

2차원 형광센서에 의한 생물공정의 모니터링

†이종일 · 정상윤 · 서국화
전남대학교, ¹화학공학부, ²물질·생물화학부
(접수 : 2001. 9. 11., 게재승인 : 2001. 10. 26.)

Monitoring of Biological Processes by 2-dimensional Fluorescence Sensor

Jong Il Rhee[†], Sang-yun Chung², and Kook-hwa Seo²

¹Faculty of Chemical Engineering

²Faculty of Materials & Biochemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

(Received : 2001. 9. 11., Accepted : 2001. 10. 26.)

This work presented the monitoring technique of biological processes by a 2-dimensional fluorescence sensor. The 2-dimensional fluorescence sensor can be used to monitor some important variable during cultivation processes simultaneously. In this study we have monitored fermentation processes of a few microorganisms such as recombinant *E. coli*, *A. terreus* and *T. vulgaris*. and investigated the changes of the fluorescence spectra in the fermentation processes qualitatively. The 2-dimensional fluorescence sensor can be also used to monitor biochemical reactions and separation processes and applied for the optimization of biological processes.

Key Words : 2-D-fluorescence sensor, monitor

서론

생물공정의 효율적인 모니터링 및 제어는 미생물의 성장 및 생산성 향상을 위한 필수 요건중의 하나이다. 특히 생물공정의 온라인 모니터링은 생물 반응기내 미생물의 대사 특성을 이해하고 공정 조작시 발생 가능한 펌프의 오작동, 오염 등 각종 문제들을 빠른 시간내에 감지, 해결할 수 있는 기회를 제공한다(1). 생물공정의 모니터링은 크게 세 가지로 구분할 수 있는데, 통상 2-3시간 간격으로 반응기로부터 시료를 채취하여 분석하는 오프라인(off-line) 모니터링, 반응기내의 시료를 연동 펌프 등에 의해 연속적으로 채취하여 2-10분 간격으로 분석하는 온라인(on-line) 모니터링 (예: 온라인 HPLC, 흐름주입분석기술 등) (2), 그리고 광학센서와 같이 생물 반응기에 직접 장착하여 반응기내의 미생물의 특성 (intracellular and extracellular components)을 매분 간격으로 연속적으로 모니터링할 수 있는 인시투(in-situ) 모니터링 (예: pH 센서등) 기술 등이 있다. 인시투 모니터링 기술은 비침투(noninvasive), 비파괴(nondestructive) 분석 기술로써 최근 광학센서의 개발과 함께 생물공정의 모니터링에 활발하게 이용되고 있다(3).

광학센서는 생물공정에 요구되는 고온 살균조건(121°C) 하에서도 성능 및 민감도의 변화가 거의 없고, 분석하고자 하는 시료를 채취하거나 소비할 필요가 없으므로 생물공정의 모니터링 및 제어에 효율적으로 사용될 수 있다(4).

생물공정의 모니터링에 사용되는 광학센서로는 미생물 성장을 모니터링하는데 많이 사용되는 turbidometer, nephelometer, UV/Vis photometer 등이 있다(4-5). 또한, 용존산소의 농도, pH 값 등을 측정하는데 지시약의 광학적 특성 변화(absorption 또는 luminescence 등)를 이용하는 광섬유 센서(fiber-optic sensor)는 생물공정의 모니터링을 위해 활발히 연구, 개발되고 있다(4). 그리고 유기물의 주요 결합인 C-H, N-H 및 O-H 기 등을 측정하는데 사용되는 적외선 분광 광도계는 생물 공정내 글리세롤, 암모니아, 초산 등의 농도를 온라인 모니터링 하는 목적으로 이용되기도 한다(5). 최근, 생물공정의 모니터링에 자주 사용되는 형광센서는 미생물내의 대사물질의 형광 특성 변화, 예를들면 340 nm에서 excitation한 후 430 nm에서 최대 emission을 발하는 NAD(P)H의 변화 등을 이용하여 생물공정내 생존 미생물의 농도를 온라인 모니터링하는데 사용되고 있다(6). 미생물내의 NAD(P)H 뿐만 아니라 배양액내에 존재하는 특정 아미노산 등의 각종 대사물질의 형광특성을 다양한 범위의 excitation 및 emission 파장을 이용하여 측정할 수 있는 2차원 형광센서 (2-dimensional fluorescence sensor)가 개발되어 생물공정내 각종 기질 또는 생산물의 농도를 온라인 모니터링 하는데 사용되고 있다(7-8). 2차원 형광센서는 Scheper 등 (7-9)이 그 개념을 소개한 이후 각종 미

