

발효공정에서 트레할로스의 온라인 모니터링을 위한 흐름주입분석

1,2,4,5한 경 아 · 2,3,4,5† 이 종 일

전남대학교 ¹물질생물화학공학과, ²촉매연구소, ³응용화학공학부, ⁴기능성 나노 신화학소재 사업단(BK21), ⁵바이오광사업단
(접수 : 2006. 12. 20., 게재승인 : 2007. 4. 19.)

Flow Injection Analysis for On-line Monitoring of Trehalose in Fermentation Processes

Kyung-Ah Han^{1,2,4,5} and Jong Il Rhee^{2,3,4,5†}

¹Department of Material and Biochemical Engineering, ²The Research Institute for Catalysis,

³School of Applied Chemical Engineering, ⁴Center of Functional Nano Fine Chemicals(BK21),

⁵Research Center for Biophotonics, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2006. 12. 20., Accepted : 2007. 4. 19.)

Trehalose is non-reducing disaccharide which is found in bacteria, fungi, plants and insects. Trehalose has been determined by several analysis methods. To monitor the concentrations of trehalose in a process, enzymatic methods have more advantage over others, e.g. more specific. In this work, trehalase was immobilized on VA-epoxy polymer and applied to FIA systems. The behaviours of these FIA systems were characterized and used to monitor the trehalose concentrations. Use of optical detection technique was chosen for trehalose-FIA system. On-line monitoring data and off-line data were measured by HPLC.

Key Words : Flow injection analysis, trehalose, on-line monitoring, fermentation process

서 론

트레할로스 (D-glicopyranosyl-1,1-D-glycopyranoside)는 미생물, 효모, 식물, 곰팡이, 동물 등 자연계에 널리 존재하는 비환원성 이당류로서(1) 설탕의 절반 정도의 감미도를 갖는 탄수화물 관련 소재이다(2). 트레할로스는 열과 산에 안정한 특성을 보이는데, 특히 단백질 변성 방지, 세포의 동결 또는 건조 시 보호하는 기능이 있어 감미료, 청량음료, 냉동·건조식품, 의약품 및 관련 보존 안정제 등에 널리 응용되고 있다(3, 4). 당초 트레할로스는 세포 내의 영양 저장 물질이라고 알려졌으나, 최근의 연구에 의하면 세포 내에서 건조, 높은 삼투압, 흑한, 열과 같은 환경 스트레스에 대한 방어 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(5-8). 또한 항암, 혈당저하, 노화 방지 등의 효과를 가지는 것으로 보고되기도 하였다(9).

트레할로스의 분석에는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 또는 박막크로마토그래피 (TLC)를 이용하거나 효

소 활성을 이용한 분광광도계에 의한 방법이 사용되고 있다(10, 11). 그러나 이러한 분석 방법은 다른 당과 유사한 머무름 시간, 이동 거리의 근접성 등으로 인한 피크 식별의 어려움, 효소 비용 문제 등의 단점을 가진다. 이러한 문제들을 해결하기 위해 자동 조작성이 가능한 분석 방법의 하나로 흐름주입분석법 (Flow Injection analysis: FIA)을 이용할 수 있다. 1970년 Ruzicka 등에 의해 처음 개발되기 시작한 흐름주입분석법은 흡광, 형광, 화학(생물) 발광, 원자 흡광 등 많은 검출 시스템이 개량되어 대부분의 센서에서도 적용할 수 있을 만큼 응용 범위가 확대되어 보급되었다. 특히, 생물 공정에서 반응기 내 기질이나 생산물의 농도를 실시간으로 분석하기 위한 모니터링 기술의 하나로, 짧은 시간 내에 많은 시료를 자동적으로 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한, 생물 센서와 결합하기 쉬운 특성을 가지고 있어 흐름주입분석법에 대한 관심이 매우 높아지고 있다. 흐름주입분석 기술에 의해 생물 공정을 온라인 모니터링한 경우의 예로 Brand(12), Kullik(13) 등은 전기화학적 소자의 박막에 글루코스 산화효소 (Glucose oxidase, GOD)를 고정화한 반도체형 센서인 GOD-FET를 이용하여 대장균 발효공정에서 글루코스를 온라인 모니터링하였다. 또한 Brandes(14), Juergens 등(15, 16)은 고분자 담체 등에 GOD를 고정화한 후, 산소전극을 이용한 전류법

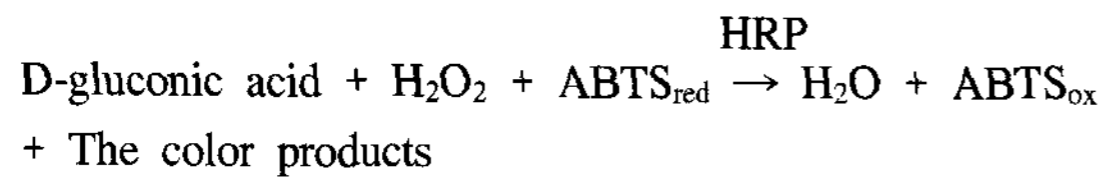
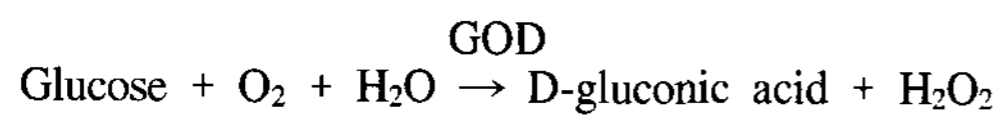
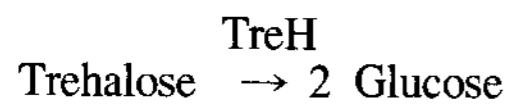
† Corresponding Author : Bioprocess Technology Lab, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

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

E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

(Amperometry)형 센서를 이용하여 글루코스를 온라인 모니터링 하였다. 그리고 각종 발효 공정에서 기질로 많이 사용되는 글루코스와 전분의 흐름주입분석기술에 의한 온라인 모니터링 기술에 관한 연구는 이미 활발히 이루어졌다 (17, 18).

본 연구에서는 흐름주입분석법을 이용하여 트레할로스를 모니터링하는 기술을 개발하고자 한다. 트레할로스 분석을 위해 각종 효소 trehalase (TreH), glucose oxidase (GOD)와 horseradish peroxidase (HRP)를 에폭시 고분자 담체에 고정화한 효소 반응기를 개발하고 이를 FIA 시스템에 결합하였다. 효소를 이용한 트레할로스 측정 원리는 아래와 같다.



본 연구에서는 산소 전극과 분광 광도계를 검출기로 사용하여 트레할로스 농도를 분석하기 위한 흐름주입분석 기술을 개발하고, 각종 완충용액의 종류와 유량, pH, 온도 및 시료의 주입량 등의 영향을 연구하고자 한다. 또한, 트레할로스의 생산 및 소비와 관련한 생물공정에서 기질, 대사물질 등의 FIA 성능에 대한 간섭 영향을 조사하고 실제 공정에서의 적용 가능성에 관하여 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 연구에서 사용된 시료 및 완충용액 제조용 시약 등은 시그마회사 (Sigma co.)에서 구입하였다. TreH는 10% 황산암모늄이 포함된 완충용액으로 담체 (Epoxy supports)에 고정하여 사용하였고, GOD와 HRP는 인산완충용액 (0.1 M, pH 7.0)에 용해시켜 고분자 담체에 고정하였다. 분광학적 검출 방식을 이용한 FIA 기술 개발에서 ABTS (2.5 mM, pH 6.0) 등은 인산완충용액 (0.1 M, pH 7.0)에 용해시켜 사용하였다.

