

## 흐름주입분석 기술에 의한 글루코오스와 전분의 온라인 모니터링

<sup>1</sup>김 준 홍 · <sup>2</sup>박 돈 희 · <sup>†</sup>이 종 일  
전남대학교, <sup>1</sup>물질생물화학공학과, <sup>2</sup>화학공학부  
(접수 : 2001. 8. 8., 게재승인 : 2001. 9. 28.)

## On-line Monitoring of Glucose and Starch by a Flow Injection Analysis Technique

Jun-Hong Kim<sup>1</sup>, Don-Hee Park<sup>2</sup>, and Jong Il Rhee<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Department of Materials and Biochemical Engineering

<sup>2</sup>Faculty of Chemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

(Received : 2001. 8. 8., Accepted : 2001. 9. 28.)

The on-line monitoring technique for the concentrations of glucose and starch by FIA(Flow Injection Analysis) system was studied. Glucose oxidase(GOD) and amyloglucosidase(AMG) were immobilized on VA-Epoxy carrier and integrated into the FIA system. The pH, buffer flow rate and temperature were optimized and the effects of salts and metabolites dissolved in the sample on the activity of immobilized enzyme were investigated. GOD-FIA and AMG/GOD-FIA were applied for the on-line monitoring of the glucose and starch in a simulated bioprocess. The on-line measurements of glucose concentrations by GOD-FIA agreed with off-line data well and the AMG/GOD-FIA with single cartridge system took an advantage over the FIA system with two separated cartridges for the on-line monitoring of starch concentrations.

**Key Words** : flow injection analysis, on-line monitoring, glucose, starch

### 서 론

생물공정에서 발효조건과 공정변수는 미생물의 성장 및 생산에 크게 영향을 끼친다. 이러한 공정변수를 모니터링하고 제어하는 것은 생물공정의 효율을 증대시키기 위해 매우 중요하다(1). 대개의 생물공정에서 글루코오스, 전분 등을 기질로 사용하는데 이의 적절한 모니터링 기술 개발은 미생물의 성장 및 각종 물질의 생산에 중요한 역할을 한다.

생물반응기내 기질이나 생산물의 농도를 온라인 모니터링하기 위해 고가의 크로마토그래피 장치를 이용하기도 하는데, 최근에는 흐름주입분석(Flow Injection Analysis : FIA) 기술을 개발하여 온라인 모니터링하는 연구가 활발히 진행되고 있다(1-4). FIA는 단시간에 많은 시료를 자동적으로 측정할 수 있고 생물센서와 결합하기 쉬운 장점으로 그 적용범위가 매우 넓다(1,3). Jürgen 등(5)과 Umoh(6)는 glucose oxidase(GOD)와 amyloglucosidase(AMG)를 고분자담체에 고정화하여 글루코오스와 전분을 온라인 모니터링하였고, Van Putten 등(7)은  $\alpha$ -glucosidase와 amyloglucosidase를 이용하여 단백질

생산 발효공정에서 전분을 자동 분석하였다. 한편, Milardovic(8) 등은 분리막에 글루타르알데히드를 이용하여 GOD를 가교결합시킨 후 글루코오스 자동분석에 이용하였고, Vodopivec(9)과 Fumio(10)는 고분자 다공성 물질을 담체로 하여 GOD를 충전컬럼에 고정화한 후 글루코오스를 측정하였다. Schindler 등(11)은  $\alpha$ -amylase와 amyloglucosidase를 이용하여 FIA 장치와 결합한 FTIR-분광기로 전분을 분석하였다. 그 밖에 Nikolajsen, Becker, Shügerl, Brooks, Danielson 등 여러 연구자는 글루코오스 농도 측정을 위해 화학발광센서, NADH-형광센서, 전위차계센서, 전류형센서 등 다양한 생물센서를 활용하여 생물공정을 모니터링하였다(12). 최근까지도 글루코오스와 전분을 생물공정에서 자동분석하기 위한 연구는 많이 제시되고 있으나 실제 생물공정에서 글루코오스와 전분을 온라인 모니터링 하는데 필요한 FIA의 특성에 관한 연구는 아직 체계적으로 이루어지지 않았다.

본 논문에서는 글루코오스와 전분을 온라인 모니터링하기 위한 FIA 시스템을 개발하기 위해 고분자 담체에 GOD와 AMG를 고정화한 후 pH, 용액의 흐름속도, 온도, 생물 배양액 가운데 존재하는 염 그리고 신선대사 물질의 분석시료에 대한 간섭 영향 등을 살펴 보고자 한다. 또한, GOD-FIA 및 AMG/GOD-FIA를 실제 생물공정에 적용하기 위해서 소형 반응기에 글루코오스와 전분의 농도를 변화시키면서 반응기에

<sup>†</sup>Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea  
Tel : +82-62-530-1847, Fax : +82-62-530-1849  
E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

있는 시료를 FIA 장치에 주입하여 그 농도를 온라인 모니터링하고 오프라인 값과 비교하고자 한다.

### 재료 및 방법

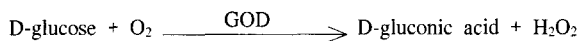
#### 시약 및 효소

본 연구에서는 glucose oxidase (GOD; E.C. 1.1.3.4 from *Aspergillus niger*, Boehringer mannheim), amyloglucosidase (AMG ; E.C. 3.2.1.3 from *Aspergillus niger*, Sigma사)를 이용하여 효소반응을 수행하였고, 고정화 담체로는 VA-Epoxy (Riedelde-Haen)를 사용하였다. 그 외의 시약은 분석용을 사용하였다.

