

## Development a glucose-FIA system with a fiber optic oxygen sensor

Ok-Jae Sohn<sup>1,3,4</sup>, Tuan Hung Lam<sup>3,4</sup> and Jong Il Rhee<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Material and Biochemical Engineering,

<sup>2</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering, <sup>3</sup>BioProcess Technology lab.,

<sup>4</sup>Research Center for BioPhotonics, Chonnam National University,

Yong-Bong dong 300, 500-757 GwangJu, Republic of Korea

Tel: 82-062-530-0847, Fax: 82-062-530-0846

### Abstract

Flow injection analysis (FIA) system was developed to monitor glucose concentrations in biotechnological processes. A fiber optic oxygen sensor was used to determine consumption of oxygen concentration by reaction of immobilized glucose oxidase (GOD). The GOD was immobilized on VA-Epoxy carrier and integrated into FIA system. A calibration curve for glucose was obtained in the range of 0.5 g/L~3.0 g/L.

### 1. 서 론

생물공정에서 기질 및 생산물을 모니터링하기 위해 액체크로마토그래피 (LC; Liquid Chromatography) 또는 흐름주입분석 기술 (FIA; Flow Injection Analysis) 등이 개발되어져 왔다. LC의 경우 시료의 분리와 검출을 위해 고가의 컬럼과 각종 검출기를 필요로 한다. FIA의 경우 LC와 비교하여 더욱 간단한 장치로 구성되어 있지만 시료의 검출을 위해 복잡한 시스템의 검출기가 필요하다. 각종 화학물질 또는 생물시료를 분석하기 위해 광학검출기가 널리 사용되어져 왔다. 그러나 이러한 검출시스템은 부피가 클 뿐만 아니라 가격이 비싸다. 따라서 소형 분석시스템에 사용하기에 부적합하다. 그리고 일반적으로 글루코오스 산화효소를 이용한 글루코오스 농도의 모니터링에는 산소전극이 사용되어져오고 있다. 그러나 전극은 외부의 전자기에 민감하고, 흐르는 유체내에서 사용할 때 간헐적으로 유입되는 공기방울에 의해 측정오차를 유발한다. 광섬유 센서는 전극과 비교하여 전자기장에 영향을 받지 않으며, 높은 감도, 작은 크기 그리고

특히 생물공정에 이용할 때 멸균이 가능한 센서이다. 따라서 최근에는 검출시스템을 소형화하고 저가의 비용으로 제작 및 생산할 수 있는 광섬유센서들이 연구 개발되어지고 있다. 광섬유 센서는 일반적으로 광섬유 말단에 형광염료 (fluorescent dye)를 고정화하여 물질을 분석하는 센서이다. 본 연구에서는 glucose oxidase (GOD)를 고정화하고, GOD가 고정화된 소형효소반응기를 도입한 글루코오스 모니터링용 FIA 시스템을 개발하였다. 그리고 산화효소반응에 의해 감소된 산소량을 광섬유 산소센서를 이용하여 검출하였다.

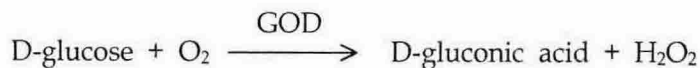
## 2. 재료 및 방법

### 효소 및 시약

포도당의 모니터링을 위해서 glucose oxidase(GOD; E.C. 1.1.3.4 from *Aspergillus niger*, Boehringer mannheim)을 이용하여 효소반응을 수행하였고, 고정화 담체로는 VA-Epoxy E3(50  $\mu\text{m}$ , pore volume 1.3 mL/g, bulk density 0.32 g/mL, Riedelde-Haen Co.)을 사용하였다. 그리고 운반용액으로는  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4.3 g/L, NaCl 3.0 g/L, EDTA 1.5 g/L를 사용하였다. 그 외의 시약은 분석용을 사용하였다.

### 측정원리

포도당은 산화효소인 GOD와 반응하여 글루콘산과 과산화수소를 생산한다. 이 반응에서 산소가 소모되는데 소모된 산소의 농도를 광섬유 산소센서로 측정함으로써 포도당의 농도를 검출할 수 있다.



### 광섬유 산소센서의 제작

직경 2 mm의 플라스틱 광섬유 끝부분의 피복 5 mm를 벗겨내고 말단에 산소 분자에 의해 형광감쇄 (fluorescence quenching)를 일으키는 Tris(2,2'-bipyridine)

ruthenium (II)-chloride (RuBPY)를 투명한 실리콘으로 고정화하였다. 그리고 외부로부터 유입되는 빛을 차단하기 위해 형광염료가 고정화되어 있는 광섬유 말단을 검정색 실리콘으로 피복하여 광섬유 산소센서를 제작하였다. 사용한 형광

물질은 excitation 470 nm/ emission 580 nm에서 형광을 발하며 산소 농도의 증가에 따라 형광세기는 감소한다. 형광을 검출하기 위해 470 nm 파장의 빛을 발하는 청색 LED를 광원으로 사용하였고, 580 nm의 빛을 측정하기 위해 photodiode를 사용하였다.

### 효소의 고정화 및 FIA 시스템

본 연구에서 사용한 효소는 예폭시 고분자 담체에 공유결합하여 고정화 하였다. 100 units과 50 units의 GOD를 600  $\mu$ l 인산수소칼륨 용액(pH 7.0, 1 M)에 용해한 후 220 mg의 VA-Epoxy 담체가 적재된 소형 효소반응기에 주입하였다. 효소의 고정화를 위해 효소반응기를 상온에서 3일간 방치한 후 0.1 M의 인산수소칼륨 완충용액으로 세척한 후 효소반응기는 FIA 장치에 결합하여 사용할 때까지 4  $^{\circ}$ C에 냉장보관 하였다.