또한 각종 완충용액 즉, 말산완충용액 (0.05 M, pH 6.0), 초산완충용액 (0.05 M, pH 5.5), 칼륨인산완충용액 (0.1 M, pH 6.0), 나트륨인산완충용액 (0.1 M, pH 6.0), GFB완충용액 (K₂HPO₄ 4.3 g/L, NaH₂PO₄ 1.9 g/L, NaCl 3 g/L, EDTA 1.5 g/L, pH 6.0)과 EDTA를 제외한 GFB 완충용액(GFWEB) 등을 제조하여 실험에 사용하였다.

효소 TreH의 생산

본 연구에서는 시그마회사에서 구입한 효소 TreH (trehalase: from porcine kidney, Sigma Co.)와 본 실험실에서

생산된 재조합 TreH 효소를 사용하였다. 형질전환 실험에 사용한 키트는 Solgent Co.에서 구입하였다. 형질전환 실험은 독일 Konstanz 대학의 Winfried Boos 교수로부터 제공받은 플라스미드 (pRHo600)로 대장균 (*E. coli* JM109)을 이용하여 수행하였다. 형질 전환한 *E. coli* JM109/pRHo600를 암피실린 항생제가 든 LB배지에서 24시간 배양한 후 1 mM의 아라비노스로 유도 발현하여 37°C, 180 rpm에서 2시간 동안 활성화시켰다. 배양액은 8000 g, 4°C에서 5분간 원심분리하여 상등액은 제거하고 펠릿만 수집하여 멸균된 증류수로 2~3회 세척하였다. 농축된 펠릿은 수크로스 (20%), Tris-HCl (30 mM)과 EDTA (1 mM)가 혼합된 osmotic shock 용액에 현탁시켜 24°C, 180 rpm에서 약 10분간 반응시켰다. 반응이 정지된 현탁액을 9000 g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액은 제거하고 멸균된 증류수와 유리비드 (지름: 0.5 mm, Biospec. Co.)를 이용하여 세포를 파쇄하였고 황산암모늄이 포함된 완충용액을 첨가하여 부분적으로 정제된 재조합 효소 (TreH)를 생산하였다.

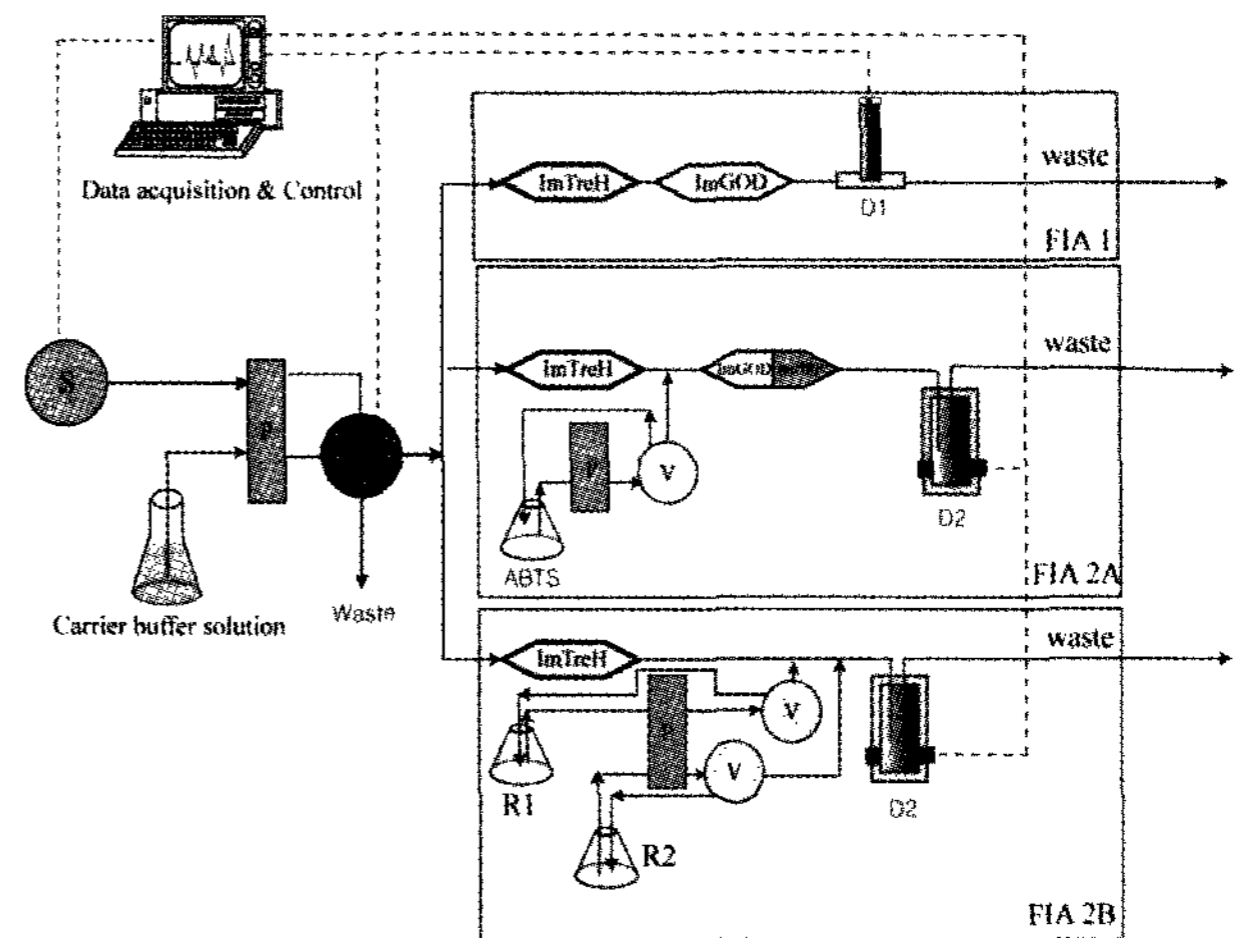


Figure 1. Schematic diagram of trehalose-FIA systems (S; selector, P; pump, I; injector, V; 3/2 way valve, ImTreH; immobilized trehalase, ImGOD; immobilized glucose oxidase, ImHRP; immobilized horseradish peroxidase, D1; O₂ electrode detector, D2; photometric detector, R1; Reagent 1 (ABTS + GOD), R2; Reagent 2 (HRP)).

각종 효소 (TreH, GOD, HRP)의 고정화

본 연구에서 고분자 담체로 polymer Carrier VA-epoxy (50~200 μm, pore volume; 1.3 mL/g, bulk density; 0.32 g/L, Fluka Chemie GmbH)를 사용하였다. 효소를 고정화하기 위해 0.25 g의 고분자 담체에 부분 정제한 700 μL의 TreH를 넣고 4°C에서 3일간 반응시켰다. 반응된 효소는 소형 반응기에 적재하였으며 적재 후 고정화되지 않은 효소는 인산완충용액으로 여러 번 세척하였으며 실험에 사용하기까지 4°C에 보관하였다. 효소의 활성은 시그마에서 구입한 효소와 비교하여 측정하였으며 단백질당 활성단위 (unit)로 환산하였다. GOD의 경우도 동일한 방법으로 고정화한 후 상온에서 3일간 반응시켜 소형 반응기에 적재한 후 인산완충용액으로 세척하고 4°C에 보관하였다. GOD와 HRP를 하나의 효소 반응기에 고정화하는 경우 (GOD/HRP), 각각 300 μL씩의 효소액을 0.1 g의 에폭시 고분자 담체에 고정

화하여 소형 반응기에 적재한 후 TreH와 동일한 방법으로 세척, 보관한 후 FIA 시스템에 연결하여 사용하였다.