†Corresponding Author : Faculty of chemical Engineering, Chonnam National University, YongBong-dong 300 Kwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1847, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

Table 1. Measurement conditions of 2-dimensional fluorescence sensor

measurement conditions	fluorescence sensor, based on F-4500 (Hitachi)
Lamp	150-W Xe
Photomultiplier voltage (V)	700
area of excitation (nm)	250-700
area of emission (nm)	280-700
setting of wavelengths	monochromator
Stepwidth of excitation and emission (nm)	10
excitation slit (nm)	10
emission slit (nm)	10
scan speed (nm/min)	30000

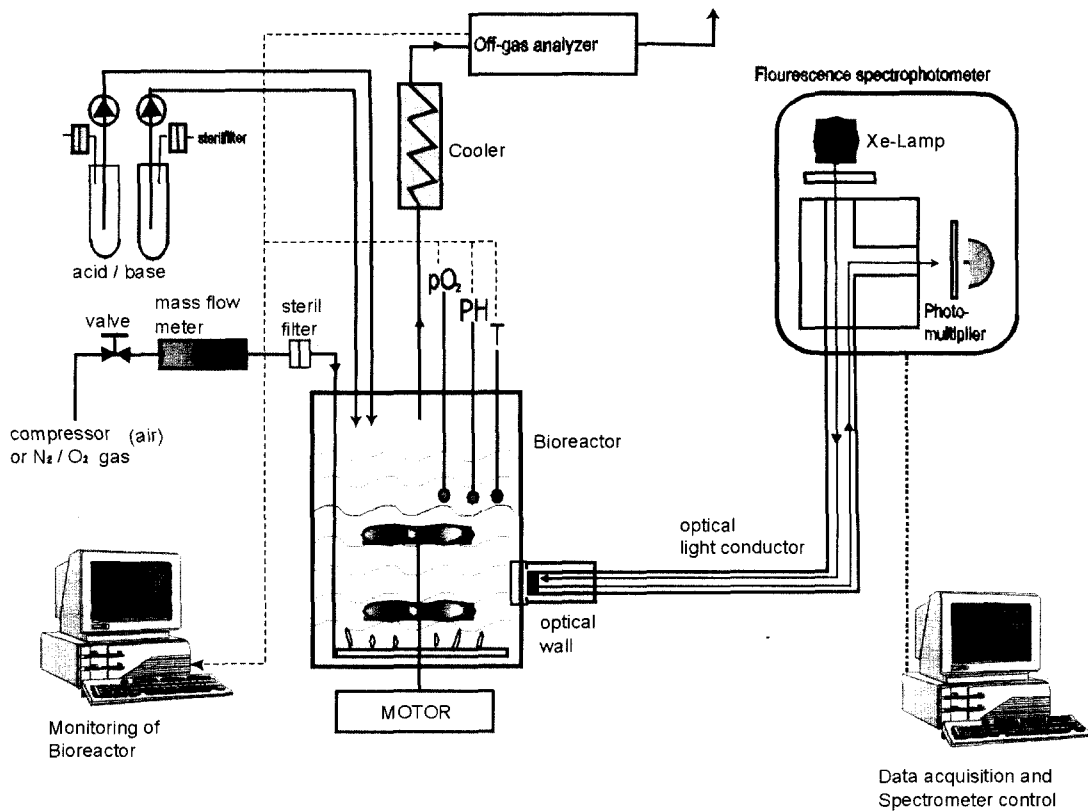


Figure 1. Experimental setup.

생물의 발효공정을 모니터링하기 위해 사용되고 있으며 excitation 및 emission 파장 (범위: 250 nm-600 nm)을 매우 빠른 속도 (예: 1분 간격)로 scanning할 수 있는 특성이 있다. 그러나 2차원 형광센서를 이용하여 생물공정을 모니터링하는 기술은 아직 초보단계에 있다.