#### 측정원리

<글루코오스>

글루코오스는 산화효소인 glucose oxidase (GOD)와 반응하여 글루콘산과 과산화수소를 생산한다. 이 반응에서 산소가 소모되는데, 소모된 산소의 농도를 측정하여 글루코오스 농도를 분석할 수 있다(12,13).



<전 분>

전분의 가수분해 효소로서 다당인 전분을 곧바로 글루코오스로 분해할 수 있는 amyloglucosidase(AMG)를 이용하여 α-1,6 결합 또는 α-1,4 결합을 전분 분자의 바깥에서부터 순서대로 가수분해하여 D-glucose 단위로 분해한 후 이를 GOD로 산화하여 소모된 산소 농도를 측정하였다(6,12).



#### 효소의 고정화 및 FIA 시스템

소형효소용기(enzyme cartridge, Mobitec Co.)의 양끝에 필터(직경 6.8 mm, 공극직경 90 μm)를 설치하고, 600 μL 인산수소칼륨 용액(pH7, 1 M)에 GOD와 AMG를 용해한 후 200~240 mg의 VA-epoxy 담체와 함께 용기 내부에 적재하였다. 그리고, 3일간 상온에서 방치한 후 0.1 M의 인산수소칼륨 완충용액으로 씻어냈다(6,13). 고분자 VA-epoxy 담체는 고정화하는 동안 담체 표면에 있는 에폭시화물(epoxide)이 효소에 있는 아미노 그룹의 친핵공격에 의하여 열리게 되고 그 결과 효소와 담체 사이에 공유결합이 형성되어 있는 구조로 매우 안정적이며(6), 4℃에서 장기간 보관 후에도 효소 활성이 크게 변화하지 않았다.

한편, 효소반응에 의하여 소모되는 산소농도 측정을 위하여 Clark-type(YSI 5531)의 산소전극 센서를 사용하였으며 본 연구에서 사용된 FIA 장치를 Figure 1에서 보였다. 선택기, 시료 주입기 등의 자동화와 결과분석, 데이터 처리를 위해 컴퓨터 자동분석 및 제어 소프트웨어를 사용하였다.

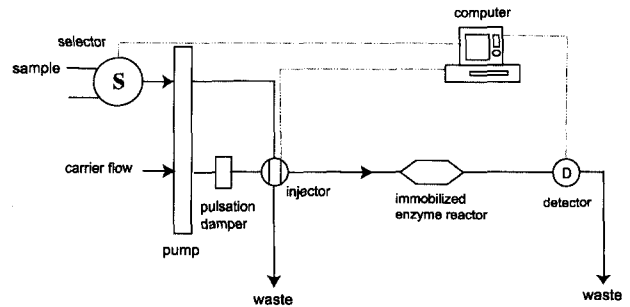


Figure 1. Schematic diagram of a FIA system.

Table 1. Reference operating conditions for a GOD-FIA system(cycle time is total operating time of the FIA system for one sample)

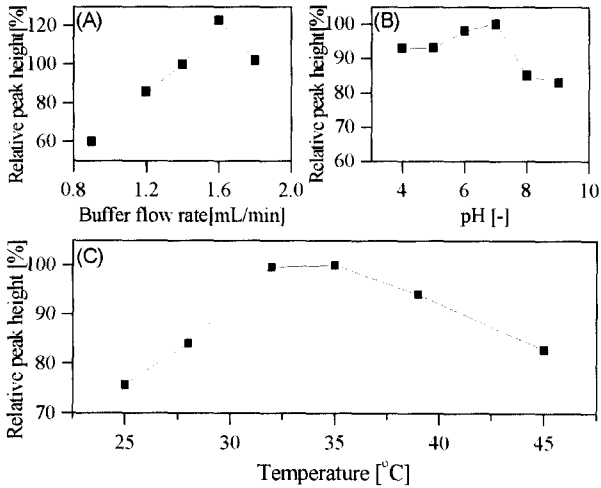
	GOD-FIA
Injection volume (μL)	125
Buffer flow rate (mL/min)	1.4
Cycle time (sec)	300
Activity of immobilized enzyme (U)	200
Composition of buffer solution	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4.3 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.9 g/L NaCl 3.0 g/L EDTA 1.5 g/L

### 결과 및 고찰

#### GOD-FIA의 특성

Epoxy 고분자 담체에 고정화되어 소형 반응기(cartridge)에 적재된 GOD의 활성도는 흔히 native 효소에 비하여 활성이 감소하고 고정화 조건, 운반용액의 유량, 온도, pH 등에 따라 변화할 수 있다(5). 그러므로, 생물공정에 GOD-FIA 시스템을 적용하기 전에 고정화된 GOD의 특성을 조사할 필요가 있다. GOD-FIA 시스템을 운영하기 위한 표준매개 변수값은 Table 1에 나타났다. Jürgen(5)의 연구에서 글루코스 농도에 대한 운반용액 속도 변화에 따른 피크높이를 조사한 결과 흐름속도가 피크에 미치는 영향은 그리 크지 않았으나, Umoh(6)는 용액속도를 증가시킨 경우 피크의 높이가 증가한 후 일정한 속도 이상에서는 다시 감소한다고 보고하였다. Figure 2(A)에서 0.5 g/L의 글루코오스 농도에서 운반용액의 속도에 따른 피크 높이 변화를 관찰하였다. 용액의 흐름속도를 증가시킬수록 피크 높이가 증가하다가 1.6 mL/min 이상에서는 감소하였다. 이는 소형 효소용기내 흐름의 분산현상과 체류시간에 의한 효소반응속도 변화에 기인한 것으로 생각된다.