Table 1. Reference operating conditions for trehalose-FIA systems

	FIA 1	FIA 2	
		A	B
Sample injection volume (μL)	125	125	250
Sample flow rate (mL/min)	0.14	0.14	0.14
Carrier flow rate (mL/min)	0.75	0.75	0.75
Cycle time (sec)	600	540	570
ABTS conc. (mM)	--	2.5	2.5
ABTS flow rate (mL/min)	--	0.14	0.14
Activity of enzyme (U)	ImTreH 3.38 U	ImTreH 3.38 U ImGOD 1000 U ImHRP 1000 U	ImTreH 3.38 U GOD 20 U* HRP 4 U*
Composition of carrier buffer solution	KH ₂ PO ₄ 4.3 g/L, NaCl 3.0 g/L, NaH ₂ PO ₄ 1.9 g/L, EDTA 1.5 g/L		

* Activity of GOD and HRP injected into the FIA 2B system

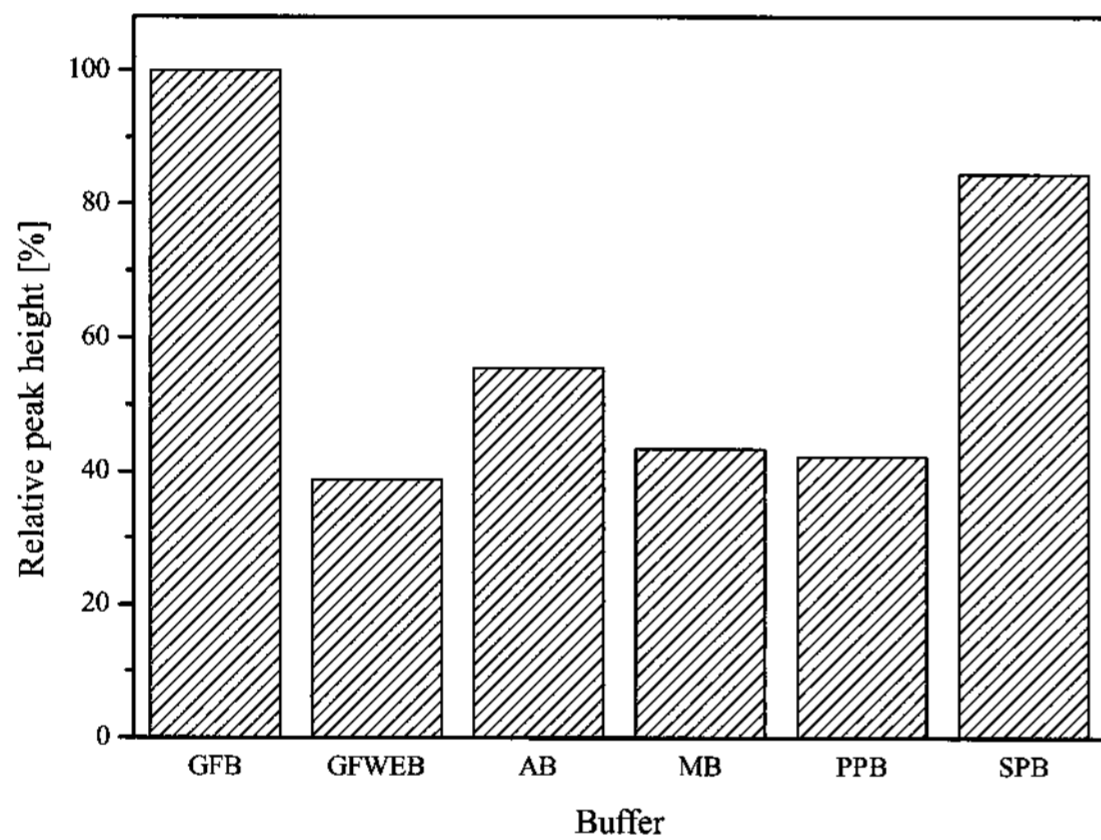


Figure 2. Effects of some kinds of carrier buffer on the peak heights of the FIA system ((GFB (pH 6.0): K₂HPO₄ 4.3 g/L, NaCl 3.0 g/L, NaH₂PO₄ 1.9 g/L, EDTA 1.5 g/L, GFWEB (pH 6.0): K₂HPO₄ 4.3 g/L, NaCl 3.0 g/L, NaH₂PO₄ 1.9 g/L, AB (pH 5.5): 0.05 M Acetate buffer, MB (pH 6.0): 0.05 M Malate buffer, PPB (pH 6.0): 0.1 M Potassium phosphate buffer, SPB (pH 6.0): 0.1 M Sodium phosphate buffer).

트레할로스-FIA 시스템

트레할로스-FIA 시스템의 장치 구성은 Fig. 1에 나타난 바와 같으며 시스템에서 효소 반응기는 시료 주입기와 검출기 사이에 설치하였다. 트레할로스를 모니터링하기 위해 두 가지 검출방식을 사용하였는데, 첫번째는 트레할로스는 TreH를 사용하여 두 분자 글루코스로 분해한 후 GOD 존재하에 글루코스가 글루콘산과 과산화수소로 전환되는데, 이 때 소비되는 산소의 양을 산소 검출기를 이용하여 측정하였다. 두번째는 위의 반응에서 생성된 과산화수소에 ABTS를 첨가하면 HRP 존재하에 유색 물질이 생성되는데, 이를 분광광도계로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, FIA 시스템에서 얻은 데이터의 처리 및 시스템의 제어

를 위해 LabVIEW 6.3 (National Instrument Co. USA) 소프트웨어를 이용한 프로그램을 사용하였다. 트레할로스-FIA 시스템을 운전하기 위한 표준 조건들은 Table 1에 나타내었다.

