

경제적인 자동화 FIA 장치를 이용한 진탕플라스크 배양액의 미생물 증식도의 자동측정

이 형 춘

서원대학교 식품영양학과

(접수 : 2004. 2. 13., 게재승인 : 2004. 5. 18.)

Automatic Measurement of Microbial Growth in Shake-Flask Culture using an Economic and Automated Flow Injection Analysis Apparatus

Hyeong Choon Lee

Department of Food and Nutrition, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

(Received : 2004. 2. 13., Accepted : 2004. 5. 18.)

An automated flow injection analysis apparatus manufactured economically was used in the automatic measurement of *E. coli* growth in shake-flask culture of nutrient broth. The detailed measurement of whole growth was possible at intervals of 10 minutes by the automatic measurement system which adopted the sterilized nutrient broth as a carrier solution. Using distilled water as a carrier solution showed less accurate results than nutrient broth.

Key Words : Shake-flask culture, growth, automatic measurement, flow injection analysis

서 론

응용미생물 실험에서는 발효조를 이용한 대규모 배양실험에 앞서서 플라스크 배양실험으로 여러 가지 유용한 정보를 얻는다. 미생물 배양실험시 측정해야 하는 가장 중요한 변수 중의 한 가지는 증식도인데, 플라스크 배양 중에서도 특히 진탕배양 플라스크의 배양의 경우 배양액의 양이 적으므로 수작업으로는 채취빈도를 높게 할 수 없기 때문에 증식양상을 세밀하게 파악할 수가 없다. 증식도의 연속적인 측정을 위하여 플라스크내의 배양액을 흡광광도에 설치한 flow-through cell을 경유하여 계속 순환시키면서 배양액의 흡광도를 측정하는 것을 생각할 수 있는데, 시간이 흐르면서 flow-through cell의 안벽에 균세포가 부착하여 오차를 유발할 수 있다(1). 또한 균농도가 높아져서 희석이 필요할 경우에는 측정이 곤란하다.

그러나, 흐름주입분석법 (flow injection analysis, FIA)을 사용하면 배양시료가 flow-through cell을 짧은 시간에 걸쳐 통과한 후 이송용액이 계속 통과하면서 flow-through cell의

안벽을 충분히 세척하므로 균세포 부착에 의한 오차를 방지할 수 있다(2). 진탕플라스크 배양에서처럼 배양액 총량이 100 mL 정도로 적어도 FIA분석의 시료소요량이 아주 적기 때문에 채취빈도를 높일 수 있으므로 수작업에 비하여 증식양상을 세밀하게 파악할 수 있다. 또한, 이송용액의 투과광량을 측정하고, 이를 대조액의 투과광량으로 하여 흡광도를 산출하면, 실험실 환경상태 등 여러요인의 변화에 따른 오차를 매 측정시마다 보정할 수 있으므로 정확한 측정이 가능하다. 배양액의 균농도가 높아서 희석이 필요한 경우에는 주입밸브의 단수를 높임으로서 희석이 가능하다(3). 또한, FIA장치는 자동화하기가 수월(4)하므로 자동측정이 가능하다. 다만, 상업적인 자동화 FIA제품은 가격이 비싸므로(2) 미생물 배양액 성분의 자동분석과 같은 생명공학 실험에의 사용이 제한적이다. 그러나, 자동화 FIA 장치의 경우 다른 분석기기에 비하여 간단하게 제작할 수 있으며, 실험목적에 달성할 수 있는 한에서 경제적으로 구성할 경우 기존제품 가격의 1/10 이내로 제작할 수 있다.

이러한 관점에서, 본 연구에서는 미생물 증식도 측정용 자동화 FIA 장치를 경제적으로 제작하였으며, 이 장치를 이용하여 진탕플라스크 배양 중 균 증식양상을 세밀하게 자동측정할 수 있는가를 검토하였다.

† Corresponding Author : Department of Food and Nutrition,
Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

Tel & Fax : +82-43-299-8744

E-mail : hclee@seowon.ac.kr

재료 및 방법

사용균주

서울대학교 미생물연구소 균주센터로부터 *Escherichia coli* K12를 분양받아 사용하였다.

배양방법

500 mL 삼각플라스크에 Nutrient broth (NB) 100 mL를 넣고 121°C, 15분 멸균 후, Nutrient agar 배지상의 균 집락을 백금으로 취하여 접종하고, 왕복식 진탕항온수조 (KMC-1205SW1, Vision Scientific Co.)를 사용하여 120 rpm, 35°C로 진탕배양하였다.

자동화 FIA 장치

본 연구에서 제작하여 사용한 자동화 FIA 장치의 구성을 Fig. 1에 나타내었다.

