

푸마르산의 온라인 모니터링을 위한 흐름주입분석 기술 개발

손옥재, 이종일

전남대학교, 물질·생물화학공학과, 화학공학부, 생물공정기술연구실

전화(062)530-0847, FAX(062)530-1847

**Abstract**

In this work we describe the on-line monitoring technique for the analysis of fumaric acid in biotechnological processes. Fumarase and malate dehydrogenase(MDH) were immobilized on epoxy carrier and integrated into a FIA system. The effects of carrier buffer flow rate, pH, reaction temperature on the immobilized fumarase/MDH were investigated for the development of a fumarate-FIA system. Furthermore the effects of substrates, salts and metabolites dissolved in the sample on the activity of the immobilized enzyme were investigated.

**1. 서론**

푸마르산은 2개의 카르복실기(COOH)와 1개의 이중결합으로 이루어진 C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid로서 미생물의 대사과정 중 TCA(tricarboxylic acid) cycle에 존재하는 중간 산물로 잘 알려져 있다. 푸마르산은 합성수지와 생분해성 고분자의 제조, 생물산업 특히 식품산업에서의 첨가제, 의약품 등으로 그 응용성이 매우 크다. 최근 각종 미생물과 값싼 기질을 이용하는 생물공정에서 푸마르산을 대량 생산하고자 하는 노력이 활발히 이루어지고 있다. 푸마르산 생산공정에서 생산물을 온라인 모니터링을 하고 실시간으로 공정을 제어하는 기술은 생산성 향상과 경제성에 크게 기여할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 푸마르산을 온라인 모니터링하기 위해 고분자 담체에 fumarase와 malate dehydrogenase를 고정화한 소형 효소반응기(enzyme cartridge)를 이용한 Fumarate-FIA 시스템을 개발하고 그 특성을 고찰하고자 한다.

**2. 재료 및 방법**

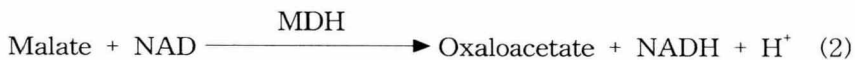
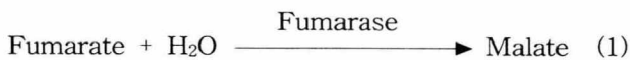
1) 장치 구성

본 실험에 이용된 장치는 Fig 1.과 같이 시료선택기(selector), 연동펌프, 선택식 밸브(3/2 way valve), 주입기(injector) 그리고 검출기(fluorescence spectrophotometer)

로 구성되어 있다. 시료선택기, 주입기, 선택식 밸브 및 검출기의 자동화 및 결과분석을 위해 컴퓨터 소프트웨어를 사용하였다.

## 2) 효소 반응

푸마르산은 fumarase의 존재 하에 malate로 전환되며(1), 생성된 malate는 MDH에 의해 조효소인 NAD와 함께 반응하여 oxaloacetate와 NADH가 생성된다(2). 즉 기질인 푸마르산의 농도에 따라 Fumarase, MDH 및 NAD의 존재 하에서 각각 다른 량의 NADH가 생성되는데 이를 형광분광광도계를 사용하여 Ex 340 nm/Em 450 nm에서 형광세기를 측정하였다.



## 3. 결과 및 고찰

푸마르산 농도의 온라인 모니터링을 위한 흐름주입분석기술(FIA)을 개발하였다. Fumarase와 MDH를 고정화 담체(VA-Epoxy)에 고정화하고 FIA장치에 결합하여 사용하였으며, 우선 고정화 효소의 활성도 변화를 조사하였다. 그리고 운반용액의 pH 및 조성이 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 그리고 Fumarate-FIA system의 효소반응에 사용되는 조효소인 NAD의 농도 및 주입량 그리고 시료의 주입량을 변화시키면서 고정화 효소의 활성 변화를 관찰하였다. 또한 미생물을 발효하여 푸마르산을 생산하기 위해 각종 기질이 사용되는데 배양액 가운데 존재하는 기질 및 염 성분에 대한 효소의 활성변화를 실험을 통해 조사하였다. 그리고 푸마르산 발효공정중에 생산될 수 있는 각종 대사물질들(ethanol, isocitrate, succinate, oxaloacetate, pyruvate)이 검출반응에 주는 간섭영향을 조사하였다.

## 4. 요약 및 전망

본 연구에서는 푸마르산 생산공정의 온라인 모니터링을 위한 흐름주입분석 기술을 개발하였고, 발효공정 중 사용되는 기질, 생산되는 대사물질 그리고 운반용액의 흐름속도 및 pH, 시료 주입량, NAD의 농도 및 주입량을 주요 변수로 하여 연구, 개발하였다.

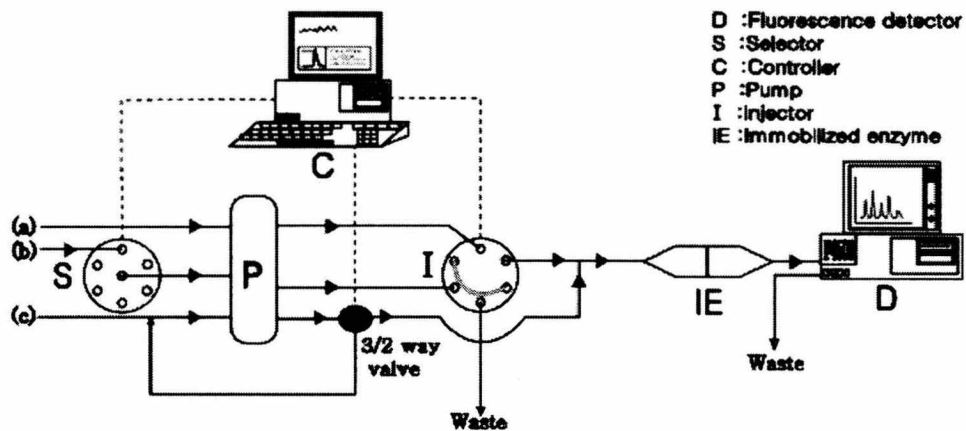


Fig 1. Fumarate-FIA system: (a) Carrier buffer(25 mM  $K_2HPO_4$ , 15 mM  $NaH_2PO_4$ , 50 mM NaCl, pH 9.0); (b) Sample; (c) NAD solution(1 mM)

## 5. 참고문헌

1. J.I. Rhee, M. Yamashita, Th. Scheper, *Analytica Chimica Acta*, 2002, **456**, 293-301
2. Ala. ddin, M. Almuaibed, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **428**, 1-6
3. 김준홍, 박돈희, 이종일, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **16**, 459-465