

대장균 발효공정에서 흐름주입분석을 이용한 글루코스와 초산의 온라인 모니터링

이 종 일

하노바대학교, 공업화학연구소
(접수 : 1997. 12. 1., 게재승인 : 1997. 12. 20.)

On-line Monitoring of Glucose and Acetate by Flow-Injection Analysis in *Escherichia coli* Fermentation Process

Jong Il Rhee

Institute of Technical Chemistry, University of Hannover, Callinstr. 3, D-30167 Hannover, Germany
(Received : 1997. 12. 1., Accepted : 1997. 12. 20.)

Flow-injection analysis (FIA) systems for on-line monitoring of glucose and acetate are described and employed in *E.coli* fermentation process. Glucose oxidase (GOD) for the detection of glucose is immobilized on epoxy polymer support, which is packed in a small cartridge, and applied to a GOD-FIA system. The detection of acetate is based on the inhibition of acetate to the oxidation of sarcosine by sarcosine oxidase (SOD). SOD is also immobilized on epoxy polymer support and used for a SOD-FIA system. GOD-FIA system is characterized as well as SOD-FIA system by the investigation of the effects of pH, temperature and metabolites in samples on the peak height. GOD-FIA and SOD-FIA systems were also applied for on-line monitoring of the concentrations of glucose and acetate in *E.coli* cultivation on minimal defined medium and complex medium. On-line measurements by FIA were in good agreement with off-line measurements.

Key words: flow-injection analysis, bioprocess monitoring, *E.coli*, glucose, acetate

서 론

생물공정에서 미생물의 성장을 촉진시키고 그 생산성을 증대시키기 위해 pH, pO₂, 온도 및 CO₂ 등을 온라인 모니터링 하고 최적조건으로 유지해야한다. 특히 미생물의 cell mass, 기질 및 신진대사물의 농도 등을 온라인 모니터링 함으로써 생물반응기 내 미생물의 신진대사과정을 쉽게 이해하고 생물공정을 최적화 할수있다(1-7). 많은 생물공정에서 주요한 탄소원으로 사용되는 글루코스는 미생물의 성장, 단백질 생산 등에 중요한 역할을 한다. 대장균 발효공정에서도 주요한 탄소원으로 사용되고 있는 글루코스는 대장균내에서 신진대사의 부산물으로써 초산을 생산한다(8-11). 한편, 생산된 초산은 대장균의 성장을 저해하며 생산성을 저하시키므로 초산의 생성을 막기 위해 여러가지 유전학적인 또는 생물공학적인 방법이 연구, 적용되고 있다(12-17). 이와 같이, 대장균 발효공정에서 주요한 탄소원인 글루코스 와 신진대사의 부산물인 초산을 온라인 모니터링 하는 것은 대장균의

성장상태 및 그 생산성을 연구하는데 매우 중요하다.

생물 반응기내 기질 또는 생산물의 농도를 온라인 모니터링하기 위해 최근 흐름주입분석(Flow injection analysis) 기술이 많이 연구 되고있다(1.5-7.18). 이 방법은 짧은시간에 많은 분석시료를 자동적으로 측정할수 있으므로 생물센서와 결합하여 사용시 그 적용범위가 매우 넓다. 그러나, 실제 생물공정을 흐름주입 분석 기술에 의해 온라인 모니터링한 경우는 별로 많지 않다. Brand(19), Kullik(20)등 은 전기화학적 소자의 박막에 글루코스 산화효소(Glucose oxidase, GOD)를 고정화한 반도체형 센서인 GOD-FET 를이용하여 대장균 발효공정에서 글루코스를 온라인 모니터링 하였다. 또, Brandes(21,22), Juergens(23,24)등 은 고분자 담체 등에 GOD 를 고정화 한후, 산소전극을 이용한 전류법(Amprometry)형 센서를 이용하여 글루코스를 온라인 모니터링 하였다.

한편, Forman(25)등 은 분석시료의 pH 변화를 측정하여 초산 농도를 분석하였고, Becker(26)등 은 여러 효소(acetate kinase/pyruvate kinase/lactate dehydrogenase)를 고정화 한후 직렬로 연결하여 초산의 농도를 측정하였다. Tservistas(27)등 은 사코진 산화효소(Sarcosine oxidase, SOD)에 의한 사코진 산화반응에서 초산이 경쟁 억제제(Competitive inhibitor)역할을 하는 원리를 이용하여 분석시료중의 초산을 측정하였다. 그러나, 생물공

† Corresponding Author : Callinstr. 3, D-30167 Hannover, Germany
Tel : 0511-762-2316, Fax : (0511) 762-3004
e-mail : rhee@mbox.iftc.uni-hannover.de

정에서 글루코스와 초산을 동시에 온라인 모니터링 하는데 필요한 GOD-FIA 와 SOD-FIA 의 특성에 대해 체계적인 연구가 아직 이루어지지 않았다.

