

흐름주입식 바이오센서용 기질용액 자동희석 장치 개발

송대빈 정효석 정대홍 김성태

Development of an Auto Dilution Unit of Substrate Solution for a Flow Injection Type Biosensor

D. B. Song H. S. Jung D. H. Jung S. T. Kim

Abstract

For development of an on-line monitoring unit of fermentation process, an auto dilution unit based on traditional chemical and biological analytical method was developed and the performance was evaluated. The dilution unit was constructed with two syringe pumps and flow direction change valves and fully automated. Total delivery volume of two pumps using distilled water was measured to confirm the operating stability. And diluted concentrations of three substrate solutions (glucose, lactic acid, ethanol) were compared with a standard method with a high performance liquid chromatograph (glucose, lactic acid) and gas chromatograph (ethanol). Relative error values of total delivery volume of the pumps were below 3% and standard deviation values were 0.003 (n=5). Relative error values of diluted concentration of the dilution unit measurements were below 2% with 1/10 of dilution ratio and 70, 80 μl of sample volume conditions for glucose and lactic acid, 1/30 of dilution ratio and 70 μl of sample volume conditions for ethanol, respectively. In case of the ethanol, cause of the evaporative characteristics, the relative error values showed over 5% whole experimental conditions.

Keywords : Biosensor, FIA, Auto dilution, Fermentation, On-line monitoring

1. 서론

흐름주입식 분석에서 기질용액은 전환밸브, 주사기 펌프 등 적절한 장치를 사용하여 완충용액 속으로 투입되거나, 완충용액 이송용 펌프의 작동시간을 조절하여 투입된다. 투입된 기질용액은 완충용액과의 앞 뒤 경계를 기준으로 샘플구역(sample zone)을 형성하며, 관로 속을 지나면서 흐름발달 및 확산에 의해 농도가 달라진다. 즉 샘플구역 흐름길이를 기준으로 중앙부의 농도가 가장 높고, 선단과 후단부는 완충용액에 희석되어 농도가 낮아진다(Ruzicka와 Hansen, 1978). 완충용액 내에서 확산에 의한 기질용액의 농도분포는 확산 전후의 기질용액 농도와 반응기에서 나타나는 최대 반응값

(전류, 파장 등)으로 나타낼 수 있으며, 완충용액 유속에 대응한 샘플링 시간의 조정으로 기질용액을 적절하게 희석시킬 수 있다(Hansen과 Ruzicka, 1983). Olsen 등(1982)은 확산과 샘플링 시간 선택에 의한 희석장치를 'Electronic dilution'으로 명명하고 lactate dehydrogenase의 활성도를 측정하여 장치의 성능을 검증하였다. Schuhmann 등(1995)은 샘플량을 3 ~ 5 μl 까지 감소시켜 100배까지 희석이 가능한 발효공정 온라인 감시용 바이오센서를 개발하였다. 그러나 확산에 의한 기질용액 희석장치는 샘플구역에 형성되는 농도분포가 유속, 유체 물성, 관로 내경 등에 따라 달라질 수 있으며, 희석비를 결정하는 샘플량의 경우 유속과 연관되어 샘플링 시간이 제한되기 때문에 장치구성에 어려움이 있다. 또한 샘플구역의

This study was supported by ARPC, Agricultural R&D Promotion Center. This article was submitted for publication in August 2006; reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in September 2006. The author are D. B. Song, KSAM member, Associate Professor, S. T. Kim, KSAM member, Professor, Division of Agricultural Engineering, Gyeongsang National University/Institute of Agricultural & Life Science, H. S. Jung, and D. H. Jung, Division of Agricultural Engineering, Gyeongsang National University. The corresponding author is S. T. Kim, Division of Agricultural Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea; E-mail: <kimsung@gnsu.ac.kr>.

특정 부분의 용액을 채취해야 하기 때문에 샘플링 시기와 시간을 정밀하게 제어하기 위한 별도의 장치가 필요하다.