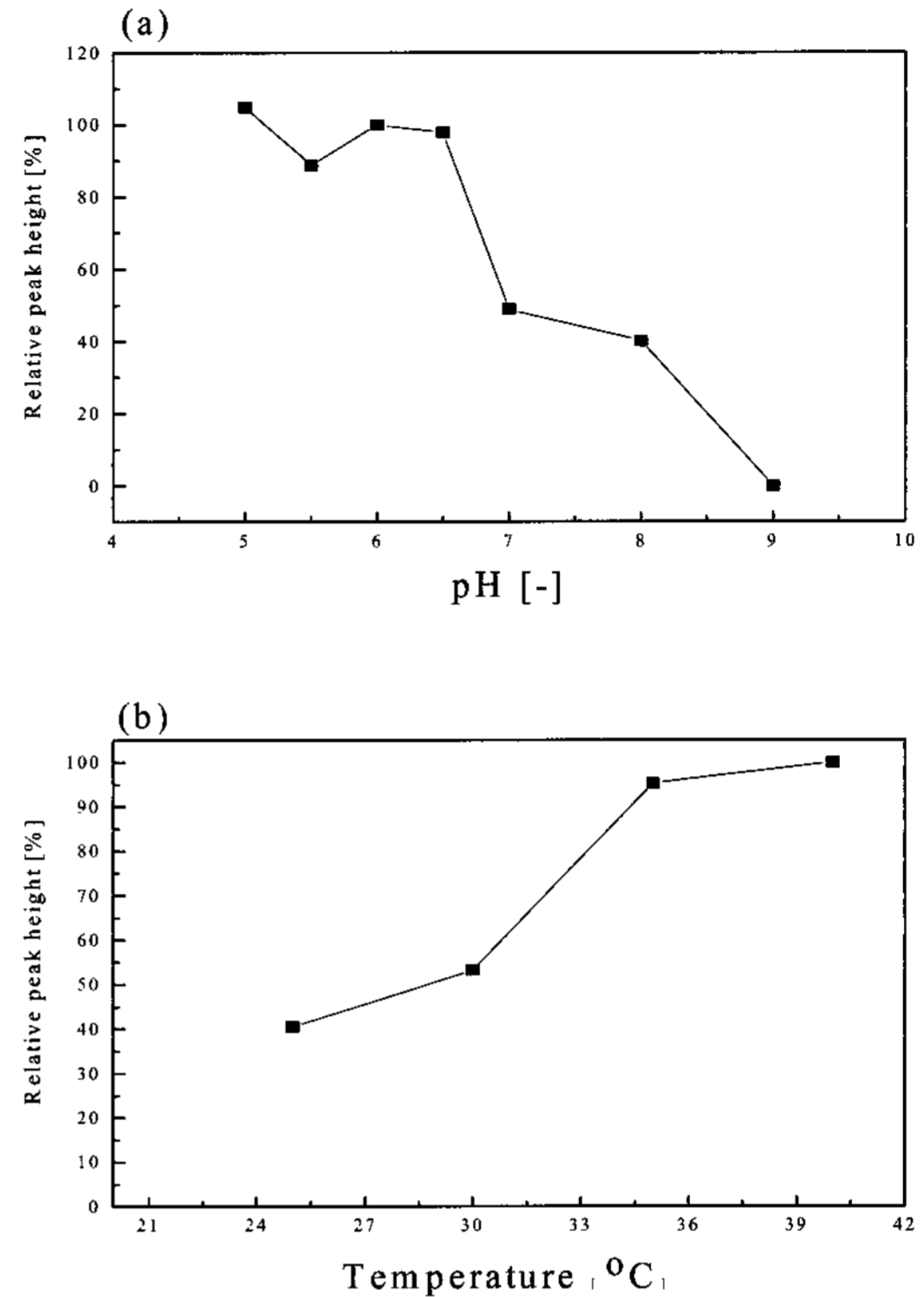


Figure 3. Effects of pH values and temperature on the peak heights of the FIA system.

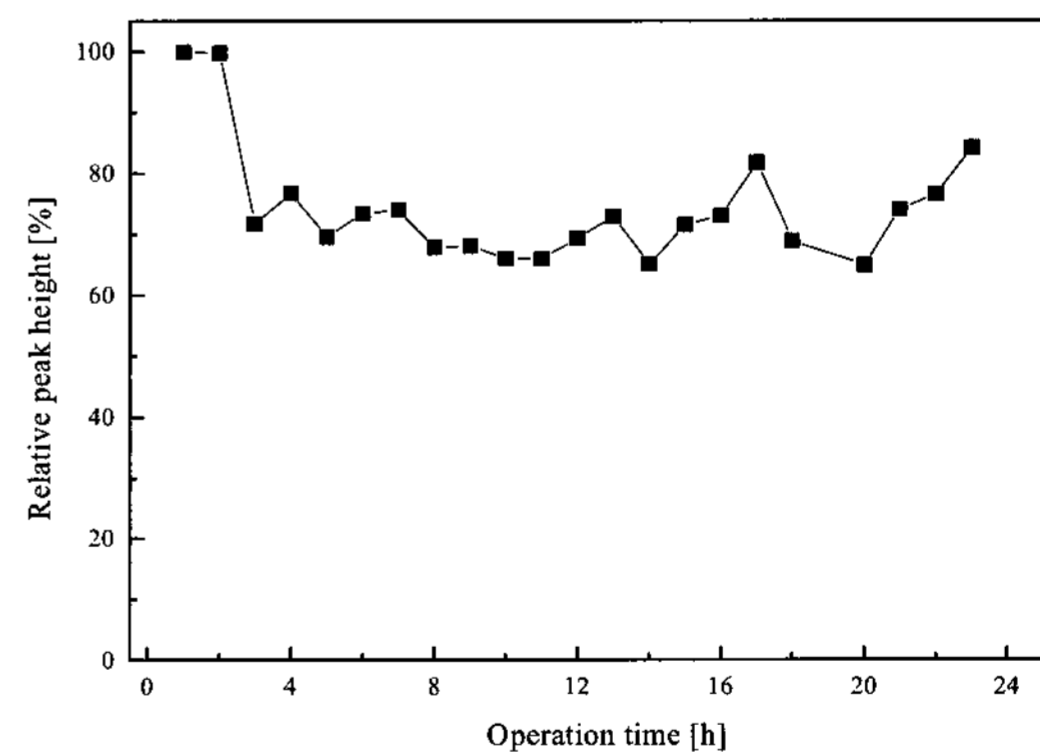


Figure 4. Operational stability of the immobilized TreH in the FIA system.

결과 및 고찰

본 연구에서는 트레할로스를 온라인 모니터링하기 위해 산소 전극과 분광광도계를 사용한 FIA 시스템을 개발하였다. 즉, 산소 전극을 이용하여 반응에 소비되는 산소의 양을 측정하며 트레할로스의 농도를 분석한다. 또한 ABTS와

HRP의 존재하에 과산화수소 반응에 의한 유색 생성물을 분광광도계로 측정하여 트레할로스의 농도를 분석한다.

산소 검출 기반 트레할로스-FIA 시스템

산소 전극을 이용한 FIA 시스템에서 고정화된 TreH의 완충용액 및 pH의 영향, 효소의 안정성, 운반 용액의 흐름 속도, 시료 주입량, 온도, 각종 염과 발효 대사 물질의 영향 등을 살펴보았다. 먼저, 6가지의 완충용액을 사용한 실험에서 GFB 완충용액으로 운전한 경우에 가장 높은 효소 활성을 보였으며 따라서 효소의 안정화에 가장 적합한 완충용액으로 생각되었다(Fig. 2). 운반 용액의 pH에 따른 효소의 활성 변화는 pH 5.0에서 9.0까지의 범위에서 실험한 결과 pH 5.0인 경우 가장 높은 효소 활성을 보였고 (100%), pH 6.0과 7.0인 조건에서도 대체로 높은 (95.3, 93.3%) 활성을 나타내었다(Fig. 3(a)). 한편, 고정화된 GOD는 pH 7.0에서 활성이 가장 안정한 것으로 보고되고 있는데(21) 고정화된 TreH의 최적 pH 조건과의 관계를 고려하여 본 시스템에서는 pH 6.0의 완충용액을 사용하였다. 온도에 따른 효소의 활성 변화를 조사하기 위해서 완충용액

의 온도를 25~40℃까지 5℃ 간격으로 변화하여 실험한 결과, 온도가 증가함에 따라 효소 활성이 두 배 이상 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3(b)). 이는 Rhee 등의 대장균을 이용한 글루코스-FIA 실험에서 온도와 고정화된 GOD의 활성변화에 대한 결과와 일치한다(19).