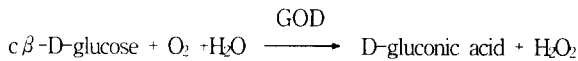
본 논문에서는 Epoxy 고분자 담체에 GOD 또는 SOD 를 고정화 한후 흐름주입분석기술에 적용한 GOD-FIA 와 SOD-FIA 의 특성을 연구하고, 최소 배양액(Minimal defined medium) 과 복합 배양액(Complex medium)을 사용한 실제 대장균 발효공정에서 글루코스와 초산의 온라인 모니터링에 관해 고찰하고자 한다.

재료및 방법

측정원리

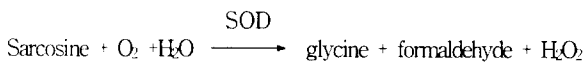
<글루코스>

글루코스는 글루코스 산화효소(GOD)와 반응하여 글루코산과 과산화수소를 생산한다. 이 반응에서 산소가 소모되는데, 소모된 산소나 생성된 과산화수소를 전류법형(Amperometry) 센서등을 사용하여 측정함으로써 글루코스 농도를 분석할 수 있다(23).



<초산>

초산은 사코진이 사코진 산화효소(SOD)와 반응시 경쟁 억제 역할을 하는 원리, 즉 초산의 농도가 증가함에따라 사코진 반응속도가 감소하는 원리를 이용하여 측정할 수 있다(27).



글루코스 농도 측정시와 같이 반응에 소모된 산소 나 생성된 과산화수소를 전류법형 센서등을 이용하여 측정함으로써 초산농도를 분석할 수 있다.

흐름주입분석장치

본 연구에 사용된 흐름주입분석장치 및 그 조작조건이 Figure 1 과 Table 1에 보여졌다. 분리막 시료채취기(ABC Co. Germany) 를 이용하여 생물반응기로부터 미생물이 없는 시료(Sample)를 시료 주입기(Injector)에 주입한다. 주입기에 주입된 시료는 운반용액(Carrier flow)에 의해 고분자등에 고정화된 효소(GOD,

Table 1. Operating conditions of FIA systems.

	GOD-FIA	SOD-FIA
carrier flow rate	1.5 mL/min	2.0 mL/min
sample flow rate	0.2 mL/min	0.2 mL/min
pH value of carrier flow	7.5	7.0
temperature	26°C	26°C
sarcosine concentration	-----	0.03 g/L
sampling loop volume	50 μL	30 μL
cycle time	300 sec	300 sec
recording frequency	2 Hz	2 Hz

SOD)가 적체되어있는 소형효소반응기를 지나 검출기(Detector)에 이른다. 시료주입기, 검출기등의 자동화 및 결과분석을 위해 컴퓨터 자동분석 및 제어시스템인 CAFCA (Computer Assisted Flow & Control Analysis)를 사용하였고, 펌프의 연동화 를 줄이기 위해 연동 완충기(Pulsation damper)를 펌프 뒤에 설치하였다.

사용된 효소 및 시약

글루코스 농도를 측정하기 위해 사용한 글루코스 산화효소 (GOD, EC 1.1.3.4) 는 *Aspergillus niger* 로부터 얻은것을 Sigma 회사 로부터 구입하였다. *Pseudomonas species* 에서 얻은 사코진 산화효소(SOD, EC 1.5.3.1)도 역시 Sigma 회사로 부터 구입하여 초산을 측정하는데 사용하였다. GOD 또는 SOD 를 고정화 하기위해서는 우선 적절한 양의 native 효소를 600 μL potassium phosphate 완충용액(0.1 몰)에 용해한후 200 mg Epoxy 고분자 담체(50 μm, Riedel de Haen Co.)가 적재된 1 mL 소형생물반응기(MobiTec Co. Germany)에 주입한다. 실온에 24 시간 방치한후 potassium phosphate 완충용액(0.1 몰)으로 씻어낸다. 사코진은 Sigma 사에서 구입하였고 그의 완충용액용 시약은 Fluka 사에서 구입하였다.

오프라인(Off-line) 분석

글루코스 농도를 오프라인 분석하기 위해 Yellow Springs Instruments 회사의 글루코스 분석기(YSI,Model 27)를 사용하였다. 또한, 초산의 농도를 측정하기위해 Perkin Elmer회사의 가스크로마토그래피(분리관은 PT 10 % SILAR 10C 로 채워짐)를 사용하였다.