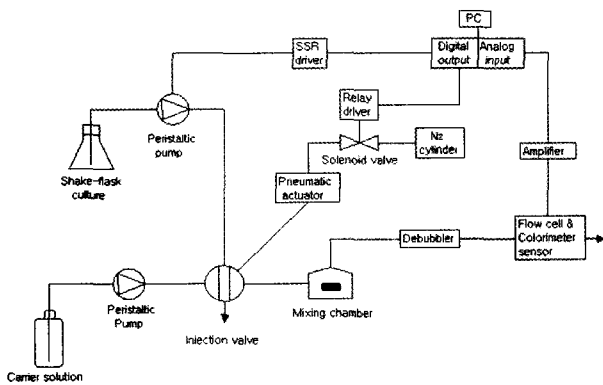


Figure 1. Schematic diagram of an automated FIA system for measuring the absorbance during the growth of *E. coli* in shake-flask culture.

진탕배양 중 배양플라스크로부터 공기의 혼입없이 배양액을 뽑아내기 위하여 PTFE 관 (tube)을 플라스크속의 배양액 밑부분까지 넣어주었는데, 플라스크속의 PTFE관이 진탕 중에 흔들리지 않도록 스테인레스 스틸관 (stainless steel tube)을 통하여 넣어주었다(Fig. 2).

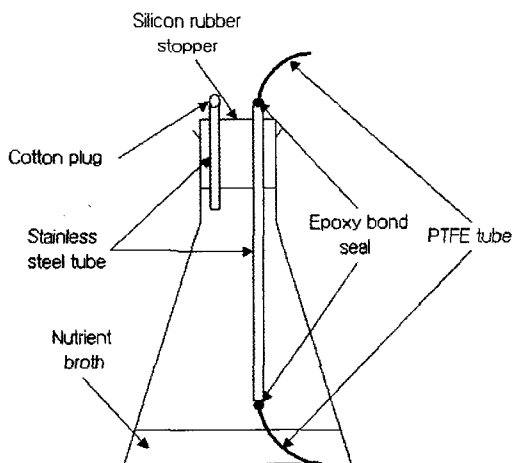


Figure 2. Culture flask equipped with a sampling tube.

구성품중 이송용액 (carrier solution) 과 배양시료 운반용 튜빙펌프 (tubing pump) (Eyela, SMP-21), 주입밸브 (injection valve) (Rheodyne, 5020), 공압액츄에이터 (pneumatic actuator) (Kuroda, PRO3S-0-90), 솔레노이드밸브 (solenoid valve) (Parker, PHS510S-6-24V), 주입밸브와 공압액츄에이터의 연결 커플링 (S&C, SYC-020DA-6.35B-5B), flow-through cell (Hellma, 178.712-OS), 칼라리미터센서 (Colorimeter sensor) (Smart Q Technology, 3275), 센서신호증폭기 (amplifier) (미래 E&I, MR-ISO), 아날로그 입력 (analog input) 및 디지털출력 (digital output)용 인터페이스 카드 (interface card) (Advantech, PCL-812PG) 및 486급 PC는 기성제품을 사용하였다. 이것들 중 칼라리미터 센서 케이블소켓 (cable socket)의 핀할당 (pin assignment)도를 Fig. 3에 나타내었다.

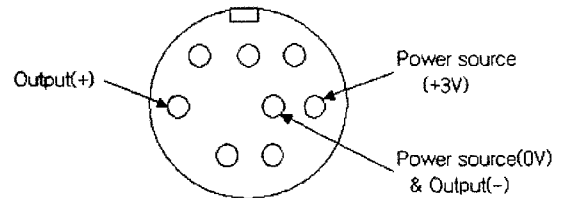


Figure 3. Pin assignment of the cable socket of colorimeter sensor.

그 외의 구성품은 제작하여 사용하였다. 제작품 중 기포제거기 (debubbler)는 아크릴을 사용하여 제작하였으며(5), 흡의 크기는 폭 1.6 mm, 깊이 0.8 mm, 길이 30 mm로 하였고 테프론 테이프는 배관용을 사용하였다. 혼합챔버 (mixing chamber)는 Ruzicka와 Hansen의 단면도(6)에 근거하여 아크릴을 사용하여 제작하였으며(6), 내부용적은 약 0.8 mL였다. 릴레이 드라이버 (relay driver)는 DC 릴레이 (Takamisawa, RY12W-K)와 트랜지스터 어레이 (Transister array) IC인 ULN2003A를 이용하여 제작하였으며, 솔리드스테이트릴레이 드라이버 (Solidstate relay driver)는 AC 솔리드스테이트 릴레이 (Wyes, WYP IC 03Z4)와 ULN2003A를 이용하여 제작하였다.