### FIA 장치 구성 및 운전

광섬유 산소센서를 이용한 글루코오스-FIA 시스템의 장치구성을 Figure 1에 나타내었다. GOD가 고정화된 소형 효소반응기는 시료주입기와 광섬유산소센서 사이에 설치하였다. 시료는 운반용액의 흐름에 의해 주입되도록 하였다. 효소반응기내에서 반응에 의해 감소한 산소량은 광섬유 산소센서에 의해 검출되도록 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

광섬유 산소센서를 이용하여 생물 반응기내 배양액의 글루코오스 농도의 변화를 측정하기 위한 글루코오스-FIA 시스템을 개발하였다(Fig. 1). GOD 50 units, 100 units을 VA-Epoxy 담체에 공유결합 하여 실온에서 3일 동안 반응시켜 고정화하였다. 그리고 고정화 소형효소반응기를 FIA 장치에 결합하여 사용하였다. 50 units과 100 units의 GOD를 고정화 한 후 표준운전조건으로 글루코오스-FIA를 조작하였을 때 글루코오스의 농도는 0.5 g/L에서 3.0 g/L까지 분석가능 하였다(Fig. 2). 그러나 3.0 g/L 이상의 농도에서는 글루코오스 농도 증가율에 비해서 피크 증가율이 낮아졌다. 또한 운반용액의 흐름속도를 200  $\mu$ l/min ~ 600  $\mu$ l/min으로 변화시키며, 흐름속도가 광섬유 산소센서의 감도에 미치는 영향을 조사하였다. 일반적으로 산소전극을 사용하였을 경우, 흐름속도가 낮을수록 검출되는 피크는 높아진다. 그러나 광섬유 산소센서의 경우, 운반용액의 유

속의 변화에 대한 영향성은 크게 나타나지 않았다.

#### 4. 요약

본 연구에서는 광섬유 산소센서를 기반으로 글루코오스 모니터링용 FIA 시스템을 개발하였다. 운반용액의 낮은 유속에서도 검출가능 하였으며, 산소전극을 이용한 글루코오스-FIA 시스템보다 넓은 범위의 글루코오스 농도를 검출할 수 있었다. 향후, 광섬유 센서를 이용하여 생물반응기에서 기질로 사용되는 글루코오스뿐만 아니라 용존산소, pH, CO<sub>2</sub>와 같이 다양한 인자들의 모니터링 시스템을 개발하고자 한다.

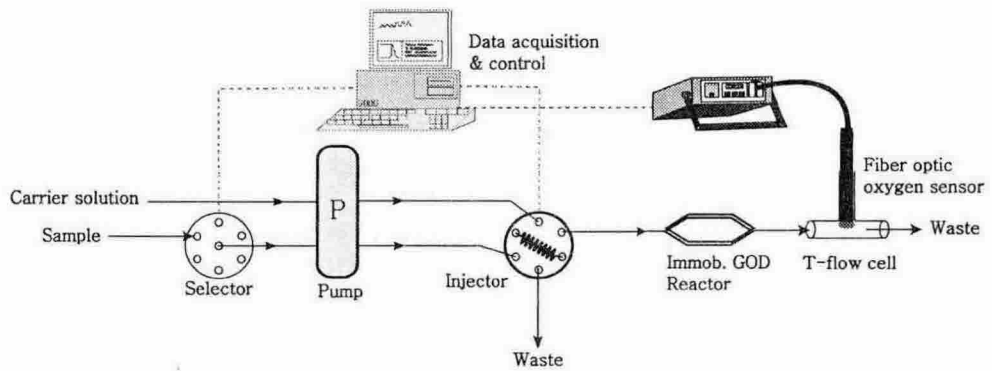


Figure 1. Schematic diagram of a FIA system used to monitor the concentration of glucose.

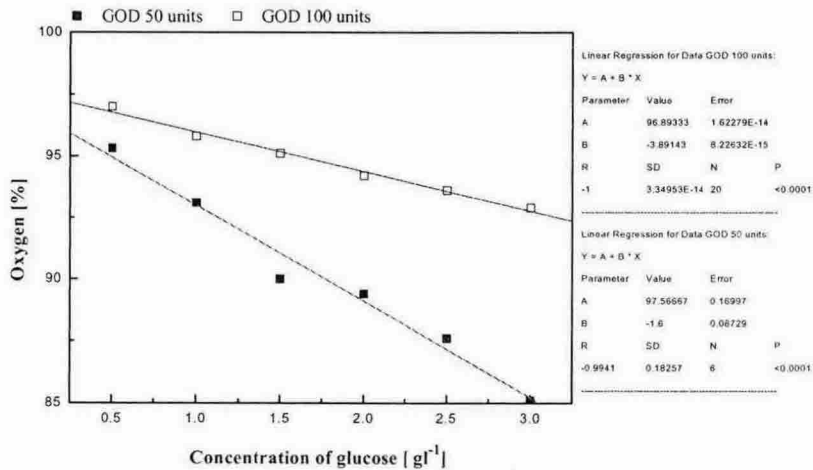


Figure 2. Effects of the immobilized enzyme amount on peak heights.

감 사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-03-03) 지원으로 수행되었음.

Reference

1. J.H. Kim, D.H. Park and J.I. Rhee, On-line Monitoring of Glucose and Starch by a Flow Injection Analysis Technique(2001), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol(16), 459-465.
2. B. Kuswandi, R. Andres and R. Narayanaswamy, Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes(2001), *Analyst*, Vol(126), 1469-1491.