마이크로플레이트 기반 생물반응기 시스템 (MABOOMS™)을 이용한 대장균 배양공정에서 용존산소, pH 및 세포농도의 온라인 모니터링 연구

손옥재, 이종일*

Study on Online Monitoring of Dissolved Oxygen, pH and Cell Concentration in *E. coli* Cultivation Processes Using MABOOMS™

Ok-Jae Sohn and Jong Il Rhee*

접수: 2012년 12월 10일 / 게재승인: 2013년 1월 29일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Dissolved oxygen, pH and cell concentration have been online monitored in cultivation processes with *Escherichia coli* by using a MABOOMS™ (microplate-based bioreactor with optical online monitoring systems). Fluorescent sensing membranes containing Ru (dpp)₃²⁺ or HPTS were prepared with GA sol-gel matrix and coated into a well of a 24-well microplate. Fluorescence intensity was measured and correlated to the dissolved oxygen or pH. Cell concentrations were also online monitored by measuring optical reflectance at 650 nm. A well of a 24-well microplate could also be divided into 4 parts, each of which was coated with fluorescent sensing membranes for the detection of dissolved oxygen or pH. The 24-well microplate coated with fluorescent sensing membranes or a 4-divided sensing membrane, was used to online monitor the dissolved oxygen, pH and cell concentration during *E. coli* cultivations. The online monitoring results showed the characteristics of cell growth in cultivation processes very well.

Keywords: Online monitoring, Dissolved oxygen, pH, Cell concentration, Cultivation process, Fluorescent sensing membrane, MABOOMS™

전남대학교 공과대학 응용화학공학부, 촉매연구소
School of Applied Chemical Engineering, Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea
Tel: +82-62-530-1847, Fax: +82-62-530-0846
e-mail: jirhee@jnu.ac.kr

1. 서론

최근, 다양한 균주탐색 기법의 활용을 통해 새로운 생물제품 (1차 또는 2차 대사산물, 효소, 치료단백질 (therapeutic proteins), 백신 그리고 생물 고분자 등)의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 새로운 균주의 탐색으로부터 균주생장의 최적화 및 생산물질의 수율을 증가시키기 위해 배양과정이 반복적으로 수행되며 많은 데이터가 수집되고 있다. 균주탐색 단계에서부터 많은 데이터를 얻기 위해 Stitt 등은 마이크로플레이트를 이용하여 후보 미생물을 배양하면서 용존산소 (dissolved oxygen, DO)의 농도를 온라인 모니터링 하였다 [1]. John 등은 96-웰 마이크로플레이트를 이용하여 유기산을 생산하는 미생물의 배양 중 pH와 DO를 실시간 모니터링하였다 [2,3]. 또한, Anderlei, Tolosa, Gupta 등은 플라스크를 이용한 미생물 배양에서 DO의 온라인 모니터링을 실시하였으며, Weuster-Botz 등은 플라스크 배양에서 pH를 실시간 모니터링 하는 연구를 수행하였다 [4-7]. 이들은 광학센서를 이용하여 소규모 미생물 배양 중 DO와 pH의 온라인 모니터링을 수행하였지만, 산소 공급 등이 원활한 통합형 광학 모니터링 생물반응기 시스템을 구축하지 못하여 배양에 의한 균주탐색을 기존의 플라스크 등에 의존하였다.

따라서 빠른시간 내에 많은 균주 및 각종 배양조건하에서 실험을 수행하고 많은 데이터를 얻을 수 있는 통합형 고성능 배양시스템 (integrated high-throughput cultivation system)을 개발하고자 하는 노력이 활발히 이루어졌다. 스위스의 Infors AG사에서는 6개의 실험실 규모의 생물반응기를 병렬