또한, Figure 2(B)에서 고정화된 GOD는 비교적 넓은 pH 영역에서 좋은 활성을 유지하였는데 중성 및 산성에 비하여 알칼리성에서 활성, 즉 피크 높이가 감소함을 보였다. Jürgen의 연구에서도 최적 pH는 4.5~7.5로 보고하였고(5), Gang 등이 연구한 GOD 고정화에 관한 실험에서도 중성에서 최적의 활성을 보였다(14). 한편, 온도 변화에 대한 고정화된 GOD의 효소 활성을 조사하였는데 32~35℃ 영역에서 효소 활성이 가장 우수하였다(Figure 2(C)). 40℃ 이상에서 피크의

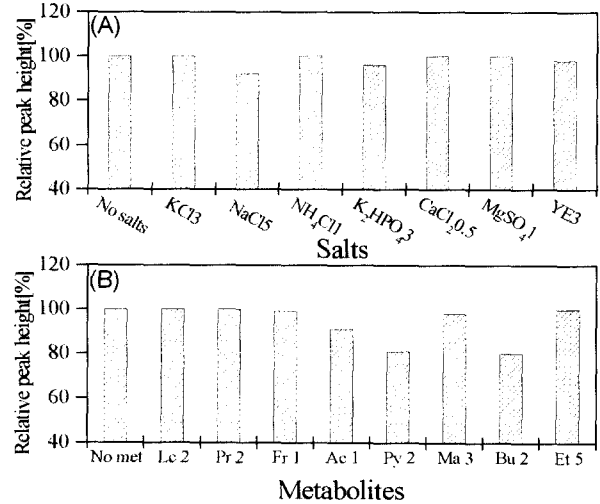


**Figure 2.** (A) Relative peak heights with 0.5 g/L D-glucose at different buffer flow rate (100% : 1.4 mL/min), (B) Effect of sample pH on relative peak heights (pH 7.0 : 100%, 0.5 g/L D-glucose), (C) Relative peak heights at different temperature with 0.5 g/L D-glucose. (100% : 35°C)

진동(oscillation)현상이 발생하였고 이는 고정화 효소의 불활성과 시스템내의 기포 발생에 기인한 것으로 생각된다.

실제 발효공정의 배양액 중에는 각종 염(salts)이 존재하고 미생물내 신진대사의 결과로 대사물질이 생성되어 분석시료와 함께 FIA 장치의 주입기에 도입된다. 따라서, 각종 염과 대사물질은 분석하고자 하는 시료의 피크 높이, 즉 고정화 효소의 활성에 영향을 끼칠 수 있다. 생물공정에 많이 사용되는 배양액 중에서 KCl(3 g/L), NaCl(5 g/L), NH<sub>4</sub>Cl(1 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(3 g/L), CaCl<sub>2</sub>(0.5 g/L), MgSO<sub>4</sub>(1 g/L), yeast extract(3 g/L)를 0.5 g/L의 글루코오스 시료와 함께 FIA 장치로 주입하여 피크 높이 변화를 관찰하였다. Figure 3(A)에서 염이 존재하지 않는 경우를 기준하여 염에 대한 효소 활성 변화 즉, 상대적인 피크의 차이는 최대 8% 이내였다. 또한, 생물공정에서 생성되는 각종 신진대사물질인 lactate(2 g/L), propionate(2 g/L), formate(1 g/L), acetate(1 g/L), pyruvate(2 g/L), malate(3 g/L), butyrate(2 g/L)가 0.5 g/L 글루코오스를 분석하는데 미치는 영향을 조사하였다(15-19). Figure 3(B)에서 acetate(1 g/L)와 pyruvate(2 g/L), butyrate(2 g/L)의 경우 피크의 높이가 다소 감소하였는데, 특히 pyruvate와 butyrate는 20% 가량 감소하였다. 생물재생자원을 이용한 수소생산공정 중 주정폐수에는 에탄올이 다량 함유되어 있으므로 에탄올(5 g/L)에 대한 피크 영향을 조사하였는데, 에탄올은 효소의 활성에 거의 영향을 미치지 않았다. Jürgen의 연구에서도 0.1 M 이하의 염이 존재한 경우 큰 영향이 없음을 보였다(5). Rhee 등은 *E. coli*를 배양하는 동안 FIA 시스템내 대사물질의 영향에 관한 연구 결과 8 g/L 고농도의 acetate가 분석시료에 용해되어 있는 경우를 제외하고는 GOD가 10% 이내에서 크게 영향을 받지 않았다(20).

계면활성제인 Triton X-100은 시료와 효소반응기 내부에 적재된 효소와의 접촉을 용이하게 하여 편류현상(channelling)을 억제한다. Sodium azide는 FIA 시스템 내부에 흐르는 관에 미생물의 성장을 억제시키는 성분이다(5). 본 연구에서는



**Figure 3.** (A) Relative peak heights of 0.5 g/L D-glucose in absence and presence of different salts dissolved in the sample solution (100% : no salts contained), (YE : Yeast extract) (B) Relative peak heights of 0.5 g/L D-glucose in absence and presence of different contained metabolites dissolved in the sample solution (100% : no metabolites contained), (Lc : lactate, Pr : propionate, Fr : formate, Ac : acetate, Py : pyruvate, Ma : malate, Bu : butyrate, Et : ethanol). Number means concentration of each component.