흐름주입식 바이오센서를 이용하여 발효공정을 자동으로 제어하기 위해서는 반응장치에 투입되는 기질용액의 농도를 초기부터 반응이 진행되는 동안 연속적으로 측정하여야 한다. 일반적으로 기질농도는 반응 초기에 매우 높으며 반응이 진행될수록 낮아지게 된다. 따라서 전류값으로 기질농도를 측정하는 바이오센서의 경우 전류계의 전류값 측정 범위가 커야한다. 바이오센서가 감지하는 기질농도의 전류값 범위는 $nA \sim \mu A$ 로 일반 전류계의 사용이 불가능하기 때문에 특별히 제작된 고가의 바이오센서용 전류계를 사용하여야 한다. 그러나 바이오센서용 전류계는 성능 상 측정범위가 매우 제한적이기 때문에 발효공정 전 과정의 기질농도를 측정하기 위해서는 측정범위가 다른 여러 대의 전류계를 사용하여야 한다. 이처럼 여러 대의 전류계를 사용하는 경우에는 경제적인 문제 외에, 공정 구성의 복잡성으로 인한 오차발생 증대 및 측정시간 지연 등의 문제점이 초래된다.

따라서 이 연구에서는 발효공정 온라인 감시를 위해 기존 화학분석 시 수동으로 시행되는 희석과정을 기본으로 하여 전류계의 측정 영역을 초과하는 기질용액의 농도를 전류계 측정범위 내로 희석시키는 자동화된 희석장치를 구성하고 그 성능을 검증하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험 재료

1) 실험 장치

실험에 사용된 기질용액 자동희석장치의 공정도는 그림 1과 같이 구성되었다. 자동희석장치는 샘플용액의 흡입과 송출기능을 갖는 주사기펌프(SP1, SP2) 2개, 방향제어밸브(V1, V2) 2개, 기질과 증류수 공급용기, 용액 희석용 샘플탱크, 배출용기로 구

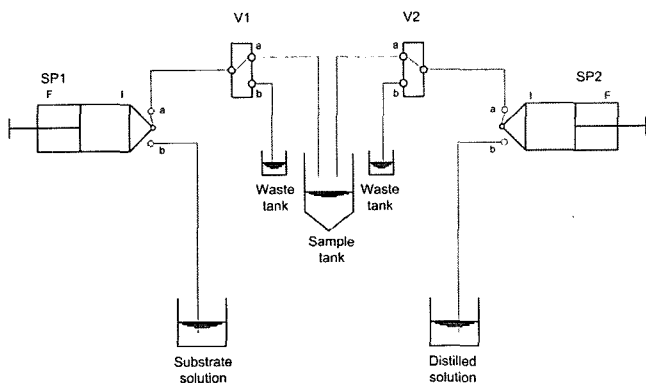


Fig. 1 Schematic diagram of the auto dilution unit.

성되며, 주사기펌프 및 방향제어밸브의 조작과정은 전용 PC를 사용하여 온라인으로 이루어지도록 하였다. 먼저 1번 펌프(SP1, b port)에 기질용액을 공급용기에서 충전시킨 후 1번 펌프의 방향을 a port로 바꾼 후 펌프 구동시간을 조절하여 희석비율에 맞는 기질용액을 방향전환밸브(V1, a port)를 통하여 샘플탱크로 송출시킨다. 다음에 2번 펌프(SP2, b port)에 증류수를 공급용기에서 충전시킨 후 1번 펌프와 같이 원하는 희석비율에 맞추어 증류수를 샘플탱크로 송출시킨다. 1차 희석이 완료된 후 1번과 2번 펌프에 부착된 주사기 내부와 관로에 잔류하는 기질용액과 증류수는 다음 희석공정에 혼합되지 않도록 방향제어 밸브(V1 a port, V2 a port)를 통하여 주사기 내부로 흡입한 후 방향제어 밸브(V1 b port, V2 b port)를 통하여 배출용기로 배출된다. 자동희석장치에서 기질용액을 공급하는 주사기펌프(SP1)의 작동순서는 그림 2와 같다. 먼저 I 은 1번 펌프(SP1, b port)에 새로운 기질용액을 공급용기에서 충전시키며, II는 관로에 남아있는 기존의 기질용액을 배출시키기 위해 방향제어 밸브(V1 b port)를 통하여 관로의 체적만큼 1번 펌프(SP1, a port)에서 기질용액을 배출용기로 배출한다. III은 1번 펌프(SP1, a port)에서 방향제어 밸브(V1 a port)를 통하여 희석비율에 맞는 기질용액을 샘플용기로 송출시키며, IV는 희석작업이 끝난 후 주사기와 관로에 남아있는 기질용액을 1번 펌프(SP1, a port)에 흡입한다. V는 1번 펌프(SP1, a port)에 흡입된 기질용액을 방향제어 밸브(V1 b port)를 통하여 배출용기로 배출시킨 후 또 다른 희석작업이 완료된다. 그림 3은 자동희석장치의 사진이며, 실험에 사용된 장치의 상세한 규격은 표 1과 같다.