대장균 발효공정

발효공정에 사용된 대장균은 JM109(DSM, Braunschweig, Germany)로써 SPA::EcoRI 제한효소를 생산하기위해 세 플라즈미드 (pEcoR4, pRK248cI, pMTC48)가 유전학적으로 cloning 되었다(28). 3 L 교반형 생물반응기를 사용하여 30 °C, pH 7.0 에서 대장균을 배양하였다. 또한, 배양액으로는 탄소원으로 5 g/L 글루코스가 용해된 최소 배양액 (6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 0.5 g/L NaCl, trace element solution) 또는 복합 배양액 (5 g/L yeast extract 를 최소 배양액에 용해함)을 사용하였으며(28), 회분배양 및 연속배양을 하

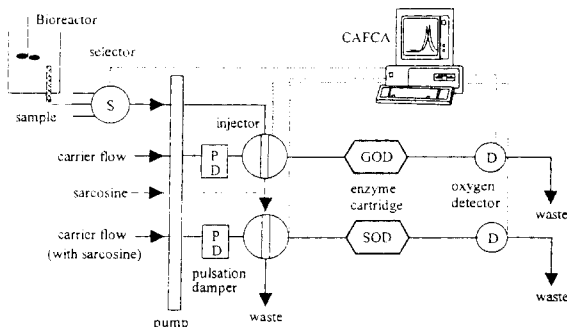


Figure 1. Two channel flow-injection analysis system.

는동안 글루코스와 초산의 농도를 온라인 모니터링 하였다.

결과 및 고찰

글루코스 농도 측정을 위한 GOD-FIA의 특성

Epoxy 고분자 담체에 고정화되어 소형생물반응기에 적재된 글루코스 산화효소(GOD)는 native GOD 보다 그 활성도가 감소하며 최적 pH 조건등이 변한다. 따라서, 고정화된 GOD를 흐름주입분석장치에 적용하여 글루코스 농도를 온라인 모니터링 하기전 그 특성을 조사하여야 한다. 고정화된 GOD의 활성도는 고정화 조건, 운반용액의 이온세기, pH 값 그리고 미생물 배양액의 염 농도 등에 따라 변하며, 이러한 특성변화는 흐름주입분석장치의 검출기에서 검출되는 신호의 높이를 측정함으로써 알 수 있다.

Juergens(23)등이 Epoxy 고분자 담체에 고정화된 GOD 에 관해 많은 연구를 하였는데, 고정화된 GOD의 활성도는 phosphate 운반용액을 사용했을때 몰 농도가 증가함에 따라 약간씩 증가했으며, KCl 용액을 사용했을때도 같은 효과가 있었다. Native GOD의 최적 pH 값은 6.5 이었으나 Epoxy 담체에 고정화했을때 최적 pH 값은 7.8로 변하였다. 또, 소량의 Triton X-100 과 같은 계면활성제를 운반용액에 혼합하였을때 고정화된 GOD의 활성도는 증가했다. 1 g/L sodium azid 나 1.5 g/L EDTA 를 phosphate 운반용액에 첨가함으로써 흐름주입분석장치에 사용하는 운반용액을 장기간 보존할 수 있는데, 이의 첨가로 인한 GOD의 활성도 감소는 없었다. 실제 발효공정에 사용되는 배양액 속에 존재하는 염(Salt)은 분석시료와 함께 흐름주입분석장치의 주입기에 주입되는데 염의 농도에 따라 검출기에서 검출되는 글루코스 신호의 높이가 변화할 수 있다. 그러나, 분석시료 속에 0.1 몰 이하의 염이 존재해 있을때 GOD-FIA 에서 글루코스 신호의 높이는 별로 영향을 받지 않았다(23). 한편, 소형생물반응기에 적재된 고정화된 GOD는 흐름주입분석장치에 사용된 운반용액 및 시료의 온도에 따라 그 활성도가 변할 수 있다. Figure 2 에는 온도에 따른 소형생물반응기내 GOD의 활성도, 즉 글루코스 신호의 높이 변화를 보였다. 온도가 높을수록 같은 농도에서 글루코스 신호의 높이가 높음을 알 수 있다. 즉, 0.3 g/L 의 글루코스를 측정하고자 했을때 소형생물반응기의 온도가 26 °C 일때는 15 °C 일때보다 3 배이상 높은 신호를 얻을 수 있었다. 한편, 대장균 발효공정에서 글루코스 의 미생물내 신진대사의 결과로써 pyruvate(Py), ethanol(Et), acetate(Ac), succinate(Su), lactate(Lc), glycerol(Gy) 등 여러 신진대사물이 생성되어 미생물밖으로 배출된다. 배양액에 존재하는 이러한 신진대사물은 GOD를 이용하여 글루코스농도를 측정할때 글루코스 신호에 영향을 끼칠 수 있다. 대장균의 유가배양(Fed-batch) 시 배양액속에 축적되는 신진대사물의 농도에 의거하여 GOD의 활성도 변화를 알아보았다(22). Figure 3 에는 0.5 g/L 글루코스에 대한 각 신진대사물의 영향을 보였다. 순수한 0.5 g/L 글루코스 신호의 높이를 100 % 로 하였을때, 8 g/L acetate, 0.5 g/L ethanol, 0.5 g/L glycerol, 3 g/L lactate, 2 g/L pyruvate 또는 0.5 g/L succinate 등의 신진대사물이 시료속에 각각 용해되어 있을때 글루코스 신호의 높이는 8 g/L acetate를 제외하고는 10 % 이내에서 크게 영향을 받지 않았다. 신진대사물(Met)이 모두 시료속에 용해되어 있을때에는 글루코스 신호의 높이는