로 연결한 Sixfors 배양 시스템을 개발하였는데, 각각의 반응기는 개별적으로 조작이 가능한 장점을 지니고 있다. 독일의 DASGIP사에서 32개의 진탕배양 시스템에 DO 및 pH 전극을 결합한 생물반응기 공정이 개발되었다. 그러나 DASGIP사의 시스템은 고가의 DO 및 pH 전극을 사용할 뿐만 아니라 센서의 세척, 멸균 그리고 보정 등에 있어서 많은 시간이 소모된다. Weuster-Botz 등은 가스 공급이 가능한 밀리리터 규모의 소형 생물반응기 시스템을 개발하여 최대 48개의 교반이 가능한 다채널 소형 생물반응기를 구성하였다 [8]. 이들은 다채널로 형성된 소형 생물반응기 시스템에서 DO를 온라인 모니터링 하기 위해 생물반응기 바닥면에 형광염료를 코팅하는 방법을 이용하였으나, pH와 세포농도는 오프라인으로 분석하였다. 본 연구팀에서는 균주의 탐색 및 성장 최적화와 생물공정의 최적화를 위해 최근 광학 온라인 모니터링 시스템을 갖춘 마이크로플레이트 기반 생물반응기 시스템 (microplate-based bioreactor with optical online monitoring systems, MABOOMS™)을 개발하였다 [9]. 개발된 생물반응기 시스템 (MABOOMS™)은 1.5 mL의 배양부피로 미생물을 배양할 수 있는 24-웰 마이크로플레이트를 기반으로 하고 각 웰의 바닥면에 DO와 pH를 광학적으로 검출할 수 있는 형광센서막을 부착하여 미생물 배양공정을 온라인 모니터링 할 수 있도록 하였다. 또한, 650 nm의 빛을 방출하는 적색 고휘도 LED를 이용하여 세포농도를 온라인 모니터링 할 수 있도록 하였다.

본 연구에서는 MABOOMS™을 이용하여 대장균, *Escherichia coli* DH5a의 배양공정을 최적화 하기 위해 용존산소, pH, 세포농도를 온라인 모니터링 하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 마이크로플레이트 기반 생물반응기 시스템 (MABOOMS™)

미생물 배양공정을 실시간 모니터링하기 위해 사용된 마이크로플레이트 기반 생물반응기 시스템 (MABOOMS™)은 24-웰 마이크로플레이트를 이용하여 미생물을 배양하면서 용존산소, pH 등 공정 변수를 온라인 모니터링하는 시스템이다. Fig. 1에 MABOOMS™의 개략도를 나타냈는데, 반응기부 (chamber), 광학계 (optics) 및 전자회로부 (electrical circuit)로 나누어져 있으며 컴퓨터로 제어된다. 반응기부는 24-웰 마이크로플레이트, 온도조절 시스템과 교반시스템으로 구성되는데, 마이크로플레이트의 바닥면에 형광염료와 졸-겔로 구성된 센서막이 코팅, 부착되었다. 미생물 배양에 있어서 중요한 변수인 온도를 조절하기 위해 면상발열체와 공기의 흐름을 제어하기 위한 팬을 이용하여 MABOOMS™내의 온도를 일정하게 유지하였다. 광학계는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 광원으로 LED, 광검출을 위해 광증배관 (Photomultiplier tube, PMT), 여기광과 방출광의 전달을 위한 광섬유 (optical fiber) 다발 그리고 센서막으로부터 방출된 형광을 검출하기

Fig. 1. Schematic set-up of the MABOOMS™ (a) and its photo image (b). A 24-well microplate is placed inside the MABOOMS™. Four optical fiber bundle carry different wavelengths of light to the bottom of a 24-well microplate for fluorescence measurements (DO, pH and cell concentration).

위한 대역투과필터 (bandpass filter)로 구성되어 있다. 이러한 광학계는 스텝핑 모터와 타이밍 벨트에 의해서 이동됨으로써 마이크로플레이트 바닥면에 코팅된 형광 센서막의 형광세기를 측정할 수 있다. 전자회로부는 LED의 주파수를 변조하는 펄스발생기 (function generator), PMT로부터 얻어진 광학신호를 증폭하고 노이즈를 제거하는 증폭기 (lock-in amplifier)와 반응기 바닥면에 분할되어 코팅된 센서막으로의 순차적인 광 조사를 위한 스위치로 구성되어 있다.