본 시스템에서 고정화된 TreH의 안정성을 조사하기 위해 소형효소반응기를 FIA 시스템에 연결하고 완충용액으로 충분히 세척한 후 24시간 동안 FIA 시스템을 운전하여 효소의 조작 안정성을 조사하였다. 24시간 이후에도 초기 TreH 활성에 대해 약 85% 이상 활성이 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

운반 용액의 흐름 속도에 따른 FIA 시스템의 성능, 즉 감도를 조사하기 위해서 0.75, 1.0, 1.5와 2.0 mL/min의 용액속도로 실험하였는데 0.75 mL/min로 운전한 경우 높은 민감도를 나타냈다(Fig. 5(a)). 이는 유속이 느릴수록 효소 반응기 내에서 기질과 효소의 반응할 수 있는 시간이 길기 때문인 것으로 판단되며 시료의 선형구간은 0.1~1.0 g/L이었다. 한편 시료 주입량을 75, 125, 250 μL로 변화시켰을 때 피크 높이는 125 μL를 주입한 경우에 가장 높았다(Fig.

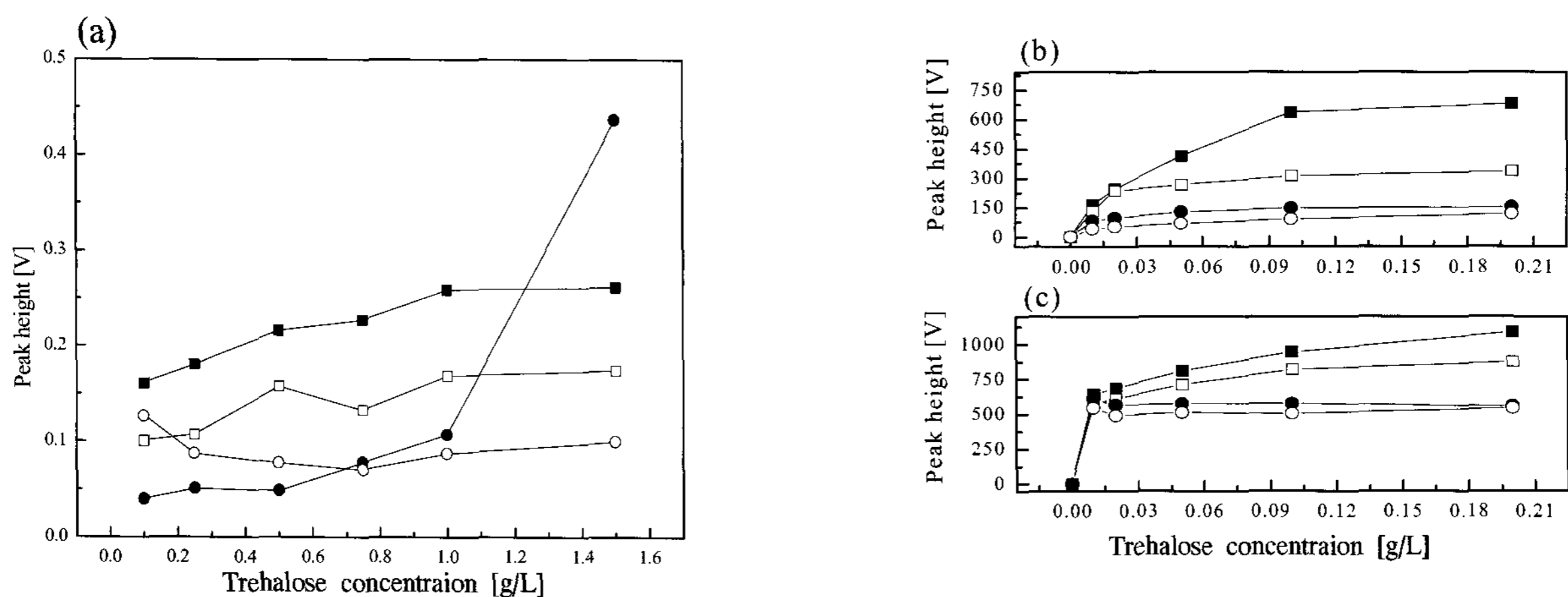


Figure 5. Effects of carrier solution flow rate on the peak heights of the FIA systems ((a): FIA 1, (b): FIA 2A, (c): FIA 2B. Symbols: (□) 0.75 mL/min; (□) 1.0 mL/min; (□) 1.5 mL/min; (□) 2.0 mL/min).

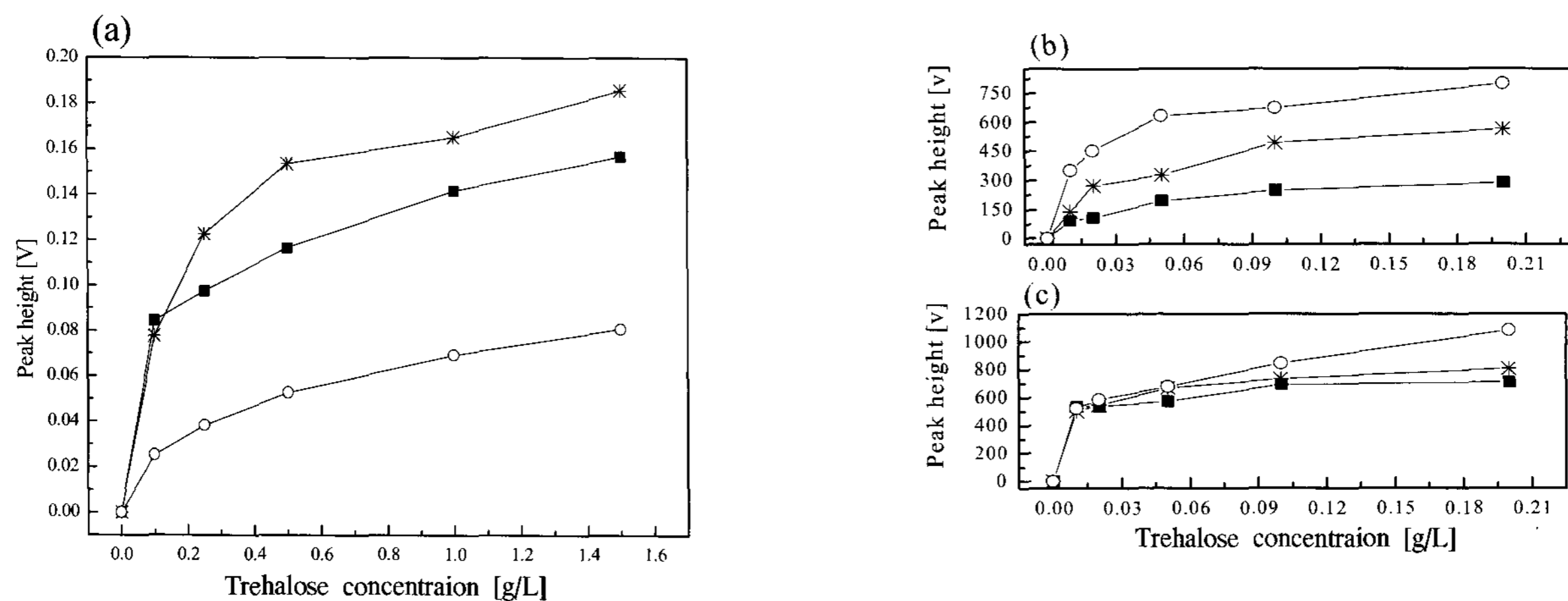


Figure 6. Effects of sample injection volume on the peak heights of the FIA systems ((a): FIA 1, (b): FIA 2A, (c): FIA 2B. Symbols: (□) 75 μL; (*) 125 μL; (□) 250 μL).