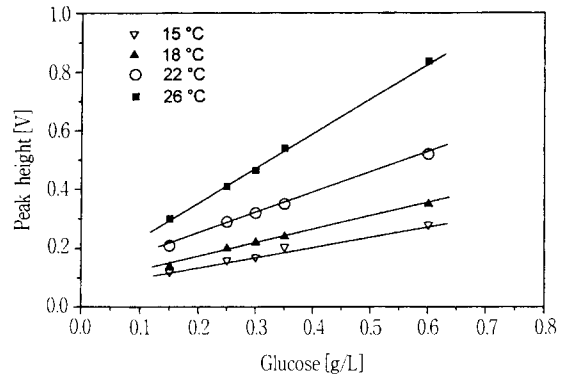


Figure 2. Effect of temperature on glucose peak height with 30 U GOD-cartridge.

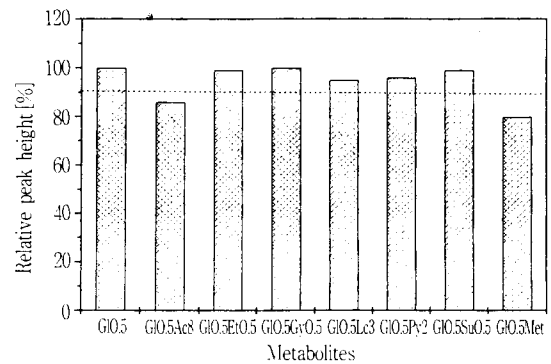


Figure 3. Effect of various metabolites on glucose peak height. (Gl : glucose Py : pyruvate, Et : ethanol, Ac : acetate, Su : succinate, Lc : lactate, Gy : glycerol. For example, Gl0.5Ac8 indicates 8.0 g/L acetate added to 0.5 g/L glucose. Met means sample which contains 0.5 g/L glucose, 8 g/L acetate, 0.5 g/L ethanol, 0.5 g/L glycerol, 3 g/L lactate, 2 g/L pyruvate, 0.5 g/L succinate dissolved)

8 g/L acetate의 영향으로 20 % 정도 감소했다(29).

GOD-FIA 에서 고정화된 GOD를 이용하여 글루코스를 온라인 모니터링 하고자 할때 운반용액으로 1.5 g/L 이하의 EDTA 가 포함된 0.1 몰이하의 phosphate 용액을 사용하는것이 적절하다. 또한, 높은 글루코스 신호를 얻기위해 본 연구의 실험 범위 (15 °C - 26 °C) 내에서 가능한 한 높은 온도(26 °C 정도)로 GOD-FIA를 조작하는것이 좋다. 한편, 0.5 g/L ethanol, 0.5 g/L glycerol, 3 g/L lactate, 2 g/L pyruvate, 0.5 g/L succinate 등의 신진대사물이 각각 분석시료에 용해되어 있을때에는 글루코스 신호에 대한 신진대사물의 영향이 크지 않았다. 그러나,고농도의 초산(8 g/L acetate)이 분석시료에 용해되어 있을때에는 이의 영향으로 같은 농도의 글루코스 검출신호가 10% 이상 감소했다. 따라서, 높은농도의 초산이 생산되는 대장균 발효공정에서 글루코스를 온라인 모니터링하기 위해서는 분석시료를 희석하든지 또는 초산이 적절히 용해되어있는 표준액으로 이에 대한 보정을 하여야 한다. 또한, 본 연구에 사용된 GOD 는 Epoxy 담체에 공유결합으로 고정화 되어 매우 안정적 이며, 0.1

물 potassium phosphate 용액에 4 °C 에 보관시 7 일후 활성도는 초기활성도의 90 % 이상에 도달했다.

초산 농도 측정을 위한 SOD-FIA의 특성

초산의 농도를 측정하기 위해 사코진 산화효소(SOD)를 Epoxy 고분자 담체에 고정화하여 1 mL 소형생물반응기에 적재하였다. 흐름주입분석장치를 이용하여 초산의 농도를 온라인 모니터링하기전 초산의 사코진반응 억제효과와 고정화된 SOD의 특성을 연구하였다.

먼저, 사코진을 운반용액에 혼합하여 초산의 농도를 측정하였는데, 1.56 g/L 초산에 의한 사코진 반응의 억제 현상을 Figure 4 에 보였다. 0.03 g/L 사코진이 혼합된 운반용액에 초산을 주입하였을때 사코진 산화반응의 억제효과에 의해 검출신호가 감소함을 볼수있다. 초산의 농도에 따라 사코진 반응억제 정도가 다르므로 검출신호의 높이가 변한다. 한편, 최적 사코진 농도는 운반용액의 유속, 주입기의 시료부피, 고정화된 SOD의 활성도, 초산의 농도 등에 따라 다르다. Figure 5 에 2 mL/min 운반용액, 30 µL 시료부피 그리고 1.56 g/L 초산시료를 사용했을때 사코진 농도에따른 초산의 신호변화를 보였는데, 0.03 g/L 사코진을 운반용액에 혼합한 경우가 가장 높은 검출신호를 보였다.