2.2. 광학 센서막

용존산소와 pH 검출용 형광염료인 루테튬 복합체 (tris (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium (II), Ru (dpp)₃²⁺), 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS)를 각각 24-웰 마이크로 플레이트 (24-well microtiter plate, NUNC Co., Denmark)의 웰 바닥면에 고정화하기 위해 GPTMS (3-glycidoxypopyl trimethoxy silane)-APTMS (3-aminopropyl trimethoxy silane) (GA) 졸-겔을 사용하였다 [10].

Fig. 2. Schematic diagram of a 24-well microplate with 4-divided sensing membranes.

GA 졸-겔을 형성하기 위해 용매와 촉매제로는 각각 99% 에탄올과 35% HCl을 사용하였다. 각 물질의 혼합비율은 GPTMS:APTMS:Et-OH:3DW:HCl = 1.25 mL:625 μ L:2.708 mL:5.417 mL:400 μ L이며 혼합한 후 2시간 동안 교반하여 졸-겔을 제조하였다 [11]. 용존산소 또는 pH 검출용 센서막을 제조하기 위해 GA졸-겔 용액에 적당량의 Ru (dpp)₃²⁺, HPTS를 각각 혼합하였고, 마이크로플레이트의 각 웰에 20 μ L를 떨어뜨린 후 자체 개발한 코팅기 (one-well knife coater)를 사용하여 웰 바닥면에 얇게 코팅하였다. 실온에서 하루 동안 건조한 후 센서막 표면을 매끄럽게 하기 위하여 60°C에서 다시 하루 동안 건조시켜 형광센서막을 제조하였다.

한편, 하나의 마이크로플레이트를 이용하여 용존산소, pH 및 세포농도를 동시에 검출하기 위해 각 센서막이 부착된 마이크로플레이트를 Fig. 2와 같이 제작하였다. 24-웰 마이크로플레이트의 하나의 웰에 DO와 pH 센서막이 코팅되도록 하기 위해 하나의 웰을 투명필름을 이용하여 4분할하였다. 4분할된 단면 중 하나의 면을 코팅하기 위해 실험실에서 제작된 웰 지름 크기의 투명관을 이용하였는데, 관의 하단면에 코팅할 부분을 제외한 나머지 부분에 투명 필름을 접착하여 웰에 설치한 후 졸-겔 센서용액을 코팅하였다. 그림에서 4분할면의 두 면 (2/4면)은 DO 검출용 형광센서막을 코팅하였으며, 1/4면은 pH 검출용 센서막을 코팅 하였다. 그리고 나머지 1/4면은 형광염료를 코팅하지 않고 투명한 상태로 두어 반사도 (Reflectance, RF)를 측정할 수 있도록 하였다.

2.3. 미생물 및 배지

MABOOMS™를 이용한 미생물 배양 중 용존산소, pH, 세포 농도를 온라인 모니터링 하기 위해 호기성 미생물인 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. *E. coli* DH5 α 의 배양을 위한 배지 조성은 yeast extract 5 g/L; tryptone 10 g/L; NaCl 10 g/L (LB배지)로 하였다. *E. coli* DH5 α 를 고체배지의 단일 콜로니 (single colony)에서 채취하여 3 mL의 배지에서 16시간 동안 전 배양 (pre-culture, 37°C, 180 rpm) 시킨 후 24-웰 마이크로플레이트의 각 웰 배지 부피인 1.5 mL의 1%, 즉 15 μ L를 접종하였다.

2.4. 분석

용존산소 검출용 형광센서막의 검정곡선을 얻기 위해 0% 용존산소 용액으로 40 g/L의 아황산나트륨 용액을 사용하였다. 아황산나트륨 용액을 3차 증류수에 적정하여 용존산소량을 0%~100% (24°C에서 3차 증류수 내의 용존산소량)로 변화시킨 용액을 MABOOMS™으로 480 nm의 여기파장 (ex)과 600 nm의 방출파장 (em)에서 형광세기를 측정하여 용존산소농도 (%)와 형광세기의 검정곡선을 작성하였다. 한편, 용존산소의 농도를 측정하기 위해 전극형 용존산소센서 (Thermo electron Co., USA)를 이용하였다. pH 검출용 형광센서막의 검정곡선을 얻기 위해 0.1 M의 인산완충용액에 1 M HCl 또는 1 M NaOH를 첨가하여 용액의 pH를 5~10으로 조정하여 표준 pH 용액으로 사용하였다. 용액의 pH는 pH전극 (Orion Research, Inc., Cambridge, MA, USA)으로 측정하고 MABOOMS™에서 410 nm의 여기파장과 520 nm의 방출파장에서 형광세기를 측정하여 용액의 pH와 형광세기의 검정곡선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 용존산소의 온라인 모니터링