본 연구에서는 다파장(multi-wavelength) 형광분광계에 광섬유 센서를 연결한 2차원 형광센서를 이용하여 넓은 범위의 excitation 및 emission 파장(250 nm-700 nm) 하에서 생물공정내 각종 물질을 동시에 모니터링하는 기술을 정성적으로 나타내는 것을 목적으로 한다. 특히, 박테리아, 곰팡이, 재조합 미생물 등의 발효공정을 2차원 형광센서를 이용하여 모니터링하고 정성적으로 비교, 분석함으로써 형광센서의 특성을 이해하고 향후 각종 미생물의 발효공정을 정량적으로 모니터링하는 기술을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

2차원 형광센서

형광분광 광도계 (Fluorescence spectrophotometer)는 Hitachi 회사의 모델 F-4500을 사용하였으며 생물 반응기 (2.5 liter, sus 제작, KoBiotech)에 2 m-bifurcated 액체 광학 전도관 (liquid light conductor, Lumatek, 독일)을 이용하여 연결하였다 (Figure 1). 생물 반응기내의 미생물 및 배양액의 형광특성은 반응기 측면에 부착된 석영창 (quarz glass)을 통해 2차원 형광센서에 의해 측정되는데 반응기의 고온 멸균 후에도 어려움 없이 모니터링될 수 있다. 본 연구에 사용된 2 m-bifurcated 액체 광학 전도관은 250-650 nm 범위에서 50% 이상의 투과도를 가지고 있으므로 생물공정의 장시간 모니터링에도 사용될 수 있다. 본 연구에 사용한 2차원 형광센서의

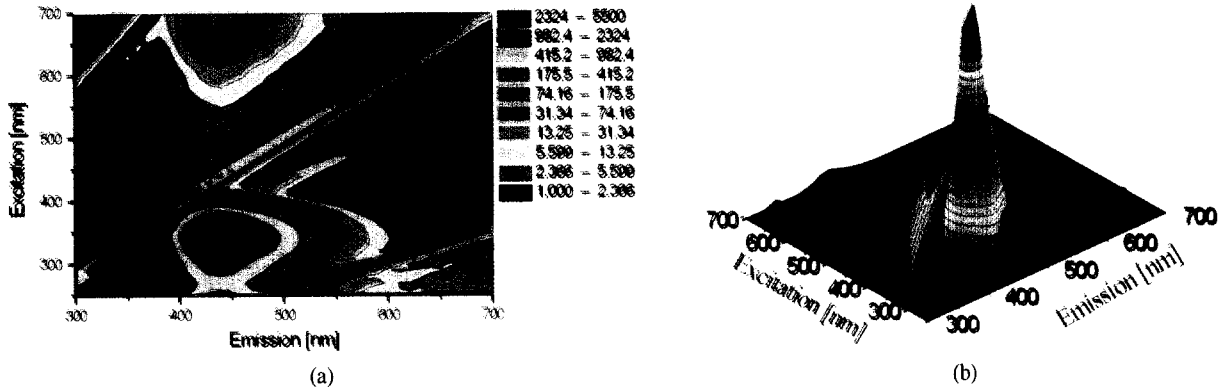


Figure 2. Fluorescence spectrum of 7-amino-4-methylcoumarin (a: isometric projection, b: contour plot).

조작 매개변수 값을 Table 1에 나타냈다. 한편, 진탕 배양 실험에서 얻은 시료의 형광특성을 분석하기 위해 5 mL 규모의 소형 cell을 sus로 제작하여 사용하였는데 채취한 시료를 cell 상단의 석영창을 통해 오프라인으로 측정하였다.

2차원 형광센서에 의해 측정된 형광 스펙트럼은 Figure 2에 보인 것과 같이 excitation 파장, emission 파장 및 emission 세기로 표현되는 3차원적인 변수값을 가지고 있다. 그러나 형광세기는 excitation과 emission 파장의 조합된 영역에서 변화하므로 형광 스펙트럼을 파장과 세기만을 축으로 하는 2차원 영역으로 표현할 수 있다 (따라서 2차원 형광센서라 불린다(7)). 생물 반응기내 미생물 및 배양액의 형광세기는 각 파장의 조합에 대해 시간에 따라 변화하는데 형광세기의 변화 정도는 형광 스펙트럼의 차이를 비교하거나 PCA (principle component analysis) 등을 적용하여 계산할 수 있으며, 이를 통해 생물공정내 미생물 및 대사물질의 특성 변화와 상호 관련시킬 수 있다.