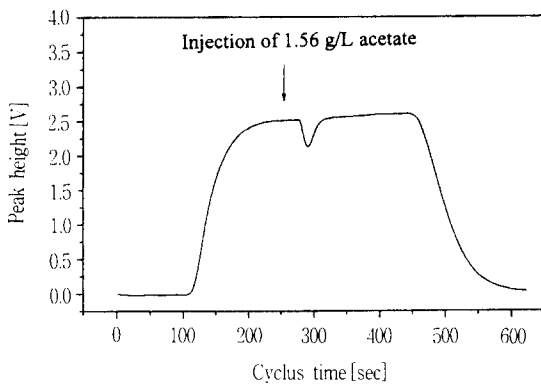


Figure 4. Detection signal during the injection of 1.56 g/L acetate in carrier buffer solution including 0.03 g/L sarcosine with 100 U SOD-cartridge.

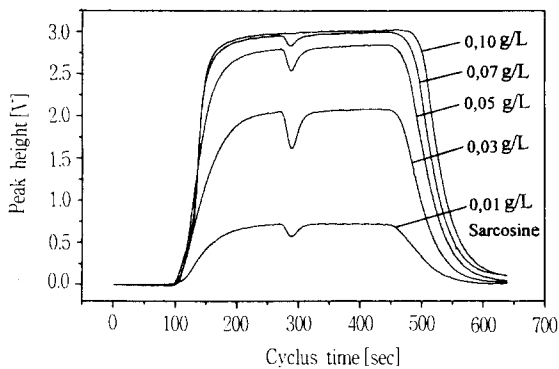


Figure 5. Dependence of signal form during the injection of 1.56 g/L acetate on sarcosine concentration in carrier buffer solution with 100 U SOD-cartridge.

0.1 g/L 사코진을 운반용액에 혼합하였을때 1.56 g/L 초산은 사코진 산화반응에 대해 억제효과를 나타내지 않았다. 한편, 초산의 신호 높이는 EDTA가 용해되어 있지않은 운반용액에서 보다 1.5 g/L EDTA가 용해되어 있는 용액에서 더 높았다. 그러나, 운반용액에 소량의 sodium azid 를 첨가하였을때 SOD의 활성도는 GOD 와는 달리 크게 감소하였다(27). 분석시료에 glucose(Gl), glycerol(Gy), lactate(Lc), pyruvate(Py), ethanol(Et), succinate(Su) 등 신진대사물(Met)이 존재할 때 각 신진대사물의 4 g/L 초산에 대한 영향을 Figure 6 에 보였다. 순수한 4 g/L 초산신호의 높이를 100 %로 하였을때, 0.5 g/L ethanol, 3 g/L glucose, 0.5 g/L glycerol, 3 g/L lactate, 2 g/L pyruvate 그리고 0.5 g/L succinate 이하의 신진대사물이 시료속에 각각 용해되어 있을때 초산의 신호 높이는 10 % 이내에서 크게 영향을 받지 않았다. 또 신진대사물이 시료속에 모두 용해되어 있을때에도 초산의 신호 높이는 10% 이내에서 크게 변하지 않았다.

한편, 0.26 g/L 의 사코진을 시료속에 직접 1 : 8 의 혼합비율로 혼합하여 (약 0.03 g/L 의 사코진) 초산의 농도를 측정했을 때 운반용액 및 시료의 온도에 따른 초산 의 신호 높이를 Figure 7 에 보였다. SOD-FIA가 26 °C 에서 조작되었을때는 31C 에서 조작될때 보다 초산의 신호 높이가 20 % 정도 감소했으나, 31 °C 에서 40 °C 사이 에서는 초산의 신호 높이가 크게 변하지 않았다. 또, 초산의 농도 및 시료의 pH 값 변화에 따른 초산의 신호 높이를 Figure 8 에 보였다. pH 값이 증가함에 따라 그리고 초산의 농도가 감소함에 따라 초산의 신호가 높았으며, 초산의 농도가 0 일때 그리고 시료의 pH 값이 8.0 일때 가장 높은 초산의 신호를 얻었다.