FIA 장치에 사용하는 운반용액에 1 g/L의 sodium azide와 1 mL/L의 Triton X-100을 운반용액에 첨가하여 피크의 높이를 관찰하였다. Sodium azide(1 g/L)를 첨가한 경우 효소 활성이 2배 이상 손실되었으나, 운반용액에 첨가된 Triton X-100은 첨가물을 함유하지 않은 운반용액과 비교하여 약 3 배 가량 높은 효소 활성을 나타냈다.

**AMG/GOD-FIA의 특성**

Vitor 등은 L-asparaginase와 glutamate dehydrogenase의 두가지 효소를 단일 반응기에 공동고정화(coimmobilization)한 경우와 각각의 반응기에 개별적으로 고정화한 경우 반응시간 및 전환율을 비교 하였는데, 단일 반응기를 사용한 경우 반응시간이 단축되고 전환율이 증가되었다(21). Yubin 등은 glucoseisomerase와 amyloglucosidase를 폴리스티렌 비드에 공동고정화(coimmobilization)하여 효소활성을 연구하였다(22). 또한, Umoh는 AMG와 GOD를 각각 고정화한 후 두 개의 효소 반응기에 적재하여 생물공정에서 전분의 농도를 자동 분석하였다(6,23).

본 연구에서는 전분의 농도 변화를 온라인 모니터링하기 위해 AMG와 GOD를 두 개의 고정화 효소 반응기에 분리하여 고정화한 경우와 두 개의 효소를 각각 고정화한 후 한 개의 효소 반응기에 적재하여 사용한 경우를 비교하였다. Table 2에 AMG/GOD-FIA 시스템 조작을 위한 표준매개 변수값을 나타냈다.

우선, 두 개의 고정화된 효소 반응기를 사용하여 1 g/L의 전분의 농도에 대한 운반용액의 유량에 따른 피크 높이를 비교, 관찰하였다(Figure 4(A)). GOD-FIA의 경우와 달리 운반용액의 유량이 증가함에 따라 피크의 높이가 감소하였는데, 반응 정도가 반응기내 용액의 분산 영향보다는 반응 체류시

Table 2. Reference operating conditions for a AMG/GOD-FIA system

	AMG/GOD-FIA (two cartridges)	AMG/GOD-FIA (single cartridge)
Injection volume ( $\mu$ L)	125	125
Buffer flow rate (mL/min)	1.4	0.9
Cycle time (sec)	500	350
Activity of immobilized enzyme (U)	500 (AMG) 200 (GOD)	1000 (AMG) 100 (GOD)
Composition of buffer solution	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4.3 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.9 g/L NaCl 3.0 g/L EDTA 1.5 g/L	

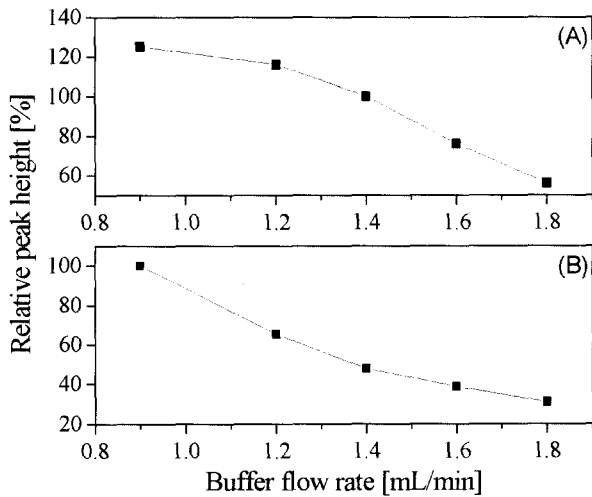


Figure 4. (A) Relative peak heights in the two separated cartridges system with 1 g/L starch at different buffer flow rate(100% : 1.4 mL/min), (B) Relative peak heights in the single cartridge system with 0.5 g/L starch. (100% : 0.9 mL/min)

간에 크게 의존하는 것으로 생각되었다. AMG를 무기담체에 고정화한 경우 최적 pH는 4~4.5인 반면(24), 폴리스티렌 입자에 고정화한 경우 최적 pH는 4.5이었다(25). 또한, 고분자(methylmethacrylate)로 고정화하여 AMG에 대한 효소 활성을 연구한 결과 pH 4.0~5.5에서 최적의 활성을 나타내는 것으로 보고하였다(26). 본 연구에서 AMG를 epoxy 고분자 담체에 고정화한 경우 pH 4에서 최적 활성을 나타냈다(Figure 5(A)).