그람 음성균인 *E. coli*는 미생물 중 가장 많은 연구가 이루어지고 있으며, 생물산업에서도 매우 유용한 균주이다. MABOOMS™를 이용하고 복합배지인 LB배지에서 *E. coli* DH5 α 를 배양 하면서 용존산소의 온라인 모니터링을 수행하였다.

Fig. 3. Calibration curves between dissolved oxygen concentration and fluorescence intensity for dissolved oxygen sensing membranes at various dissolved oxygen concentrations.

용존산소 검출용 형광염료인 Ru (dpp)₃²⁺가 코팅되어진 24-웰 마이크로플레이트에 용존산소 표준용액을 각 웰 당 1 mL 씩 넣은 후, MABOOMS™를 이용하여 형광세기 값을 측정함으로써 검정곡선을 작성하였다. 24개의 웰에 코팅된 용존산소 검출용 센서막의 검정곡선 (Calibration curve)은 Fig. 3에서 보는 것과 같이 모두 동일하지 않지만, 선형에 가까웠다. 각 웰마다 형광세기 값이 다소 차이 나타나는 것은 각 웰 바닥면에 코팅되어진 센서막의 두께가 일정하지 않는 것에 기인한다. 검정곡선을 작성한 후 24-웰 마이크로플레이트를 UV하에서 24시간 동안 멸균하였다. 배양을 위해 24-웰 마이크로플레이트의 각 웰에 LB배지 1.5 mL씩을 분주한 후, 균 접종량이 1% (v/v)가 되도록 전 배양액 (pre-culture)에서 균주를 접종하였다. MABOOMS™의 운전 조건은 37°C, 교반속도 (교반형 생물반응기를 기준한 교반속도)는 400 rpm으로 하였고, 15분 간격으로 센서막의 형광세기를 측정하여 배양공정중 용존산소의 변화를 온라인 모니터링 하였다.

Fig. 4는 MABOOMS™를 이용하여 *E. coli* DH5α를 24시간 동안 LB배지에서 배양하면서 형광세기를 온라인 모니터링 하고 Fig. 3의 검정곡선을 이용하여 용존산소의 변화를 계산한 것이다. 24-웰 마이크로플레이트의 1, 3, 5열에는 *E. coli* DH5α를 접종하여 배양하였고, 나머지 2, 4, 6열은 균주를 접종하지 않고 배양액만을 넣어두었다. Fig. 4에서 MABOOMS™를 이용한 *E. coli* DH5α의 배양은 4시간에서 6시간 사이에 산소 소비 속도가 급속히 증가하여 미생물이 지수성장기로 진입

하는 것을 알 수 있었다. 그리고 배양 10-15시간 이후부터는 용존산소가 증가하여 미생물이 사멸기로 들어서는 것을 확인할 수 있다. 그러나 24개 웰에서 동일한 LB배지를 사용하여 *E. coli*를 배양하였지만 용존산소의 변화가 온라인 모니터링된 일부 웰에서 동일하지 않음을 볼 수 있다. 이는 Fig. 3의 검정곡선에서 오차 및 불균일한 센서막에 기인한 것으로 보인다.

또한, 37°C에서 24-웰 마이크로플레이트내의 복합배지에 녹아있는 초기 산소량은 100%이며, 배양 8-10시간에 접어들면서 용존산소량은 거의 5-10%에 근접하는 것을 볼 수 있다. 그러나 용존산소량이 0% 정도로 떨어지지 않는 것은 MABOOMS™를 이용한 배양공정에서 교반 등으로 인해 배지로의 산소 전달이 우수함을 의미한다.