SOD-FIA에서 사코진을 운반용액 또는 시료속에 혼합하여 초산의 농도를 측정하는것에 대해 고찰하였다. SOD-FIA는 0.03 g/L 사코진, 1.5 g/L EDTA가 용해된 운반용액을 사용하여 31 °C 정도에서 조작하는것이 적절하다. 대장균 발효공정에서 초산을 온라인 모니터링 할 경우 반응기내 기질 또는 신진대

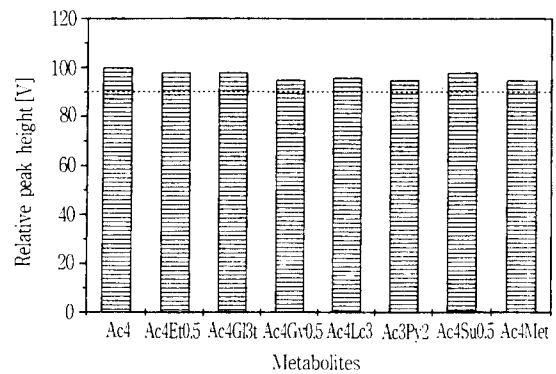


Figure 6. Effect of various metabolites on acetate peak height with 0.1g/L sarcosine and 50 U SOD-cartridge (Gl : glucose Py : pyruvate, Et : ethanol, Ac : acetate, Su : succinate, Lc : lactate, Gy : glycerol. For example, Ac4Et0.5 indicates 0.5 g/L ethanol added to 4 g/L acetate. Met means sample which contains 3 g/L glucose, 4 g/L acetate, 0.5 g/L ethanol, 0.5 g/L glycerol, 3 g/L lactate, 2 g/L pyruvate, 0.5 g/L succinate dissolved).

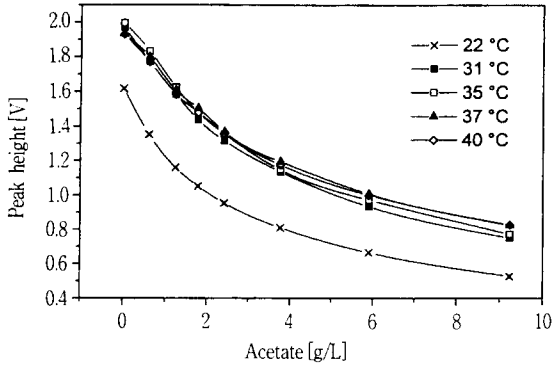


Figure 7. Effect of temperature on acetate peak height with 100 U SOD-cartridge.

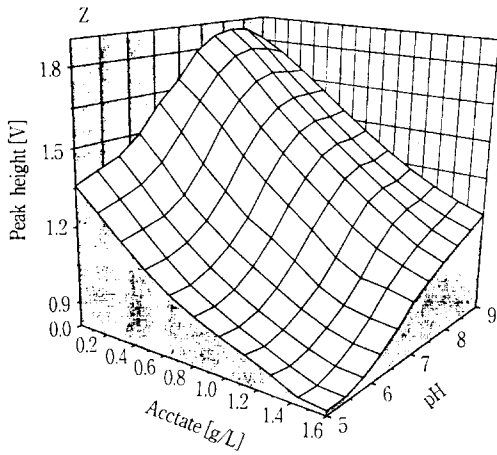


Figure 8. Dependence of acetate concentration and pH values on acetate peak height with 100 U SOD-cartridge.

사물의 농도가 0.5 g/L ethanol, 3 g/L glucose, 0.5 g/L glycerol, 3 g/L lactate, 2 g/L pyruvate 그리고 0.5 g/L succinate 이하로 배양액속에 용해되어 있을때에 초산의 검출신호는 크게 영향을 받지 않는다. 한다. 한편, Epoxy 담체에 공유 결합으로 고정화 되어있는 SOD 도 GOD 와 같이 매우 안정적 이며 4 °C 에 보관시 7 일후 활성도는 역시 초기 활성도의 90 % 이상에 도달했다.

실제 발효공정에서 글루코스 와 초산 의 온라인 모니터링

실제 대장균 발효공정에서 글루코스와 초산의 농도를 흐름주입분석장치에 의해 온라인 모니터링 하였다. Figure 9 에는 최소 배양액을 사용하여 대장균을 발효했을 때 글루코스와 초산의 농도변화를 보였으며 글루코스는 매 3 분마다 측정하였고, 초산은 0.03 g/L 사코진이 섞여진 운반용액을 사용하여 매 6 분마다 측정하였다. 정체상태(Lag phase)가 지난 9 시간 이후부터는 반응기내의 글루코스의 농도가 감소하기 시작하고 13 시간 이후부터는 초산이 생산되었다. 글루코스가 거의 다 소모된 19 시간 이후에는 1.1 g/L 의 초산이 생산되었으나, 대장균 성장을 위한 탄소원으로 사용되어 25 시간 이후에는 배양액에서 초산이 존재