AMG는 GOD에 비하여 비교적 고온에서 활성 범위를 갖는다. Junichi 등은 세라믹 재질로 된 분리막 표면에 AMG를 고정화하여 실험한 경우 45~50°C에서 최적 활성을 나타낸다고 보고하였고(28), Bahar는 폴리스티렌 입자를 담체로 하였을 때 50°C에서 최적의 활성을 나타낸다고 보고하였다(25,27). 또한, Yakup의 연구에서 고정화된 AMG는 55°C에서 높은 활성을 갖는다고 보고하였다(26). 이와같이, 온도에 대한 최적 활성 범위가 다른 GOD와 AMG를 동일한 온도 변화 조건하에서 실험한 경우(Figure 6(A))와 GOD를 상온으로 하고 AMG만 온도를 변화시켜 실험한 경우로 구분하여 피크의 높이를 조사하였다(Figure 6(B)). GOD와 AMG 모두 온도를 변화시켜 효소의 활성을 조사한 결과 29°C에서 최적의 활성을

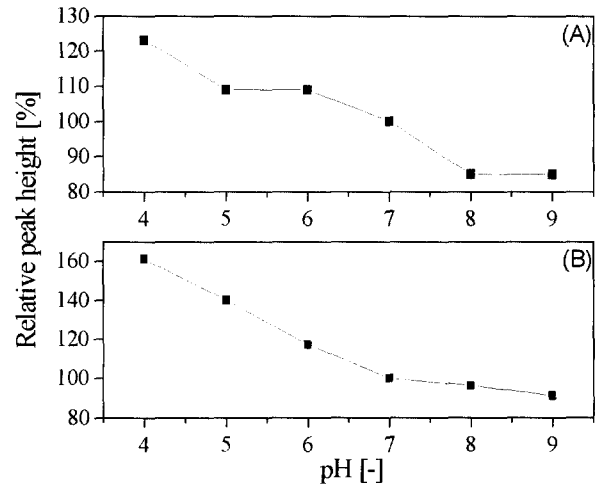


Figure 5. (A) Relative peak heights in the two separated cartridges system with 1 g/L starch at different pH values (100% : pH 7), (B) Relative peak heights in the single cartridge system with 0.5 g/L starch. (100% : pH 7)

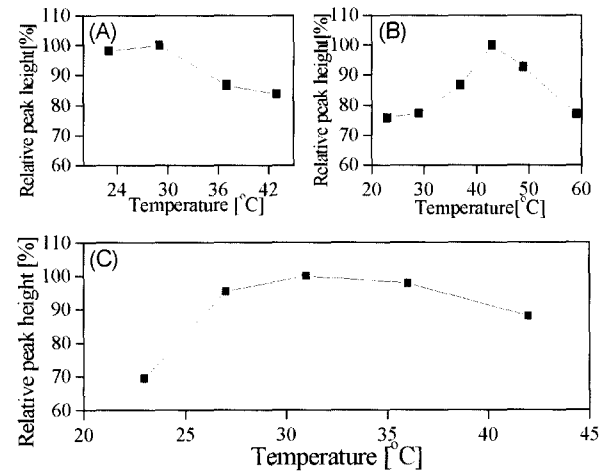
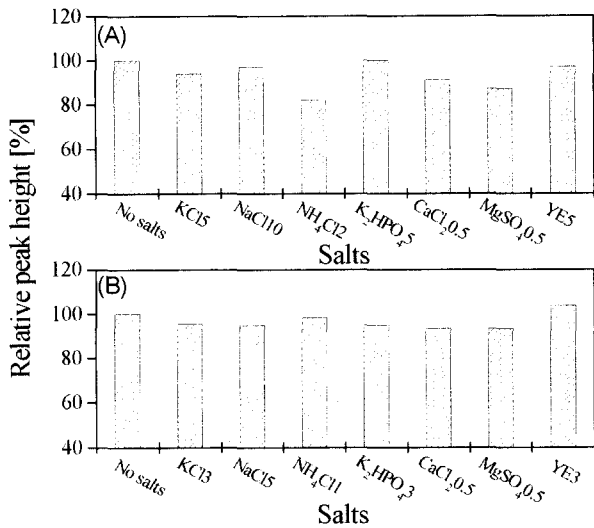


Figure 6. (A) Relative peak heights in the two separated cartridges system with 1 g/L starch at variations of both AMG and GOD temperature(100% : 29°C), (B) Relative peak heights in the two separated cartridges system with different AMG temperature (100% : 43°C), but room temperature for GOD (C) Relative peak heights in the single cartridge system with 0.5 g/L starch at different temperature. (100% : 31°C)

나타냈으나 35°C 이상에서는 피크의 진동현상이 나타났으며 효소의 활성이 감소하였다. 한편, AMG만 온도를 변화시켰을 때 43°C에서 최적의 피크를 보였으며 50°C 이상에서는 효소의 활성이 최대값보다 30% 이상 감소하였다.

단일 효소 반응기의 경우 0.5 g/L의 전분 농도에 대한 반응액의 유량에 따른 피크 변화는 두 개의 효소 반응기를 각각 설치하여 전분의 농도를 측정된 결과와 비슷한 경향을 나타냈고(Figure 4(B)), pH 변화에 대한 효소의 활성 역시 pH 4에서 최적의 활성을 유지하였다(Figure 5(B)). 온도 변화에 따른 효소활성 변화는 31°C에서 최대값을 보였으며(Figure 6(C)), 40°C 이상에서는 피크의 진동현상이 발생하고 효소의 활성이 감소되었다.



**Figure 7.** (A) Relative peak heights of 1 g/L starch in absence and presence of different salts dissolved in the sample solution (100% : no salts, two separated cartridges system), (B) Relative peak heights of 0.5 g/L starch (100% : no salts, single cartridge system), (YE : yeast extract) Number means concentration of each component.