3.2. pH의 온라인 모니터링

MABOOMS™를 이용한 *E. coli* DH5α의 배양공정에서 배양액 pH의 온라인 모니터링을 실시하였는데 초기 pH는 7.0으로 조절하였다. 균주 접종량 및 MABOOMS™의 운전은 용존산소 모니터링 실험과 동일하게 하였으며, 실험에 사용된 24-웰 마이크로플레이트는 바닥면에 형광염료 HPTS가 졸-겔 코팅되어 있다. 센서막의 검정곡선은 Fig. 5에 보였으며, 센서막이 코팅된 24-웰 마이크로플레이트는 배양에 사용하기 전 24시간 동안 UV를 조사하여 멸균하였다.

24-웰 마이크로플레이트에 *E. coli* DH5α를 배양하면서 배양액의 pH를 온라인 모니터링 한 것을 Fig. 6에 보였다. 1, 3,

Fig. 4. Online monitoring of dissolved oxygen concentrations in *E. coli* DH5α cultivation with MABOOMS™ (Row 1, 3, 5: *E. coli* DH5α cultivation, Row 2, 4, 6: blank sample, - - -: fluorescence intensity, —: dissolved oxygen).

Fig. 5. Calibration curves between solution pH and fluorescence intensity for pH sensing membranes at various pH.

Fig. 6. Online monitoring of pH values in *E. coli* DH5 α cultivation with MABOOMS™. (Row 1, 3, 5: *E. coli* DH5 α cultivation, Row 2, 4, 6: blank sample, ■-: fluorescence intensity, —: solution pH).

5일에는 1.5 mL의 LB배지에 균주를 접종하였고, 2, 4, 6일에는 균주를 접종하지 않고 1.5 mL의 배지만을 넣은 후 배양하였다. 배양액의 pH 모니터링은 15분 간격으로 하였는데 배양이 진행됨에 따라 형광세기가 처음에는 감소하였다가 증가하였는데 배양액의 pH가 약알칼리로 변화하는 것을 보여준 것이다. 즉, 초기 배양액의 pH값인 pH 7.0에서 시작되어 pH 8.0 부근까지 증가하였다. 2, 4, 6일에서 대장균을 접종하지 않은 경우, 초기 배양액이 pH 7.0으로 24시간 동안 변화 없이 일정하게 검출되어 MABOOMS™의 운전 및 광학 pH 센서막의 안정성이 우수함을 알 수 있다. 1, 3, 5일에서 균주를 접종한 후 24시간 동안 pH를 온라인 모니터링 한 경우 각 웰 별로 pH값이 변화되는 경향이 조금씩 다르게 나타나는데, 이는 배양액의 pH를 계산하기 위해 Fig. 5의 검정곡선을 이용하였고 각 웰의 센서막이 균일하지 못하고, 초기 접종되는 균주의 양 (15 μ L)이 매우 적어 접종된 균주의 개체수의 차이에 의해 초래된 것으로 생각된다.

3.3. 세포농도의 온라인 모니터링

E. coli DH5 α 의 배양 중 미생물의 개체수 변화를 온라인 모니터링 하기위해 MABOOMS™를 이용하였다. 미생물 배양 공정에서 미생물의 개체수가 증가함에 따라 배양액의 탁도가 높아지는데, 이를 측정하기 위해 본 연구에서는 광원으로 650 nm의 빛을 방출하는 고휘도 적색 LED를 MABOOMS™ 광학계의 광원 중 하나로 사용하였다. 24-웰 마이크로플레이트는 각 웰의 바닥면이 형광염료로 코팅되지 않은 투명한 것

Fig. 7. Online monitoring of reflectance (RF) at 650 nm and normalized reflectance (norm. RF = $RF_t - RF_0 / RF_0$) in *E. coli* DH5 α cultivation with MABOOMS™. (RF₀: reflectance at initial time, RF: reflectance at a time, —: reflectance, ■: norm. RF).

을 사용하였고, 30분 간격으로 반사도 (reflectance, RF)를 측정하였다.