하지 않았다. Figure 10 에는 5 g/L yeast extract가 용해된 복합 배양액을 사용하여 대장균을 발효했을때 글루코스와 초산의 농도변화를 보였으며 글루코스와 초산은 매 5 분마다 온라인 모니터링 하였다. 초산 측정시에는 0.26 g/L 사코진을 1:8 의 비율로 시료에 혼합하는 방법을 사용했다. 글루코스는 배양후 12 시간만에 거의 다 소모되었고 초산은 14 시간 이후에 최대농도 1.4 g/L 에 이르렀다. 18 시간 이후에는 5 g/L 글루코스가 용해된 복합 배양액을 사용하여 연속배양을 했으며, 21 시간 이후 희석속도가 0.6 hr⁻¹ 일때 글루코스는 3.5 g/L, 초산은 0.25 g/L 로 일정하게 유지되었다. 또, 희석속도를 55 시간이후 68 시간까지는 0.44 hr⁻¹, 68 시간이후에는 0.35 hr⁻¹ 로 변화시킨후 글루코스 및 초산을 온라인 모니터링 하였다. 실제 대장균 발효공정에서 흐름주입분석기술(FIA)에 의해 글루코스와 초산의 온라인 모니터링한 결과를 오프라인 분석결과와 비교했을때 6 % 이내에서 잘 일치하였다.

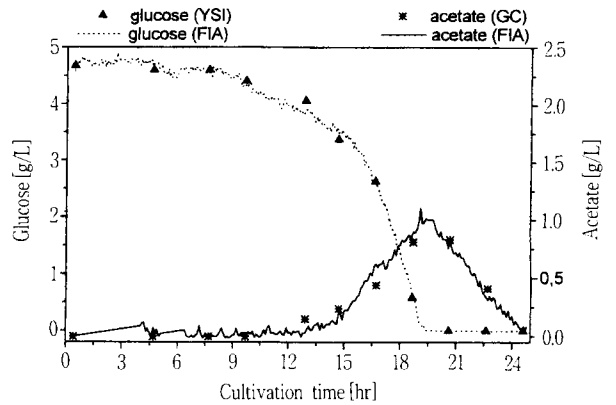


Figure 9. Time course of acetate and glucose concentration during *E. coli* fermentation on minimal medium.

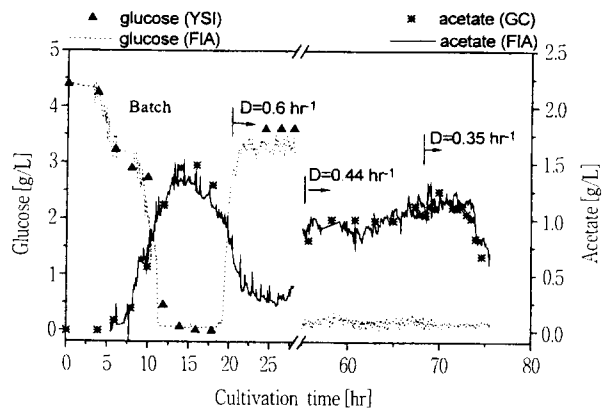


Figure 10. Time course of acetate and glucose concentration during *E. coli* fermentation on complex medium.

요 약

글루코스와 초산을 온라인 모니터링 하기위한 흐름주입분석기술이 개발되었고 대장균발효공정에 이용되었다. 또한, Epoxy 고

분자 담체에 고정화된 GOD와 SOD 를 이용한 GOD-FIA와 SOD-FIA의 특성을 연구했다. 즉, FIA 의 조작온도, 운반용액 속의 첨가제 (Triton, EDTA, natrium azid 등), 분석시료에 용해된 신진대사물의 농도, pH, 초산측정시 사코진 농도 등에 따라 고정화된 GOD와 SOD의 활성도, 즉 검출신호의 높이변화를 고찰했다. 최소배양액 과 복합배양액을 사용한 대장균 발효공정에서 글루코스와 초산을 동시에 온라인 모니터링 하였으며 그결과는 오프라인 분석결과와 잘 일치 하였다.