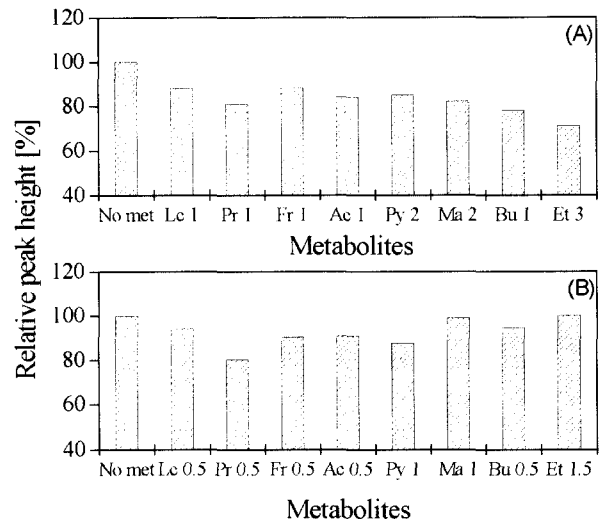
발효액 중에 포함된 각종 성분 즉, KCl(5 g/L), NaCl(10 g/L), NH<sub>4</sub>Cl(2 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 g/L), CaCl<sub>2</sub>(0.5 g/L), MgSO<sub>4</sub>(0.5 g/L), yeast extract(5 g/L)를 분석시료인 전분 1 g/L와 함께 두 개의 효소 반응기를 따로 설치한 FIA 장치에 주입하여 피크의 변화를 관찰하였다(Figure 7(A)). 순수한 전분만을 시료로 사용하는 경우와 비교할 때 각종 성분이 존재하는 경우 피크의 높이는 82~100%까지 비교적 큰 차이를 보였다. 또한, lactate(1 g/L), propionate(1 g/L), formate(1 g/L), acetate(1 g/L), pyruvate(2 g/L), malate(2 g/L), butyrate (1 g/L), ethanol(3 g/L) 등 각종 대사물질이 분석시료에 존재하는 경우 대사물질을 포함하지 않은 분석시료 전분(1 g/L)에 비하여 10~17% 가량 피크높이가 감소하였고, 특히 ethanol (3 g/L)은 20% 이상 피크 높이가 감소하였다(Figure 7(B)).

그러나, 단일 효소 반응기를 사용한 AMG/GOD-FIA에서 전분 0.5 g/L를 발효액 성분인 KCl(3 g/L), NaCl(5 g/L), NH<sub>4</sub>Cl(1 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(3 g/L), CaCl<sub>2</sub>(0.5 g/L), MgSO<sub>4</sub>(0.5 g/L), yeast extract(3 g/L)와 함께 분석하였을 때 염의 성분이 존재하지 않은 경우에 비해 피크높이의 감소는 10% 이하였다(Figure 7(B)). 또한, 대사물질 성분인 lactate(0.5 g/L), propionate (0.5 g/L), formate(0.5 g/L), acetate(0.5 g/L), pyruvate(1 g/L), malate(1 g/L), butyrate(0.5 g/L), ethanol(1.5 g/L)이 전분(0.5 g/L)에 첨가되었을 때 피크의 높이는 propionate(20%)를 제외하고는 효소의 활성이 크게 감소되지 않았다(Figure 8(B)). 에탄올 (1.5 g/L)의 경우에도 피크 높이의 변화가 거의 없었다.

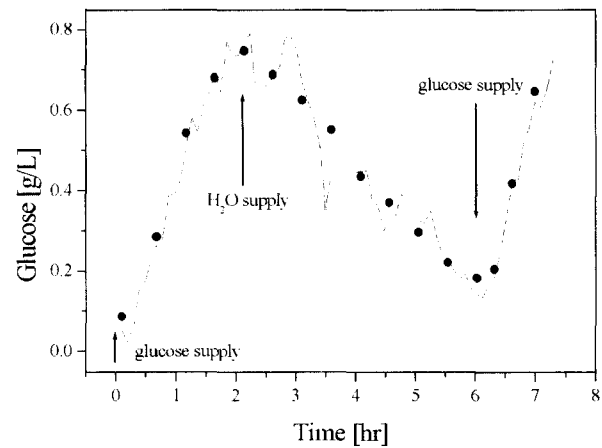
**글루코오스 및 전분의 온라인 모니터링**

<글루코오스의 온라인 모니터링>

GOD-FIA 시스템을 이용한 글루코오스의 온라인 모니터링은 증류수 200 mL을 함유한 소형 반응기에서 수행되었다. 실험 초기에는 0.7 mL/min의 유속으로 2 g/L의 글루코오스를 반응기에 주입하였고, 2시간 후 글루코오스 대신 증류수



**Figure 8.** (A) Relative peak heights of 1 g/L starch in absence and presence of different metabolites dissolved in the sample solution (100% : no metabolites, two separated cartridges system), (B) Relative peak heights of 0.5 g/L starch (100% : no metabolites, single cartridge system), (Lc : lactate, Pr : propionate, Fr : formate, Ac : acetate, Py : pyruvate, Ma : malate, Bu : butyrate, Et : ethanol) Number means concentration of each component.