Table 2. Effects of some components (substrates, salts and metabolites) contained in the sample on the peak heights of the FIA systems (Sample in FIA 1 : 2 g/L trehalose, Sample in FIA 2A and FIA 2B : 0.1 g/L trehalose)

Components added to sample	Relative peak height[%]			Components added to sample	Relative peak height[%]		
	FIA 1	FIA 2			FIA 1	FIA 2	
		A	B			A	B
None		100.0		5 g/L sucrose	87.3	84.0	82.9
10 g/L yeast extract	436.9	677.3	420.9	5 g/L fructose	112.6	85.0	110.8
10 g/L peptone	99.0	117.3	158.4	5 g/L lactose	114.5	104.0	90.6
10 g/L KH ₂ PO ₄	79.3	77.0	76.4	5 g/L maltose	321.7	135.9	165.4
5 g/L MgSO ₄	115.7	146.5	86.0	0.005 g/L inositol	85.1	143.5	86.2
1 g/L CaCl ₂	82.6	117.6	94.7	0.5 g/L glycerol	147.4	106.4	104.3
1 g/L NaCl	76.2	77.2	89.1	0.5 g/L ethanol	105.8	89.5	80.2
15 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	94.4	87.5	101.4	5 g/L starch	153.7	108.8	111.4

6(a). 실제 트레할로스 생산 공정의 발효액 중에는 각종 염류, 탄소원과 발효 대사물질 등이 용해되어 있다(19, 21). 본 연구에서는 각종 배양액과 대사 물질이 트레할로스-FIA 시스템의 성능에 미치는 저해효과를 연구하기 위해 각종 염류 및 대사 물질에 따른 FIA의 피크 높이 변화를 조사하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 2 g/L의 트레할로스에 10 g/L의 효모추출물을 첨가한 경우 436.9%로 높은 피크 증가를 보였고 5 g/L의 황산마그네슘, 엿당, 전분, 유당 및 과당 등이 용해된 시료에서는 10% 이상의 피크높이 변화를 나타내었다. 한편, 1 g/L의 염화나트륨과 10 g/L KH₂PO₄ 등이 용해된 시료에서는 효소의 활성이 10% 이상 감소되었다.

분광 검출 기반 트레할로스-FIA 시스템

a) TreH 및 GOD/HRP를 고정화한 효소 반응기의 이용

TreH와 GOD/HRP를 고정화한 두 개의 효소 반응기를 사용하고 분광학적 검출 방법을 이용한 FIA 시스템을 운전하여 그 성능을 연구하였다(Fig. 1, Table 1). 두 개의 고정화 효소 반응기가 연결된 FIA 시스템을 이용하여 운반 용액의 흐름 속도, 시료와 ABTS 주입량, 각종 염과 대사 물질의 영향 등을 조사하였다. 효소를 고정화하여 세척한 두 개의 효소 반응기를 FIA 시스템에 장착하고 운반 용액을 0.75, 1.0, 1.5 및 2.0 mL/min의 속도로 흘려주며 분석한 결과 0.75 mL/min의 유속일 때 높은 흡광도를 얻었고, 0.01~0.1 g/L의 농도에서 선형 구간을 얻었다(Fig. 5(b)). 또한 시료의 주입량은 75, 125, 250 μ L를 주입한 실험에서 250 μ L를 주입한 경우에 가장 높은 흡광도가 얻어졌다(Fig. 6(b)). 이는 Sohn 등이 푸마르산과 숙신산의 FIA에서 실험한 주입된 시료의 용량에 따른 피크 높이의 변화와 유사한 경향을 보였으나(21), 시료가 두 개의 효소 반응기를 거치므로 피크의 형태가 넓게 퍼지는 모양으로 관찰되어 향후 실험에서는 125 μ L를 이용하였다. 발색 반응에 관여하는 ABTS의 주입량에 따른 FIA의 성능에 관한 실험에서는 ABTS를 30~300초간 주입하며 실험했는데 150초 동안 주입한 경우에서 가장 높은 피크를 얻었다(Fig. 7(a)). 이 때 주입된 ABTS의 총량은 약 312.5 μ L이었다. 산소 전극 기반 FIA 시스템을 이용한 실험과 마찬가지로 각종 염과 대사 물질이 고정화된 TreH의 활성에 미치는 영향을 조사하였는데(19, 20), 10 g/L의 효모추출물이 용해된 시료

에서 효소 활성이 크게 증가하였고 (677.3%), 5 g/L의 황산마그네슘, 엿당, 5 mg/L의 이노시톨이 용해된 시료에서는 20% 이상의 효소활성의 증가를 관찰할 수 있었다. 그러나 10 g/L의 인산칼륨과 1 g/L의 염화나트륨이 용해된 0.1 g/L 트레할로스 시료의 경우는 20% 이하의 효소의 활성이 감소하였다(Table 2).

b) TreH만을 고정화한 효소 반응기의 이용

TreH와 GOD/HRP를 모두 고정화한 두 개의 효소 반응기를 통과하면서 발생할 수 있는 체류시간의 연장, 고르지 못한 피크 모양 등의 문제를 해결하고자 TreH만 고정화한 후 소형 반응기에 적재하고 나머지 효소 (GOD, HRP)는 3/2 way 밸브를 이용하여 재순환하면서 실험을 수행하였다(Fig. 1, Table 1(FIA 2B)). 이 실험의 경우에도 운반 용액의 흐름 속도, 시료 주입량, ABTS/GOD 주입량 및 각종 염과 대사 물질이 트레할로스 검출에 미치는 영향 등을 조사하였다. 운반 용액의 흐름 속도는 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mL/min의 속도로 실험한 결과 0.75 mL/min에서 높은 FIA의 감도를 관찰할 수 있었다(Fig. 5(c)). 이때 검출 가능한 시료의 농도는 0.01~0.2 g/L이다. 한편, 시료 주입량을 각각 75, 125, 250 μ L 주입하여 실험을 수행한 결과 250 μ L를 주입했을 때 가장 높은 흡광도 값을 얻었고 0.01~0.2 g/L에서 선형구간의 피크를 얻을 수 있었다(Fig. 6(c)). 이 결과는 Rhee 등이 글루코스-FIA 실험에서 샘플 주입량에 따른 피크 높이 실험에서 보여준 결과와 유사한 경향을 나타냈다(21). 한편, ABTS (2.5 mM)와 GOD (20 U/mL)를 나트륨 인산용액 (0.1 M, pH 6.0)에 용해시켜 0.14 mL/min의 유속으로 3/2 way 밸브를 이용하여 피크 높이의 별화를 조사하였다. 즉, ABTS/GOD의 주입시간을 30~90초 동안 FIA 시스템에 주입하였을 때 주입시간을 변화에 따른 흡광도 변화를 관찰한 실험에서 90초간 주입한 경우에 가장 높은 피크를 나타내었다(Fig. 7(b)). 본 FIA 시스템 실제 온라인 모니터링의 적용 가능성을 확인하기 위해 각종 염과 대사 물질이 포함된 시료가 고정화된 TreH에 미치는 간섭 영향을 조사하였다. 10 g/L의 효모추출물이 용해된 시료에서 피크 높이가 가장 높게 나타났고, 10 g/L의 펩톤, 5 g/L의 엿당이 용해된 시료의 경우 20% 이상의 높은 피크가 관찰되었다. 10 g/L의 인산칼륨이 용해된 시료의 경우만 20% 미만의 낮은 피크를 보였다(Table 2).