참 고 문 헌

1. J. J. van der Pol, C. D. de Gooijer, M. Biseli, C. Wandrey and J. Tramper (1996), Automation of Selective Assays for On-line Bioprocess Monitoring by Flow-Injection Analysis, *TIBTECH*, **14**, 471-477
2. L. H. Christensen, J. Nielsen and J. Villadsen (1991), Monitoring of Substrates and Products during Fed-batch Penicillin Fermentations on Complex Media, *Anal. Chim. Acta*, **249**, 123-130
3. M. Garn, M. Gisin, C. Thommen and P. Cevey (1989), A Flow-Injection Analysis System for Fermentation Monitoring and Control, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 423-428
4. J. Nielsen, K. Nikolajsen, S. Benthin and J. Villadsen (1990), Application of Flow-Injection Analysis in the On-line Monitoring of Sugars, Lactic Acid, Protein and Biomass during Lactic Acid Fermentations, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 165-175
5. K. Schuegerl, L. Brandes, T. Dullau, K. Holzhauser-Rieger, S. Hotop, U. Hbner, X. Wu and W. Zho (1991), Fermentation Monitoring and Control by On-line Flow-Injection Analysis and Liquid Chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **249**, 87-100
6. S. F. White, I. E. Tothill, J. D. Newman and A. P. F. Turner (1996), Development of a Mass-producible Glucose Biosensor and Flow-Injection Analysis System Suitable for On-line Monitoring during Fermentations, *Anal. Chim. Acta*, **321**, 165-172
7. T. Ding, U. Bilitewski, R. D. Schmid, D. J. Kort and E. A. Sanders (1993), Control of Microbial Activity by Flow-Injection Analysis during High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **27**, 143-158
8. G. V. Smirnova and O. N. Oktarskii (1985), Influence of Acetate on the Growth of *Escherichia coli* under Aerobic and Anaerobic Conditions, *Mikrobiologiya*, **54**, 252-256
9. G. W. Luli and W. R. Strohl (1990), Comparison of Growth, Acetate Production and Acetate Inhibition of *Escherichia coli* Strains in Batch and Fed-batch Fermentations, *Appl. Environ. Microb.*, **56**, 1004-1011
10. G. L. Kleman and W. R. Strohl (1994), Acetate Metabolism by *Escherichia coli* in High Cell Density Fermentations, *Appl. Environ. Microb.*, **60**, 3952-3958
11. H. P. Meyer, C. Leist and A. Fiechter (1984), Acetate Formation in Continuous Culture of *Escherichia coli* K12 D1 on Defined and Complex Media, *J. Biotechnol.*, **1**, 355-370
12. K. B. Konstaninov, N. Nishio and T. Yoshida (1990), Glucose Feeding Strategy Accounting for the Decrease Oxidative Capacity of Recombinant *Escherichia coli* in Fed-batch Cultivation for Phenylalanine Production, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 253-260
13. G. I. Kleman, J. J. Chalmers, G. W. Luli and W. R. Strohl (1991), Glucose-stat, a Glucose-controlled Continuous Culture, *Appl. Environ. Microb.*, **57**, 918-923
14. K. Han, J. Hong and H. C. Lim (1993), Relieving Effects of Glycine and Methionine from Acetic Acid Inhibition in *Escherichia coli* Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 316-324
15. J. C. Diaz-Ricci, M. Regan and R. E. Bailey (1991), Influence of Expression of the *pet* Operon on Intracellular Metabolic Fluxes of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 59-65
16. N. N. Dedhia, T. Hottiger and J. E. Bailey (1994), Overproduction of Glycogen in *Escherichia coli* Blocked in the Acetate Pathway Improves Cell Growth, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 132-139
17. K. Hosono, H. Kakuda and S. Ichihara (1995), Decreasing Accumulation of Acetate in a Rich Medium by *Escherichia coli* on Introduction of Genes on a Multicopy Plasmid, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 256-261
18. K. Schuegerl, B. Hitzmann, H. Jurgens, T. Kullick, R. Ulber and B. Weigel (1996), Challenges in Integrating Biosensors and FIA for On-line Monitoring and Control, *TIBTECH*, **14**, 21-31
19. U. Brand, B. Reinhardt, F. Ruether, T. Scheper and K. Schuegerl (1990), Bio Field Effect Transistors as Detectors in Flow-Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **238**, 201-210
20. T. Kullick, M. Beyer, J. Henning, T. 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
21. L. Brandes, X. Wu, H. Maschke, H. Juergens, B. Reinhardt and K. Schuegerl (1993), Production of Fusion Protein SPA::EcoRI in Batch Culture in a 60-L Airlift Tower Loop Reactor, *Biotechnol. Prog.*, **9**, 122-128
22. L. Brandes, X. Wu, J. Bode, J. I. Rhee and K. Schuegerl (1993), Fed-batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* JM 103 and Production of the Fusion Protein SPA::EcoRI in a 60-L Working Volume Airlift Tower Loop Reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 205-212
23. H. Juergens, 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
24. H. Juergens, 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
25. G. W. Forman, B. D. Thomas and F. S. Jacobson (1991), Novel Flow-Injection Analysis Method for Bioprocess Monitoring, *Anal. Chim. Acta*, **249**, 77-86
26. T. Becker, R. Kittsteiner-Eberle, T. Luck and H.-L-Schmidt (1993), On-line Determination of Acetic Acid in a Continuous Production of *Acetobacter aceticus*, *J. Biotechnol.*, **31**, 267-275
27. M. Tservistas, B. Weigel and K. Schuegerl (1995), An On-line Flow-Injection Analysis System for the Determination of Acetate, *Anal. Chim. Acta*, **316**, 117-120
28. J. I. Rhee, J. Bode, J. C. Diaz-Ricci, D. Pooch, B. Weigel, G. Kretzmer and K. Schuegerl (1997), Influence of the Medium Composition and Plasmid Combination on the Growth of Recombinant *Escherichia coli* JM 109 and on the Production of the Fusion Protein EcoRI::SPA, *J. Biotechnol.*, **55**, 69-83
29. J. I. Rhee and K. Schuegerl (1997), The Influence of Metabolites on Enzyme-Based Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **355**, 55-62