**Figure 9.** On-line monitoring of glucose in a simulated bioprocess by a GOD-FIA system.

를 주입하여 반응기내 글루코오스의 농도를 감소시켰다. 다시 6시간 후 글루코오스(2 g/L)를 반응기에 재주입하여 글루코오스의 농도를 증가시켰다(Figure 9). 실험중 반응기로부터 용액을 0.7 mL/min로 일정하게 배출하여 반응기 부피를 유지하였다. GOD-FIA에 의해 글루코오스의 농도를 온라인 모니터링(GOD:50 U, cycle time:350sec)한 결과는 오프라인 분석값과 비교하였는데, 오프라인 분석은 분석시약으로 p-hydroxybenzoic acid hydrazid, 염산(35%), 수산화나트륨과 EDTA를 이용한 PHBAH 방법(6)으로 분광광도계(Shimadzu UV-160)를 이용하여 410 nm에서 수행하였다. GOD-FIA에 의한 글루코오스의 온라인 모니터링 결과는 FIA 관내에서 거품(bubble)이 생성되어 피크가 일부 감소하였으나 오프라인 분석과 비교하여 평균 6% 이내에서 잘 일치하였다.

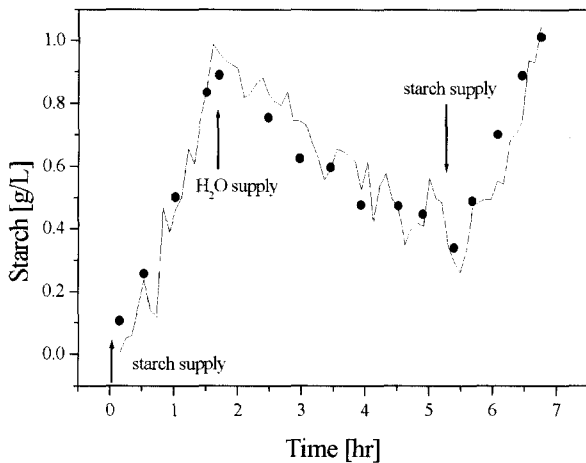


Figure 10. On-line monitoring of starch in a simulated bioprocess by a AMG/GOD-FIA system with single cartridge.

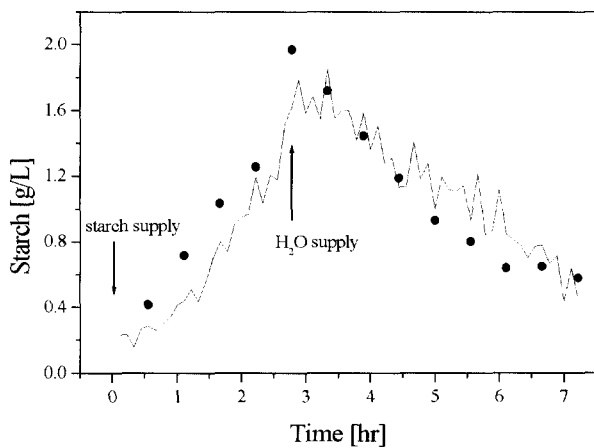


Figure 11. On-line monitoring of starch in a simulated bioprocess by a AMG/GOD-FIA system with two separated cartridges.

#### <전분의 온라인 모니터링>

증류수 200 mL을 함유한 소형 반응기에 전분(4 g/L(Figure 10), 2 g/L(Figure 11))과 증류수를 0.7 mL/min로 반응기에 유입 및 유출하여, GOD-FIA의 온라인 모니터링 공정과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 전분 농도의 온라인 모니터링은 두 개의 효소 반응기를 이용하는 경우 AMG는 500 U, GOD는 50 U, 그리고 cycle time은 400 sec로 하여 7시간 동안 모니터링 하였고(Figure 10), 단일 효소 반응기를 사용한 경우 AMG 1000 U, GOD 100 U, cycle time은 350 sec에서 온라인 모니터링하였다(Figure 11). AMG/GOD-FIA에 대한 온라인 모니터링 결과는 페놀과 반응한 표준시료(전분)에 진한 황산을 첨가하여 유색반응이 발생하는 Dubois의 비색법(6)으로 분광광도계 480 nm에서 오프라인 분석하였다. 그 결과 GOD-FIA에 비하여 오차가 다소 크게 발생하였는데 특히, 두 개의 효소 반응기를 이용한 모니터링 결과는 오프라인 분석과 평균 10% 가량 오차가 발생하였다. 그러나, 단일 효소 반응기의 경우 평균 6% 오프라인 분석과 차이가 있으므로 단일 효소 반응기를 이용하여 전분의 농도를 온라인 모니터링하는 것이 보다 효과적임을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 생물공정에서 주요 기질로 이용하는 글루코오스와 전분을 온라인 모니터링하기 위하여 GOD, AMG를 이용한 흐름주입분석(Flow Injection Analysis : FIA) 기술을 개발하였고, 효소활성 변화를 비교, 고찰하였다. 특히, epoxy 고분자 담체에 고정화된 GOD-FIA와 AMG/GOD-FIA 장치의 성능을 조사하였고, FIA의 조작온도, pH, 운반용액의 첨가제, 염 그리고 각종 신진대사물질의 고정화된 GOD, AMG의 활성에 대한 영향을 고찰하였다. GOD-FIA와 AMG/GOD-FIA 장치를 이용하여 소형 반응기내 글루코오스와 전분의 농도 변화를 온라인 모니터링하였다. GOD-FIA에 의한 온라인 모니터링 결과는 오프라인 분석과 비교적 잘 일치하였으며, AMG/GOD-FIA에 의한 전분 농도의 온라인 모니터링은 단일 효소 반응기를 사용한 경우 두 개의 효소 반응기를 사용한 경우보다 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