자동분석방법

자동분석 조건은 다음과 같다. PTFE 튜브는 내경 0.8 mm 짜리를 사용하였다. 이송용액 (carrier solution)은 121°C, 15분 고압멸균한 Nutrient broth 또는 증류수를 사용하였으며, 이송용액의 유량은 1.8 mL/min였다. 주입밸브 루프 (injection valve loop)의 용량은 약 50 µL였으며, 시료의 1회 채취량은 약 0.94 mL였다. 칼라리미터 센서의 필터는 적색필터 (red filter)를 사용하였다.

자동분석 프로그램은 QuickBasic으로 작성하였으며 (ver. 4.0), 그 흐름도를 Fig. 4에 나타내었다. 그림에서와 같이 매 10분마다 배양액의 흡광도를 측정하는 것으로 하였다. 처음에 이송용액의 투과광량에 대한 디지털 값을 측정하는 것은 흡광도 산출시 대조용액의 투과도로 사용하기 위해서였다. 배양시료의 투과광량에 대한 디지털 값의 피크 (peak)치 측정 프로그램은 Ruzicka와 Hansen(7)에 근거하여 작성하였다.

하여 흡수되는 광량을 보정해 주지 못하기 때문에 NB를 이송용액으로 사용한 경우보다 오차가 더 크다고 생각되었다. 증식도가 빠른 속도로 증가하는 대수기 등에서는 측정오차가 어느 정도 상쇄되어 나타나지 않지만 후반부에서는 증식속도가 둔화되면서 상쇄효과가 작아지거나 없어지기 때문에 후반부에 측정치의 변동이 더 큰 것이라고 생각되었다.

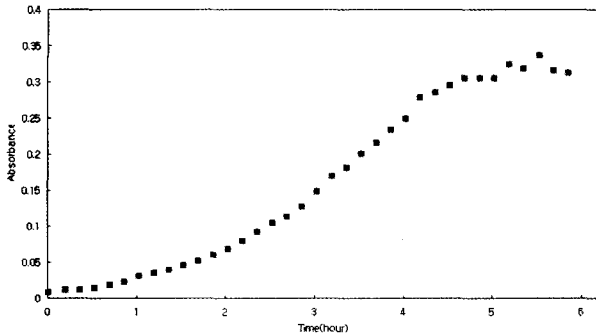


Figure 8. *E. coli* growth in shake-flask culture measured with an automated FIA system at intervals of 10 minutes. 100 mL culture broth was reciprocally agitated with a water bath shaker at 120 rpm. Carrier solution in FIA analysis was distilled water.

요 약

진탕플라스크 배양액의 균 증식도를 자동측정하기 위하여 자동화 FIA장치를 경제적으로 제작하였으며, 이를 이용하여 대장균을 Nutrient broth 배지에 접종하여 배양하면서 그 증식도를 자동측정하였다. 평균 NB를 이송용액으로 하고 10분 간격으로 자동측정하였을 때 큰 오차없이 증식양상을 세밀하게 측정할 수 있었다. 증류수를 이송용액으로 사용한 경우에는 NB를 이송용액으로 사용한 경우에 비하여 측정오차가 더 컸으며, 특히 배양후반부에서의 오차가 크게 나타났다.

감 사

본 연구는 2003년도 서원대학교 응용과학연구소 연구비 지원에 의해서 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bentin, S., J. Nielsen, and J. Villadsen (1991), Characterization and application of precise and robust flow-injection analysers for on-line measurement during fermentations, *Analytica Chimica Acta* **247**, 45-50.
2. Schugerl, K. (1991), On-Line Analysis of Broth, In *Biotechnology Vol. 4*, H. J. Rehm and G. Reed Eds, p165, VCH, Weinheim.
3. Garn, M., M. Gisin, and C. Thommen (1989), A flow injection analysis for fermentation monitoring and control, *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 423-428.
4. Nielson, J., K. Nikolajsen, and J. Villadsen (1988), FIA for on-line monitoring of important lactic acid fermentation variables, *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 1127-1134.
5. Lee, H. C. (2000), Increase of cell concentration by the automatic analysis and addition of glucose with an on-line flow injection analysis system in the cultivation of a *Saccharomyces cerevisiae* using a Korean paper digestion wastewater, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(4), 388-392.
6. Ruzicka, J. and E. H. Hansen (1981), *Flow Injection Analysis*, p112, John Wiley and Sons, New York.
7. Ruzicka, J. and E. H. Hansen (1981), *Flow Injection Analysis*, p193, John Wiley and Sons, New York.