Fig. 7에 *E. coli* DH5 α 를 배양하면서 RF를 온라인 모니터링 한 결과를 나타냈다. 미생물이 성장함에 따라 RF가 감소하는데, 이는 광원으로부터 입사되는 빛이 배양액 (미생물)에 흡수되어 광검출기로 되돌아오는 빛의 양이 감소되기 때문이다. 배양초기에는 미생물의 성장이 느리므로 RF값이 크게 변화하지 않는다. 배양초기의 반사도 (RF₀)를 기준으로 시간에 따라 모니터링된 반사도 (RF_t: reflectance at a time)를 정규화한 반사도 (normalized reflectance, Norm. RF = $(RF_t - RF_0) / RF_0$)를 계산하여 Fig. 7에 보였다. 시간에 따른 정규화 반사도 (Norm. RF) 값을 보면 초기 2.5시간 동안에는 거의 0을 나타냈으나 이후 증가하여 배양 15시간 정도에 최대값을 보였다. 이후 미생물이 사멸기에 접어들어 개체수가 감소함에 따라 Norm. RF 값이 감소함을 볼 수 있었다. 이러한 경향은 1 L 규모의 생물반응기나 플라스크를 이용한 진탕배양에서 미생물의 성장곡선과 거의 유사함을 알 수 있었다. 따라서 MABOOMS™를 이용한 RF의 모니터링은 실제 미생물 배양에서 세포농도의 온라인 모니터링에 적용할 수 있음을 알 수 있다.

3.4. 용존산소, pH 및 세포농도의 동시 온라인 모니터링

본 연구에서는 하나의 웰에 용존산소와 pH 검출용 형광센서막을 분할하여 코팅하고, 또한 그 웰의 4분의 1면은 반사도 (RF)를 측정하기 위해 투명한 24-웰 마이크로플레이트를 이

Fig. 8. Online monitoring of fluorescence intensity and reflectance for the measurement of DO, pH and cell concentration in a well with 4-divided sensing membranes in *E. coli* DH5 α cultivation with MABOOMS™. (—: DO, ■: norm. RF, ○: pH).

용하여 *E. coli* DH5 α 를 배양하는 공정에서 용존산소, pH, 세포농도를 동시에 온라인 모니터링 하였다.

MABOOMS™를 이용한 *E. coli* DH5 α 의 배양 조건은 37°C, 교반속도 400 rpm에서 수행되어졌으며, 30분 간격으로 형광세기와 반사도를 온라인 모니터링 하였고, 배양시간은 24시간으로 하였다. Fig. 8은 *E. coli* DH5 α 의 배양 중 용존산소와 pH 검출용 센서막의 형광세기 그리고 정규화 반사도를 동시에 온라인 모니터링 한 결과를 보였다. 4분할 된 센서막이 코팅된 24-웰 마이크로플레이트를 이용하여 모니터링 한 용존산소 및 pH 검출용 광학센서막의 형광세기와 정규화 반사도의 변화는 단일 형광센서막이 코팅된 24-웰 마이크로플레이트를 이용한 대장균 배양공정에서와 거의 동일한 경향을 보였다. 즉, 4분할 센서막이 코팅된 24-웰 마이크로플레이트를 이용한 *E. coli* DH5 α 배양공정에서 2-6시간 까지 용존산소 검출용 광학센서막의 형광세기가 급격히 증가하므로 (용존산소 농도가 급격히 감소) 미생물이 지수 성장기에 접어드는 것을 알 수 있으며, 배양 10시간에 최대 형광세기를 나타내므로 미생물의 개체수가 최대가 됨을 알 수 있다. 또한, 이때 정규화 반사도 (norm. RF)도 가장 높은 값을 나타냄을 볼 수 있었다. 배양액의 pH 모니터링을 위한 형광세기 변화는 단일 pH 센서막이 부착되어진 24-웰 마이크로플레이트를 이용한 *E. coli* DH5 α 의 배양 중 pH 모니터링 결과와 (즉, 초기에 형광세기가 감소하였다가 증가한후 15시간 이후부터 점차 감소하는 경향) 거의 동일하며, 플라스크를 이용