미생물 및 발효공정

2차원 형광센서를 이용한 생물공정의 모니터링 기술 연구를 위해 본 연구에서는 박테리아 (*Escherichia coli*, *Thermoactinomyces vulgaris*)와 곰팡이 (*Aspergillus terreus*)등을 최소배양액 및 복합배양액에서 발효하였다. *Escherichia coli*는 최소 배양액(10)을 사용하여 진탕 배양기 (250 mL 진탕용기, 37°C, pH 7.0)에서 배양하였다. 유전자 재조합 단백질 생산의 모니터링을 위해 green fluorescent protein을 생산하는 gfp gene이 포함된 pEGFP (ampicillin 저항성, (11))와 ALA synthase (5-aminolevulinic acid synthase, ALAS)를 생산하는 hem a gene이 포함된 pALA38 (kanamycin 저항성, (12))을 각각 *E. coli* DH5 α 와 BL21(DE3)에 transformation 하였다. 고분자 단량체로써 각종 화학원료로 사용되는 itaconic acid를 생산하는 곰팡이의 일종인 *Aspergillus terreus* DSMZ 5770는 글루코오스를 탄소원으로 하는 최소 배양액 ((13), pH 4.3)을 사용하여 30°C에서 2.5 리터 생물 반응기 (1 vvm, 300 rpm)을 이용하여 배양하였다. 또한, esterase, cutinase 등을 cell 밖으로 생산하는 박테리아인 *Thermoactinomyces vulgaris* NRRL B-16117은 2 g/L의 포도당이 포함된 LB 복합배양액 ((14), pH 7.5)을 사용하여 진탕 배양기 (250 mL 진탕용기, 37°C, pH 7.0)에서 배양하였다.

결과 및 고찰

Escherichia coli 발효공정

E. coli 발효공정에서 미생물 및 발효액의 형광특성의 변화를 모니터링하는 것은 미생물의 성장, 재조합 단백질의 생성 및 대사물질의 생산과 소비 정도를 규명하는데 매우 유용하다. Figure 3에는 pALAS38를 BL21(DE3)에 transformation한 재조합 *E. coli*의 배양액의 형광 스펙트럼 변화를 나타냈다. 발효초기 ($t=0$) 발효액의 형광 특성은 Figure 3에 보인 것처럼 파장이 320/400 (ex/em)에서 높은 형광세기를 나타내고 또한 420/520 (ex/em)에서도 상당한 형광세기를 보였다. 그러나 배양후 12시간이 경과하였을때는 ex/em 파장이 280/340, 320/400, 340/450 및 420/520에서 형광세기의 변화를 볼 수 있다. 즉 파장 280/340 과 340/450에서는 발효초기와 비교할 때 형광세기가 증가하였으나 320/400 및 420/520에서는 감소하는 경향을 볼 수 있다. 발효 후 18시간이 경과하였을 때는 320/400에서는 감소하나 340/450에서는 더 증가함을 볼 수 있다. 이와 같은 형광세기의 각 파장에서의 변화, 즉 증가 및 감소는 ALA synthase gene을 발현하여 5-aminolevulinic acid (ALA)를 생산하는 유전자 재조합 미생물의 성장 또는 효소 (ALA synthase, ALA dehydratase 등) 농도의 변화와 정성적으로 관련지을 수 있다. (배양액 중의 ALA의 농도는 12시간에는 12 mg/L, 18 시간에는 22 mg/L로 증가하였으며, cell 내의 ALA synthase 및 ALA dehydratase의 활성도도 역시 시간이 지남에 따라 증가하였다).

최근, 단백질합성의 특성을 연구하기 위해 reporter gene으로 많이 사용되는 green fluorescent gene을 포함하고 있는 pEGFP를 *E. coli* DH5 α 에 transformation한 재조합 박테리아의 배양시 형광 스펙트럼의 변화를 Figure 4에 보였다. 배양 12시간 후에는 ex/em 파장이 350/420에서 상당한 형광세기를 보였는데 18시간 후에는 파장 350/420 과 460/520 (ex/em)에서 강한 형광세기의 증가를 볼 수 있다. 파장 350/420에서의 형광세기의 증가는 미생물의 성장과 연관지을 수 있고 460/520에서 형광세기의 증가는 pEGFP를 가지지 않은 wild type DH5 α 를 같은 배양액 및 발효조건에서 배양했을 때 형광 스펙트럼의 변화와 비교함으로써 green fluorescent protein의 합성과 관련 있음을 알 수 있다.