## 감 사

이 논문은 1999년 전남대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되어 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Karl Schügerl (2001), Progress in monitoring, modeling and control of bioprocess during the last 20 years, *J. Biotechnol.*, **85**, 149-173.
- Ruzicka J. and E. H. Hansen (1975), Flow Injection Analysis. part I. A new concept of fast continuous analysis, *Anal. Chim. Acta.*, **78**, 145-157.
- Jens J. van der pol, Cornelis D. de Gooijer, Manfred Biselli, Christian Wandery, and Johannes Tramper (1996), Automation of selective assays for on-line bioprocess monitoring by flow-injection analysis, *Tibtech.*, December, **14**.
- Vlastimil Kuban (1992), Gas diffusion permeation flow injection analysis Part I. principles and instrumentation, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **23**(5), 323-354.
- 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.
- Umoh. E. (1993), Development of FIA-systems for on-line monitoring of starch cellulose and amygdalin concentrations, Ph.D. Thesis, Dept. of Chemical Technology, University of Hannover, Germany.
- A.B.van Putten, F. Spitzenberger, G. Kretzmer, B. Hitzmann, M. Dors, R. Simuits, and K. Schügerl (1996), Improvement of the production of subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor, *J. Biotechnol.*, **49**, 83-93.
- Milardovic. S, I. Kruhac, D. Ivekovic, V. Rumenjak, M. Tkalcec, and B.S. Garbaric (1997), Glucose determination in blood samples using flow injection analysis and an

- amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized on hexacyano-ferrate modified nickel electrode, *Anal. Chim. Acta.*, **350**, 91-96.
9. Vodopivec. M, M. Berovic, J. Jancar, A. Pedgornik, and A. Strancar (2000), Application of convective interaction media disks with immobilised glucose oxidase for on-line monitoring for on-line glucose measurements, *Anal. Chim. Acta.*, **407**, 105-110.
  10. Fumio. M, Y. Sato, Y. Hirata, and S. Yabuki (1998), Highthroughput flow-injection analysis of glucose and glutamate in food and biological samples by using enzyme/polyion complexbilayer membrane-based electrodes as the detectors, *Biosensor and Bioelectronics.*, **13**, 809-815.
  11. Schindler. R, B. Lendl, and R. Keller (1998), Simultaneous determination of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase activities using flow injection analysis with fourier transform infrared spectroscopic detection and partial least-squares data treatment, *Anal. Chim. Acta.*, **366**, 35-43.
  12. Schügerl. K, B. Hitzmann, H. Jürgens, T. Kullick, R. Ulber, and B. Weigal (1996), Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control, *Tibtech.*, Jan, **14**.
  13. Rhee. J. I (1998), On-line monitoring of glucose and acetate by flow-injection analysis in *E. Coli* fermentation process, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 244-250.
  14. Gang G, J. H. Yoo, B. W. Woo, S. S. Kim, G. S. Cha, and H. H. Nam (2001), Disposable amperometric glucose sensor electrode with enzyme-immobilized nitrocellulose strip, *Talanta*, **54**, 1105-1111.
  15. Lin. C. Y and R. C. Chang (1999), Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74**, 498-500.
  16. Eroglu. I, K. Aslan, U. Gunduz, M. Yucel, and L. Yurker (1999), Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor, *J. Biotechnol.*, **70**, 103-113.
  17. Kumar. N and D. Das (2000), Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Process biochemistry*, **35**, 589-593.
  18. Mizuno. O, R. Dinsdale, and F. R. Hawkes, Tatsuya Noike (2000), Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging, *Biosource technology*, **73**, 59-65.
  19. Chum. H. L, and R. P. Overend (2001), Biomass and renewable fuels, *Fuel processing technology.*, **71**, 187-195.
  20. Rhee. J. I, and K. Schügerl (1997), The influence of metabolites on enzyme based flow injection analysis, *Anal. Chim. Acta.*, **355**, 55-62.
  21. Balcao. V. M, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, F. X. Malcata, and J. M. Guisan (2001), Coimmobilization of L-asparaginase and glutamate dehydrogenase onto highly activated supports, *Enz. Microb. Technol.*, **28**, 696-704.
  22. Yubin. G, Y. Wang, H. Zhou, S. Wang, Y. Tong, and W. Li (1999), Coimmobilization of glucoamylase and glucose isomerase by molecular deposition technique for one-step conversion of dextrin to fructose, *J. Biotechnol.*, **67**, 33-40.
  23. Umoh. E. F, A. B. Van Putten, and K. Schügerl (1996), Simultaneous on-line monitoring process using an FIA system, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **67**, 276-280.
  24. Cabral. J. M. S, J. F. Kennedy, and J. M. Novais (1982), Investigation of the operational stabilities and kinetics of glucoamylase immobilized on alkylamine derivatives of titanium(IV)-activated porous inorganic supports, *Enz. Microb. Technol.*, **4**, 343-348.
  25. Bahar. T and S. S. Celebi (1998), Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles, *Enz. Microb. Technol.*, **23**, 301-304.
  26. Arica. M. Y, H. Yavuz, S. Patir, and A. Denizli (2000), Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor, *Journ. Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **11**, 127-138.
  27. Sambamurthy. J and M. Vijaya (1987), Covalent attachment amyloglucosidase on magnetic iron oxide-optimization of the immobilization parameters, *Journ. Microb. Biotechnol.*, **2**, 15-21.
  28. Junichi. I, T. Matsuyama, and H. Yamamoto (2000), Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surfaces modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVD, *Biochem. Eng. J.*, **5**, 179-184.