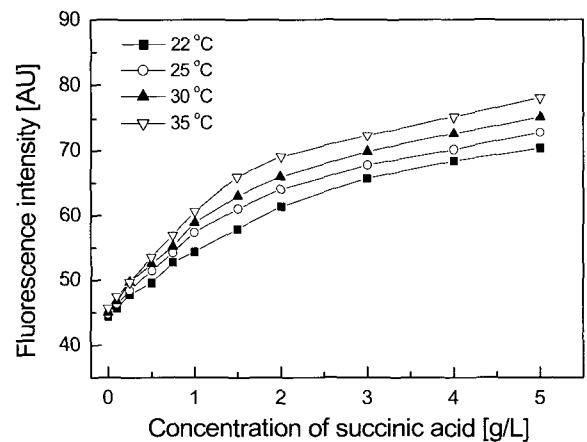


Figure 9. Effects of temperature on the peak heights of the FIA system for succinic acid.

푸마르산 농도의 온라인 모니터링

각종 생물공정에서 생산 또는 소비되는 푸마르산의 농도를 흐름주입분석기술에 의해 온라인 모니터링 하기 위해서 표준 시료의 선형농도 영역을 조사하였다. 고정화 효소 Fum과 MDH를 1:1의 부피 비율로 소형반응기에 충전한 경우 푸마르산의 선형농도 범위는 0.05-0.25 g/L였다. 또한, 고정화 효소 Fum과 MDH의 부피 충전량을 1:2와 1:4로 하여 효소반응기를 제작한 경우 1:2로 충전된 반응기 (IER1/2)에서는 푸마르산의 선형농도 범위는 0.1-0.6 g/L 그리고 1:4로 고정화 효소가 충전된 반응기 (IER1/4)에서 푸마르산의 선형농도범위는 0.3-1.2 g/L이었다. 공정내 푸마르산의 모니터링 할 때 선형농도 범위내의 푸마르산 농도를 측정하기 위해 FIA 장치에서 고정화 효소 Fum/MDH 반응기를 교환하였다.

Table 4. Effects of some components (substrates, salts and metabolites) contained in sample on the activity of the immobilized enzymes, isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase

(a)

Nutrient compounds added to sample	Relative peak height [%]	Nutrient compounds added to sample	Relative peak height [%]
No	100	1.0 g/L MgCl ₂	98
1.0 g/L CaCl ₂	110	1.0 g/L NaCl	97
0.1 g/L FeSO ₄	87	1.0 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	100
1.0 g/L K ₂ HPO ₄	97	---	---

(b)

Substrates added to sample	Relative peak height [%]	Substrates added to sample	Relative peak height [%]
No	100	10 g/L lactose	101
10 g/L L-arabinose	98	10 g/L maltose	113
10 g/L D-fructosel	96	10 g/L mannose	95
10 g/L glucose	101	10 g/L sucrose	98
10 g/L D-inositol	91	---	---

(c)

Metabolites added to sample	Relative peak height [%]	Metabolites added to sample	Relative peak height [%]
No	100	3 g/L malate	124
3 g/L acetate	87	3 g/L oxaloacetate	127
1 g/L citrate	116	2 g/L pyruvate	107
5 g/L fumarate	90	---	---

The peak height of 2.0 g/L succinic acid without addition of salts, substrates and metabolites was set to 100 % as reference value.

Table 5. Influence of some components added to carrier buffer solution on the activity of the immobilized enzymes, isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase (The peak height of 2.0 g/L fumaric acid without addition of salts, substrates and metabolites was set to 100 % as reference value)

Components added to buffer solution	Relative peak height [%]	Components added to buffer solution	Relative peak height [%]
No	100	1 g/L SCAD	101
3.4 mM EDTA	101	2 g/L SCAD	104
1 mM IMD	98	3 g/L SCAD	105
5 mM Na-Azide	97	0.5 g/L Triton X-100	105
10 mM Na-Azide	96	2 g/L Urea	102
0.1 mM DTT	96	-	-

The peak height of 2.0 g/L succinic acid with addition of activating or inhibitory compounds to the standard buffer solution was set to 100 % as reference value.

본 연구에서 개발된 푸마르산-FIA 시스템을 이용하여 모사 공정에서 푸마르산의 농도를 온라인 모니터링 하였다. 푸마르산의 모니터링을 위한 모사공정은 증류수 또는 1 g/L 푸마르산 200 mL를 함유한 소형 반응기에서 수행하였는데 1.0 mL/min의 유속으로 2 g/L의 푸마르산 용액 또는 증류수를 반응기에 주입하고 동일 유속으로 반응기내 용액을 유출시키면서 반응기내 푸마르산의 농도변화를 모니터링 하였다. Fig. 10에서 푸마르산-FIA 시스템에 의한 온라인 모니터링 결과를 HPLC에 의한 오프라인 분석 값과 비교하였으며 상당히 잘 일치하였다.