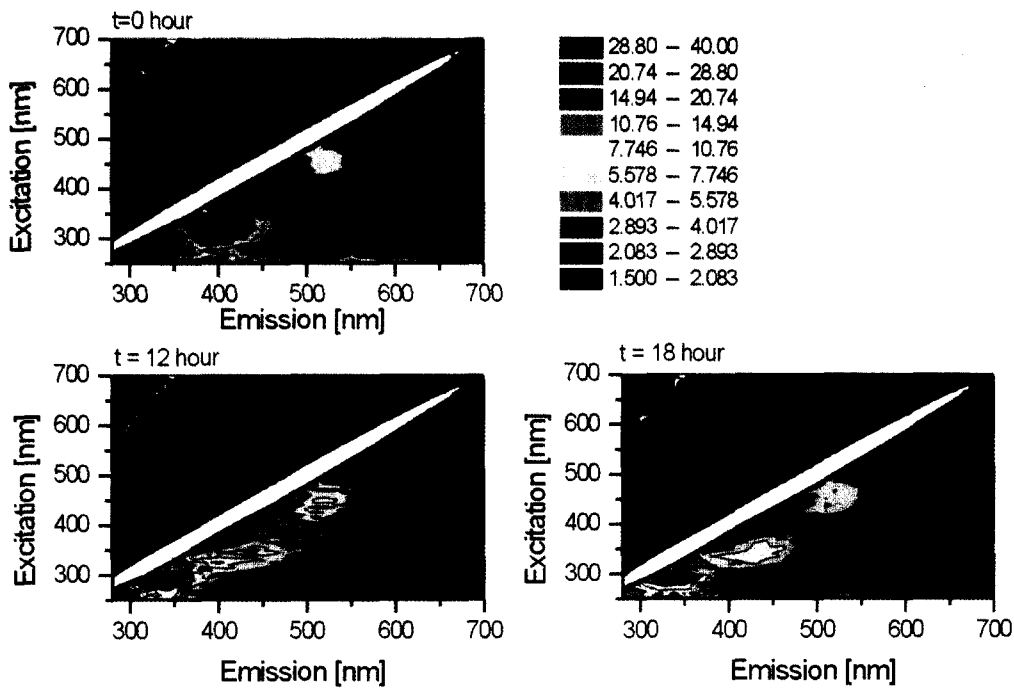


Figure 3. Spectra of recombinant *E. coli*(pALAS38).

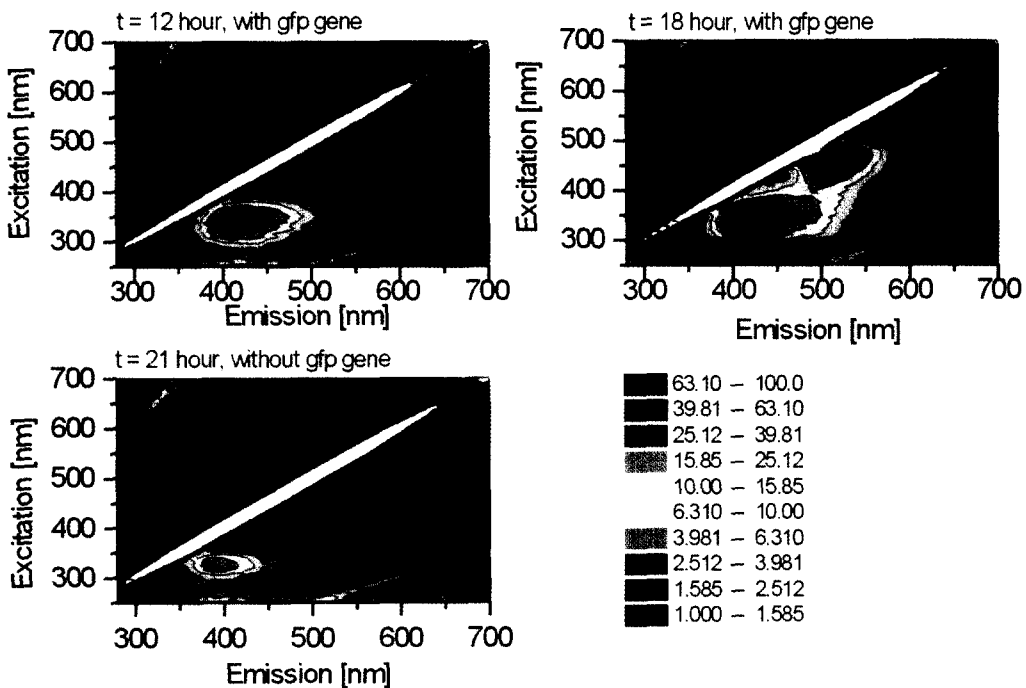


Figure 4. Spectra of recombinant *E. coli*(pEGFP).