한 진탕배양기에서 *E. coli* DH5 α 의 배양 중 시간에 따른 배양액 pH변화와 동일한 양상인 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에 적용된 4분할 센서막을 부착한 24-웰 마이크로플레이트는 미생물 배양 공정에서 용존산소, pH 및 세포농도의 동시 검출을 위한 형광세기와 반사도 (RF)를 온라인 모니터링 하는데 잘 적용할 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 마이크로플레이트 기반 생물반응기 시스템 (MABOOMS™)을 이용하여 대장균의 배양공정에서 용존산소, pH와 세포농도를 온라인 모니터링 하였다. 용존산소 검출용 형광염료인 Ru (dpp) $_3^{2+}$, pH 검출용 형광염료인 HPTS를 이용한 형광센서막이 부착된 24-웰 마이크로플레이트를 이용하였다. LB복합배지를 사용한 배양공정에서 형광세기를 온라인 모니터링 하였을 때 미생물의 성장에 따라 용존산소 및 배양액 pH의 변화를 잘 관찰할 수 있었다. 또한, 형광센서막을 부착하지 않은 바닥면이 투명한 24-웰 마이크로플레이트를 사용하여 반사도 (RF)를 모니터링 하고 정규화 반사도를 계산하였을 때 그 변화는 미생물의 성장곡선 변화와 거의 동일한 경향을 보였다.

용존산소, pH 및 세포농도를 동시에 모니터링 할 수 있도록 각각의 4분할 된 센서막을 하나의 웰에 코팅한 24-웰 마이크로플레이트를 제작하여 배양공정에 사용하였는데, 단일막이 코팅된 24-웰 마이크로플레이트에 의한 공정 모니터링 결과와 거의 동일한 경향을 보였다.

따라서 하나의 마이크로플레이트를 이용하여 미생물 배양 공정에서 필수 공정변수인 용존산소, pH 및 세포농도를 동시에 모니터링 할 수 있음을 보였다. 그러나 균일하지 못한 형광 센서막으로 인해 마이크로플레이트 내 각 웰의 모니터링 결과가 일부 동일하지 않았다. 따라서 향후 균일한 두께와 형광세기를 가지는 센서막의 제작 기술 개발과 적절한 검정곡선의 작성방법 등에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것이다.

감사

이 논문은 2011년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임 (2011-0008514).

REFERENCES

1. D. T. Stitt, M. S. Nagar, T. A. Haq, and M. R. Timmins (2002) Determination of growth rate of microorganism in broth from oxygen-sensitive fluorescence plate reader measurements. *Bio Tech-*

- niques 32: 684-689.
2. G. T. John, D. Goelling, I. Klimant, H. Schneider, and E. Heinzle (2003) pH-sensing 96-well microtitre plates for the characterization of acid production by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Research* 70: 327-333.
 3. G. T. John, I. Klimant, C. Wittmann, and E. Heinzle (2003) Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnology and Bioengineering* 81: 829-836.
 4. T. Anderlei and J. Buchs (2001) Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal* 7: 157-162.
 5. L. Tolosa, Y. Kostov, P. Harms, and G. Rao (2002) Noninvasive measurement of dissolved oxygen in shake flasks. *Biotechnology and Bioengineering* 80: 594-597.
 6. A. Gupta and G. Rao (2003) A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnology and Bioengineering* 84: 351-358.
 7. D. Weuster-Botz, J. Altenbach-Rehm, and M. Arnold (2001) Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochemical Engineering Journal* 7: 163-170.
 8. D. Weuster-Botz, R. Puskeiler, A. Kusterer, K. Kaufmann, G. T. John, and M. Arnold (2005) Methods and milliliter-scale device for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28: 109-119.
 9. J. I. Rhee (2008) Korea Patent, No. 10-0860958-0000.
 10. C.-K. Kim and J. I. Rhee (2009) On-line Monitoring of microorganism cultivation processes using optical sensing membranes for simultaneous detection of dissolved oxygen and pH. *KSBB Journal* 24: 106-112.
 11. S.-Y. Kim, C.-K. Kim, O.-J. Sohn, and J. I. Rhee (2009) Monitoring of pH and dissolved oxygen in microorganism fermentation processes using 24-well microplate. *KSBB Journal* 24: 207-211.