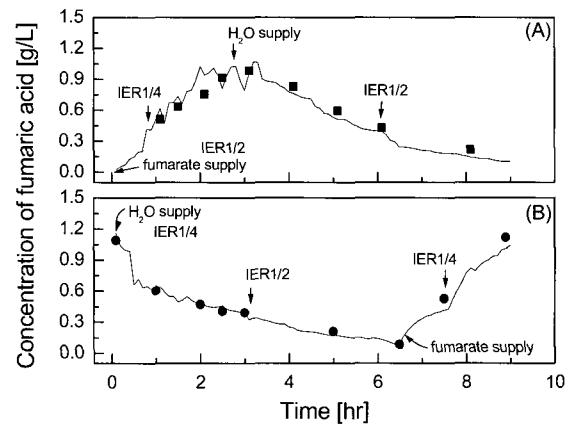


Figure 10. On-line monitoring of the concentrations of fumaric acid in a continuously stirred tank reactor (IER1/2 or 1/4 means an immobilized enzyme reactor with 1:2 or 1:4 packing ratio of fumarase and malic dehydrogenase). Symbols (■, ●) are off-line data measured by the HPLC system.

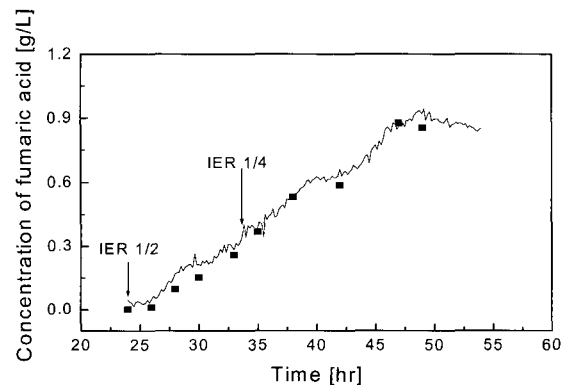


Figure 11. On-line monitoring of the concentrations of fumaric acid during a cultivation of *Rhizopus oryzae* KCTC 6946. Symbol (■) is off-line data measured by the HPLC system.

실제 푸마르산 생산 공정에서 푸마르산의 농도를 모니터링 하기 위해 *Rhizopus oryzae* KCTC 6946을 7.5 L 발효조에서 5 L의 배양부피로 배양하였다. 배양기로부터 cell free 분석 시료는 0.2 μm의 공극을 가진 막으로 제작된 시료 채취기를 사용하여 연동펌프에 의해 푸마르산-FIA 시스템의 시료주입기로 공급되었다. 균주가 푸마르산을 생산하는 시간인 접종

후 24시간 이후부터 푸마르산 농도의 온라인 모니터링을 실시하였다. Fig. 11로부터 본 연구에서 개발된 푸마르산-FIA 시스템을 실제 푸마르산 생산 공정에서 푸마르산 농도의 모니터링에 이용하였을 때 HPLC에 의한 오프라인 분석 값과 잘 일치함을 볼 수 있었다.

숙신산 농도의 온라인 모니터링

고정화 효소 ICL/ICDH를 사용한 숙신산-FIA 시스템을 이용하여 생물공정내 숙신산의 농도를 온라인 모니터링하기 위해 푸마르산의 모니터링 실험에서처럼 모사공정 시스템을 사용하였다. 200 mL의 증류수가 있는 반응기에 20 g/L의 숙신산 용액을 1.0 mL/min의 유속으로 공급하고 동일한 유속으로 반응기의 용액을 배출하면서 반응기내의 숙신산 농도를 온라인 모니터링 하였다. Fig. 12에 FIA에 의한 온라인 모니터링 자료와 HPLC에 의한 오프라인 분석값을 비교하였으며 잘 일치함을 볼 수 있다.