Aspergillus terreus 발효공정

Itaconic acid를 생산하는 곰팡이중의 하나인 *Aspergillus terreus* DSMZ 5770의 발효공정을 2차원 형광센서를 이용하여 2.5 리터용 생물 반응기에서 모니터링하였다. 대개의 곰팡이 발효공정과 같이 *A. terreus* 발효공정은 시료채취가 용이하지 않고 biomass의 측정이 매우 어렵다. 또한, 생산된 itaconic acid의 양은 HPLC 등을 이용하여 분석해야 하기 때

문에 많은 시간이 소모된다. 따라서 2차원 형광센서에 의해 모니터링된 형광 스펙트럼의 변화는 *A. terreus* 발효공정에 대한 많은 정보를 제공할 수 있다. Figure 5에서 발효초기 (t=12 hour)에는 형광 스펙트럼의 변화가 크지 않지만 시간이 경과함에 따라 낮은 파장의 excitation 영역에서부터 세기 변화를 볼 수 있다. 특히 125시간부터 ex/em 380/410 nm 부근에서 형광세기가 증가하는데 발효공정의 각종 생산물 및

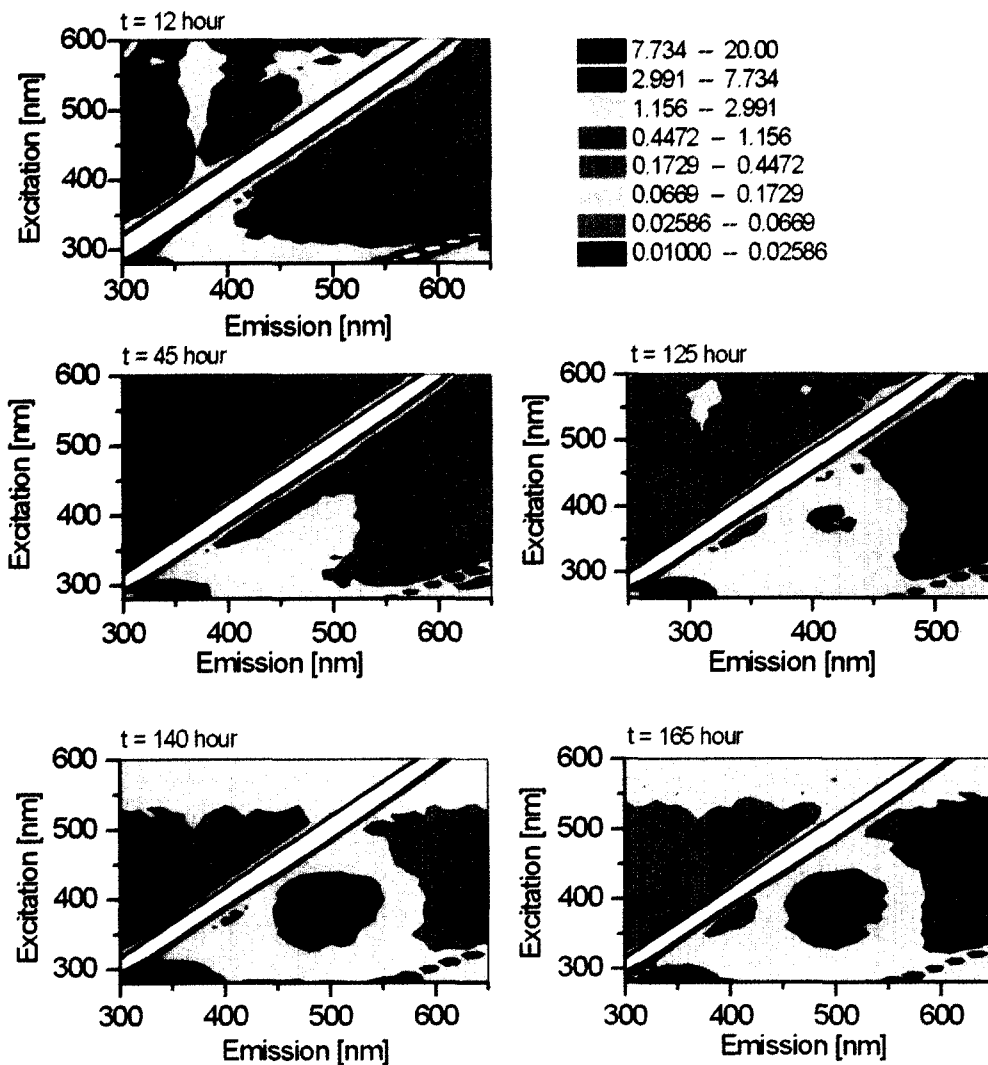


Figure 5. Spectra of *Aspergillus terreus*.