세 가지 형태의 트레할로스-FIA 시스템에서 산소 검출기 기반 트레할로스-FIA 시스템은 검출 농도가 0.1~1.0 g/L에서 선형 구간을 관찰할 수 있었고 분석에 필요한 운전시간은 10분이었으며 125 μ L의 시료를 주입했을 때 가장 높은 피크를 관찰할 수 있었다. 분광 검출기 기반 트레할로스-FIA 시스템은 효소 반응기의 사용유무에 따라 두 가지로 나누어서 실험하였다. 두 가지 시스템 모두 시료 농도 0.01~0.2 g/L에서 선형을 나타내었다. TreH 및 GOD/HRP를 고정화한 효소 반응기를 이용한 시스템을 이용한 경우, 운전 전에 약 8.5분의 시간이 소요되었고 125 μ L의 시료 주입 시 가장 높은 피크가 관찰되었다. TreH만을 고정화한 효소 반응기를 이용한 시스템은 운전 시간이 9.5분가량 소요되었고, 250 μ L의 시료를 주입한 경우 가장 높은 피크를 관찰할 수 있었다(Table 1). 본 연구 결과에서 산소 검출기 기반 트레할로스-FIA 시스템은 높은 농도의 트레할로스 농도를 분석하고자 할 경우 적합하고, 낮은 농도의 시료를 분석하고자 할 경우 흡광 검출기 기반 트레할로스-FIA 시스템이 용이할 것으로 판단된다.

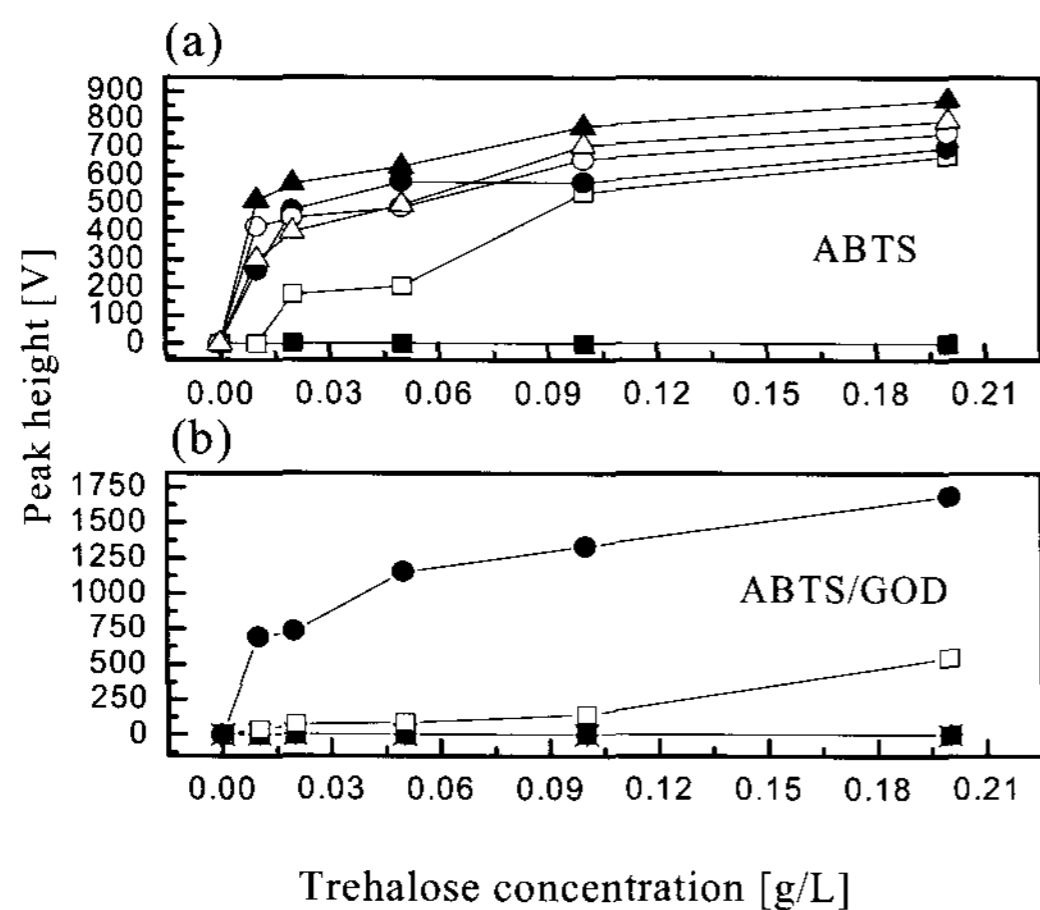


Figure 7. Effects of ABTS (or ABTS/GOD) injection volume on the peak heights of the FIA systems ((a): FIA 2A, (b): FIA 2B. Symbols: (*) 0 sec; (□) 30 sec; (◻) 60 sec; (◻) 90 sec; (◻) 120 sec; (◻) 150 sec; (△) 300 sec).

트레할로스의 온라인 모니터링

트레할로스-FIA 시스템을 이용하여 생물 공정 내 트레할로스 농도를 온라인 모니터링하기 위해 본 연구에서는 소형연속교반반응기 (CSTR)내 트레할로스의 농도를 모니터링하였다(20, 21). 본 연구에서 사용된 세 가지 형태의 FIA 시스템 중에서 운전비용, 장치의 성능 등을 고려하여 고정화한 TreH와 고정하지 않은 GOD, HRP를 이용한 분광 검출기 기반 트레할로스-FIA 시스템을 사용하여 온라인 모니터링 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 조작 변수는 Table 1을 기본으로 하여 실험을 통해 부분적으로 최적화된 값을 매개변수로 사용하였다. 모니터링 실험 초기에는 1 mL/min의 유속으로 트레할로스를 증류수 200 mL가 들어 있는 반응기에 주입하였고 약 3시간 후에는 동일한 유속으로 증류수를 주입하여 반응기내 트레할로스 농도를 변

화시켰다. 한편, 실험 중 반응기내의 용액은 1 mL/min로 유출시켜 반응기의 부피를 일정하게 유지시켰다. 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 FIA에 의한 온라인 모니터링 결과를 오프라인 분석값과 비교하였다. 오프라인 분석은 HPLC (RID detector; Shodex column, 75°C, 0.7 mL/min)를 이용하였고 Fig. 8로부터 트레할로스-FIA 시스템에 의한 온라인 모니터링 결과와 HPLC에 의한 오프라인 분석 값을 비교하였을 때 잘 일치함을 관찰하였다.