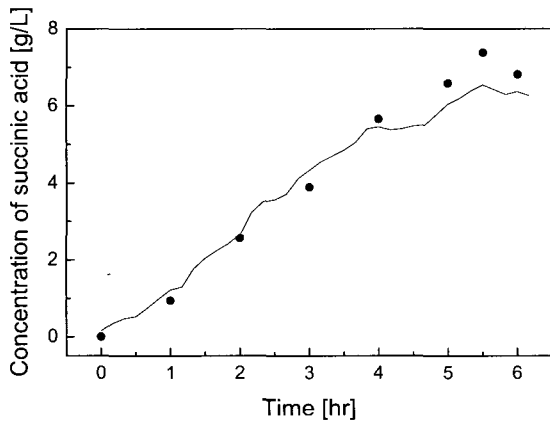


Figure 12. On-line monitoring of the concentrations of succinic acid in a continuously stirred tank reactor. Symbol (●) is off-line data measured by the HPLC system.

요 약

본 연구에서는 푸마르산 또는 숙신산을 생산/소비하는 생물공정에서 각 물질의 농도를 온라인 모니터링을 하기 위한 흐름주입분석기술 (FIA)을 개발하였다. 각 효소반응에 필요한 효소 (Fum/MDH, ICL/ICDH)를 VA-Epoxy Biosynth E3-carrier에 공유 결합에 의해 고정화하였고 소형 고정화 효소반응기를 흐름주입분석 장치에 도입하였다. 푸마르산-FIA 및 숙신산-FIA 시스템에서 고정화 효소 반응기의 특성 (예를 들면, 고정화 Fum/MDH 효소 반응기와 ICL/ICDH 효소 반응기는 최적 pH가 9.0이었으며 35°C의 반응온도에서 최대 활성을 보임) 을 연구하였고 실제 생물공정에의 적용 가능성을 조사하기 위해 각 FIA 시스템의 성능을 조사하였다. 또한 모사공정 과 실제 발효공정에서 푸마르산과 숙신산의 농도를 온라인 모니터링하여 오프라인 분석값과 비교하였고 잘 일치함을 볼 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국 학술진흥재단의 2002년도 신진교수 연구과제 (과제번호 : KRF-2002-003-D00101)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Schügerl, K. (2001), Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years, *J. Biotechnol.* **31**, 149-173.
- Schügerl, K., B. Hitzmann, H. Jürgens, T. Kullick, R. Ulber, and B. Weigel (1996), Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control, *Tibtech. Jan.* **14**, 21-29.
- Jürgens, H., R. Kabuß, T. Plumbaum, B. Weigel, G. Kretzmer, K. Schügerl, K. Andres, E. Ignatzek, and F. Giffhorn (1994), Development of enzyme-cartridge flow injection analysis for industrial process monitoring. Part I. Development and characterization, *Anal. Chim. Acta.* **298**, 141-149.
- Rhee, J. I., M. Yamashita, and Th. Scheper (2002), Development of xylitol oxidase-based flow injection analysis for monitoring of xylitol concentration, *Anal. Chim. Acta.* **456**, 293-301.
- Ruzica, J. and E. H. Hansen (1975), Flow Injection Analysis. Part I. A new concept of fast continuous analysis, *Anal. Chim. Acta.* **78**, 145-157.
- Jürgens, H., L. Brandes, R. Joppien, M. Siebold, J. Schubert, and X. Wu (1995), Development of enzyme cartridge flow-injection analysis for industrial process monitoring. Part II. Application for monitoring of microorganism cultivations, *Anal. Chim. Acta.* **302**, 289-296.
- Almuaid, A. M. (2001), Microscale on-line production and determination of malic acid using flow injection analysis, immobilized fumarase and malate dehydrogenase with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta.* **428**, 1-6.
- Tsukatani, T. and K. Matsumoto (2000), Flow-injection fluorometric quantification of succinate in foodstuffs based on the use of an immobilized enzyme reactor, *Anal. Chim. Acta.* **416**, 197-203.
- Kim, J. H., D. H. Park, and J. I. Rhee (2001), On-line monitoring of glucose and starch by a flow injection analysis technique, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 459-465.
- Rhee, J. I., J. H. Kim, O. J. Sohn, and M. S. Kim (2002), Development of a flow injection analysis technique for monitoring γ -lactate in biological process, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 467-472.
- Kim, M. R. and M. J. Kim (2003), Isocitrate analysis using a potentiometric biosensor with immobilized enzyme in a FIA system, *Food Research International* **36**, 223-230.
- Burfeind, J., B. Weigel, G. Kretzmer, K. Schügerl, A. Huwig, and F. Giffhorn (1996), Determination of the concentration of higher alcohols with enzyme coupled flow-injection analysis in model system, *Anal. Chim. Acta.* **322**, 131-139.
- Marconi, W., F. Faiola, and A. Piozzi (2001), Catalytic activity of immobilized fumarase, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **15**, 93-99.