itaconic acid의 농도와 상호 관련지을 수 있다. (논문 준비중)

***Thermoactinomyces vulgaris* 발효공정**

Esterase, cutinase 등의 효소를 생산하고 배양액으로 배출하는 박테리아 중의 하나인 *Thermoactinomyces vulgaris* NRRL B-16117의 발효공정에서 배양액 중에 녹아 있는 효소의 양을 모니터링하는 것은 생물공정의 최적화를 위해 매우 중요하다. 미생물 배양액 중의 효소 농도는 미생물이 포함되지 않은 상등액으로부터 측정될 수 있는데, Figure 6에 2차원 형광센서를 이용하여 모니터링한 배양액의 형광 스펙트럼과 상등액의 형광 스펙트럼을 나타냈다. 6시간 배양 후 배양액의 형광 스펙트럼은 ex/em 280/350과 350/440에서 상당한 형광세기를 나타내는데 10시간 경과 후에는 각 파장에서 형광세기가 증가함을 볼 수 있다. 그러나 16시간 경과 후 파장 280/350에서는 형광세기가 상당히 감소한 반면, 파장 320/400에서 강력한 형광세기를 나타냈다. 이러한 형광세기의 변화는 미생물의 성장 (OD값 등) 또는 생존 미생물의 개체 수 (cell count) 등과 관련지을 수 있을 것이다. 상등액의 형광

스펙트럼을 보면 파장 380/450에서 형광세기가 증가함을 볼 수 있으므로 효소의 활성도 또는 아미노산의 생산 등과 정성적으로 상호 관련지을 수 있으며 발효기 실험을 통해 오프라인 결과와 정량적으로 상관 지을 수 있을 것이다.

요 약

2차원 형광센서를 이용하여 생물공정을 모니터링하는 기술에 대해 연구하였다. 기존의 광학센서에 비해 2차원 형광센서는 발효공정의 중요한 변수들을 동시에 모니터링하는데 사용될 수 있다. 본 연구에서는 2차원 형광센서를 이용하여 재조합 *E. coli*, *A. terreus* 및 *T. vulgaris* 등의 발효공정을 모니터링하고 미생물의 성장과 생성물의 생성에 대한 형광 스펙트럼의 변화를 정성적으로 비교, 고찰하였다. 2차원 형광센서는 발효공정 이외에도 생물화학반응 및 분리공정에도 쉽게 사용할 수 있고 생물공정의 최적화를 도모하는데 이용될 수 있다.