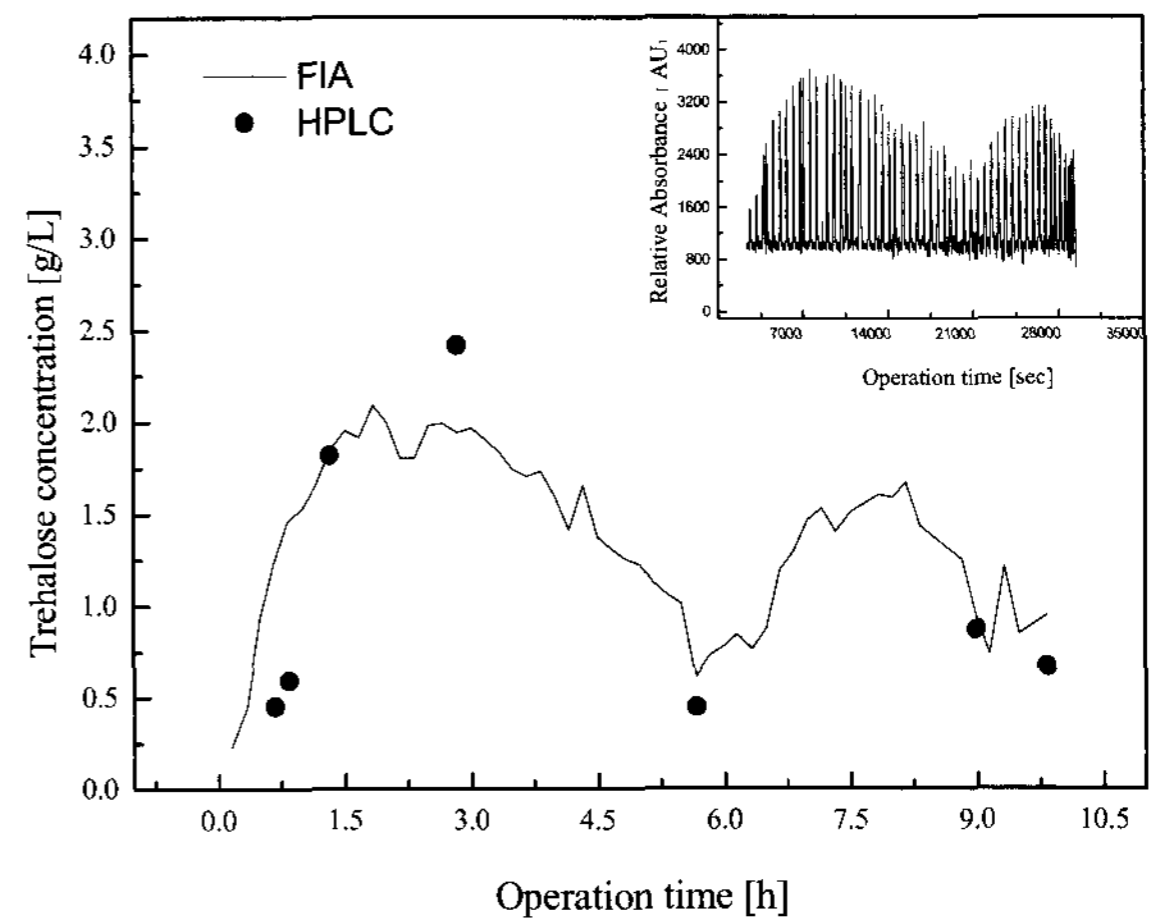


Figure 8. On-line monitoring of trehalose concentration in a simulated bioprocess by a trehalose-FIA 2B system.

요약

본 연구에서는 고가의 TreH를 형질전환한 대장균으로부터 생산하고 부분적으로 정제한 후, 예폭시에 고정화하고 트레할로스-FIA 시스템에 이용하였다. 산소 전극을 이용한 트레할로스 검출 방법과 분광학적 방법을 이용한 트레할로스 검출 방법을 비교하고, 공정에서의 온라인 모니터링의 가능성을 검토하였다. 산소 전극을 이용한 분석의 경우 다른 대사 물질로 인한 간섭현상이 상대적으로 적고 검출 가능한 농도가 0.1~1.0 g/L로 많은 양의 트레할로스를 생산하는 공정을 모니터링할 경우 적합한 시스템임을 알 수 있었다. 반면 분광학적 방법으로 트레할로스를 검출한 실험의 경우 TreH와 GOD/HRP를 고정하여 실험한 경우와 TreH만 고정하고 GOD와 HRP를 직접 주입하는 방식을 비교했을 때 검출 가능한 농도는 0.01~0.2 g/L로 낮은 농도의 트레할로스를 모니터링할 경우에 적합하다. 그러나 ABTS나 GOD, HRP의 주입량 등 경제성과 운전이 편의성 등을 고려할 경우 GOD와 HRP를 직접 주입하는 시스템이 가장 효과적임을 알 수 있었다. 이 시스템을 이용하여 소형 생물반응기 내 트레할로스의 농도를 온라인 모니터링한 결과는 오프라인 값과 매우 잘 일치함을 보였다. 생물공정에서 트레할로스의 온라인 모니터링이 FIA 기술에 의해 가능함을 확인하였다.

감 사

이 논문은 산업자원부 지방기술혁신 사업 (RTI04- 03-03) 과 교육인적자원부 BK21 사업 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Elbein, A. D. (1974), The metabolism of α,α -trehalose, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**, 227-256.
2. Scher, M. (1993), Trehalose to find more food functions as cost falls, *Food process* April, 95-96.
3. Paiva, C. L. A. and A. D. Panek (1996), Biotechnological applications of the disaccharide trehalose, *Biotechnol. Ann. Rev.* **2**, 293-314.
4. Camilo, C., S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder, and B. Roser (1992), Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology, *Bio/technology* **10**, 1007-1011.
5. Crowe, J. H. and L. M. Crowe (1984), Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose, *Science* **223**, 701-703.
6. De-Araujo, P. S. (1996), The role of trehalose in cell stress. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**(7), 873-875.
7. Gadd, G. M., K. Chalmers, and R. H. Reed (1987), The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 249-254.
8. H. S. Song, K. C. Hwang, and W. G. Bang (1999), Characteristics of a Mutant of trehalose-producing *Micrococcus luteus* and optimization of production conditions, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**(5), 399-403.
9. Roser, B. (1991), Trehalose, a new approach to premium dried foods, *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 166-169.
10. Plourde-Owobi L. S. Durner, G. Goma, and J. Francois (2000), Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: Phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability, *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 33-40.
11. Guillou, V., L. Plourde-Owobi, J. L. Parrou, G. Goma, and J. Francois (2004), Role of reserve carbohydrates in the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research* **4**, 773-787.
12. Brand U., B. Reinhardt, F. Ruether, T. Scheper, and K. Schuegerl (1990), Bio field effect transistor sensor arrays as detectors in flow-injection analysis, *Anal. Chim. Acta* **238**, 201-210.
13. Kullick T., M. Beyer, J. Henning, R. Lerch, R. Quack, A. Zeitz, B. Hitzmann. T. Scheper, and K. Schuegerl (1994), Application of enzyme field effect transistor sensor arrays as detectors in a flow-injection system for simultaneous monitoring of medium components. Part I. Preparation and Calibration, *Anal. Chim. Acta*, **296**, 263-290.
14. Brandes L., X. Wu, J. Bode, J. I. Rhee, and K. Schuegerl (1993), Fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* JM103 and production of the fusion protein SPA: EcoR I in a 60-L working volume airlift tower loop reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 205-212.
15. Juergens H., R. Kabuss, T. Plumbaum, B. Weigel, G. Kretzmer, K. Schuegerl, 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.
16. Juergens H., R. Kabuss, T. Plumbaum, B. Weigel, G. Kretzmer, K. Schuegerl, K. Andres, E. Ignatzek, and F. Giffhorn (1995), Development of enzyme-cartridge flow-injection analysis for industrial process monitoring. Part II. Application for monitoring of microorganism cultivations, *Anal. Chim. Acta* **302**, 289-295.
17. 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**(5), 459-465.
18. Umoh, E. F., A. B. van Putten, and K. Schuegerl (1996), Simultaneous on-line monitoring process using an FIA system, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **67**, 276-280.
19. J. I. Rhee (1998), On-line monitoring of glucose and acetate by flow-injection analysis in *Escherichia coli* fermentation process, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(3), 244-250.
20. J. I. Rhee, J. H. Kim, O. J. Sohn, and M. S. Kim (2002), Development of a flow injection analysis technique for monitoring of L-lactate in biological processes, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**(5), 467-472.
21. O. J. Sohn, C. K. Kim, and J. I. Rhee (2003), Development of on-line monitoring techniques for fumaric acid and succinic acid by flow injection analysis, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**(5), 377-384.