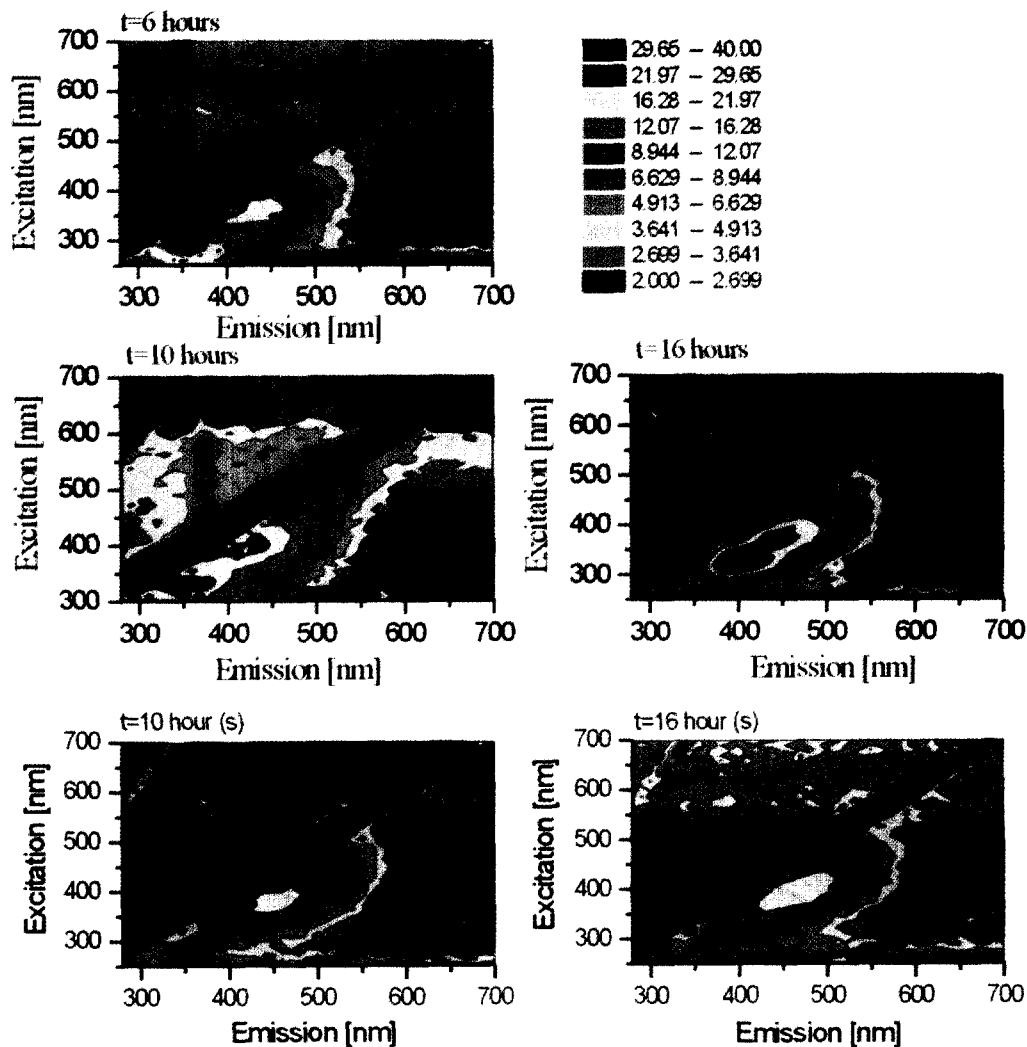


Figure 6. Spectra of *Thermoactinomyces vulgaris* s in brackets means supernatants.

감 사

이 논문은 2000년 과학재단 지역대학 우수과학자 지원연구 (과제번호 2000-2-30700-001-2)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Schugerl, K., Hitzmann, B., Jurgens, H., Kullick, T., Ulber, R., and Weigel, B., (1996), *Trends Biotechnol.*, 14, 21-31
- Zhou, W. and Mulchandani, A., (1995), *Biosensor and Chemical Sensor Technology*, chap. 9, 88-98
- Gill, A., Bracewell, D. G., Maule, C. H., Lowe, P. A., and Hoare, M., (1998), *Bioprocess monitoring: an optical biosensor for rapid bioproduct analysis*, *Journ. Biotechnol.*, 65, 69-80
- Marose, S., Lindemann, C., Ulber, R., and Scheper, T., (1999), *Optical sensor systems for bioprocess monitoring*, *Trends Biotechnol.*, 17, 30-33
- Schugerl, K., (1997), *Bioprocess Monitoring* (1st edn), J. Wiley & Sons
- Li, J.-K. and Humphrey, A.E., (1992), *Factors affecting culture fluorescence when monitoring bioreactors*, *Journ. Ferment. Bioeng.*, 74, 104-111
- Marose, S., Lindemann, C., and Scheper, Th., (1998), *Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring*, *Biotechnol. Prog.*, 14, 63-74
- Scheper, Th., Hitzmann, B., Stark, E., Ulber, R., Faurie, R., Sosniza, P., and Reardon, K.F., (1999), *Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses*, *Anal. Chim. Acta*, 400, 121-134
- Knuttel, T., Hartmann, Th., Meyer, H., and Scheper, Th., (2001), *On-line monitoring of a quasi-enantiomeric reaction with two coumarin substrates via 2D-fluorescence spectroscopy*, *Enz. Microb. Technol.*, 29, 150-159
- Akesson, M., Hagander, P., and Axelsson, J.P., (2001), *Avoiding acetate accumulation in Escherichia coli cultures using feedback control of glucose feeding*, *Biotechnol.*

- Bioeng.*, 73, 223-230
11. Clontech manual, 1999, catalog No. 6077-1
 12. Private communication from Prof. Baek, Kyung-hwan.
 13. Yahiro, K., Shibata, S., Jia, S.-R., Park, Y., and Okabe, M., (1997), Efficient itaconic acid production from raw corn starch, *Journ. Ferm. Bioeng.*, 84, 4, 375-377
 14. Fett, W.F., Wijey, C., Moreau, R.A., and Osman, S.F., (2000), Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria, *Lett. in Appl. Microb.*, 31, 25-29