2) 실험 재료

자동희석장치 성능검증을 위해 포도당(D-glucose, FW 180.16 g), 젖산(lactic acid, FW 90.08 g), 에탄올(ethanol, FW 46.07 g)을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며, 희석용 용액으로는 증류수를 이용하였다. 또한 개발된 장치를 이용한 희석용액의 농도 검증을 위해 HPLC(High Performance LiquidChromatograph)를 사용하였으며, 당 분석용 carbohydrate analysis column 및 이동상 용매(mobile phase solution)로 70% acetonitrile 용액을 사용하였다.

나. 실험 방법

1) 중량비교

자동희석장치를 구성하는 주사기 펌프와 방향전환 밸브의 작동상태를 확인하기 위해 증류수를 사용하여 기질 공급펌프와 증류수 공급펌프에서 토출된 용액의 총 체적과 이론체적을 비교하였다. 기질용액 체적과 희석비율에 따라 기질 공급 펌프 및 증류수 공급펌프의 토출량과 작동시간이 결정된다.

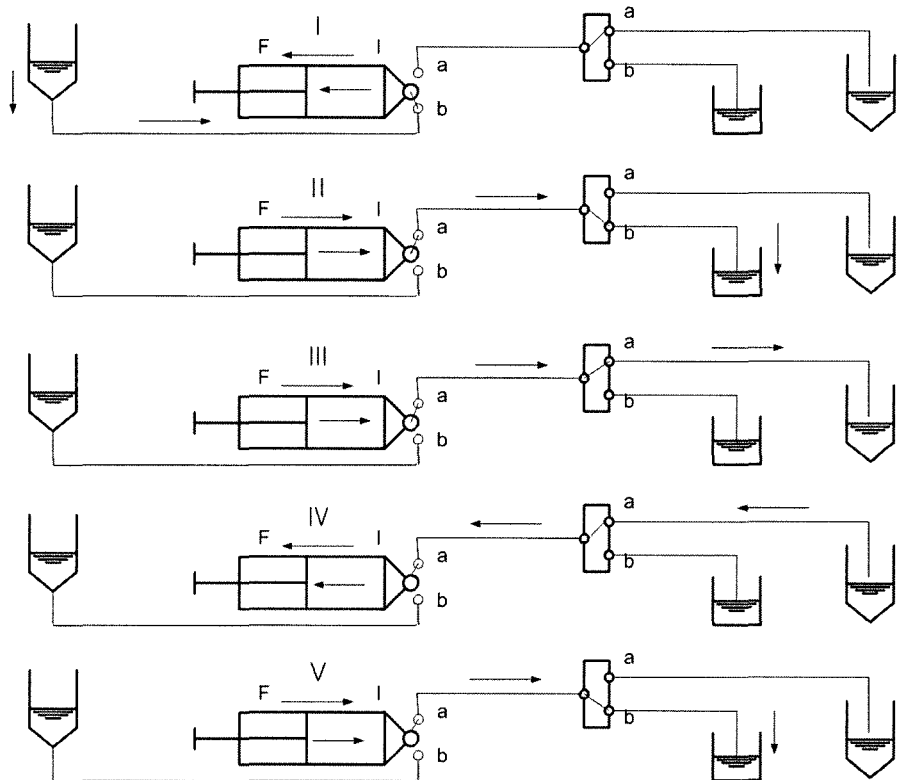


Fig. 2 Schematic diagram of substrate solution pump.

Table 1 Specifications of experimental apparatus

Component	Specification	Remarks
Syringe pump	5.0~150 ml/min, 1000 step	TECAN Co.
Pinch Valves	075P, 100P	Bio-Chem valve.
Tube	$\phi 2.29 \times \phi 4.42$ mm, teflon	Cole-parmer Co.
Controller	RS-232	Compile technology.

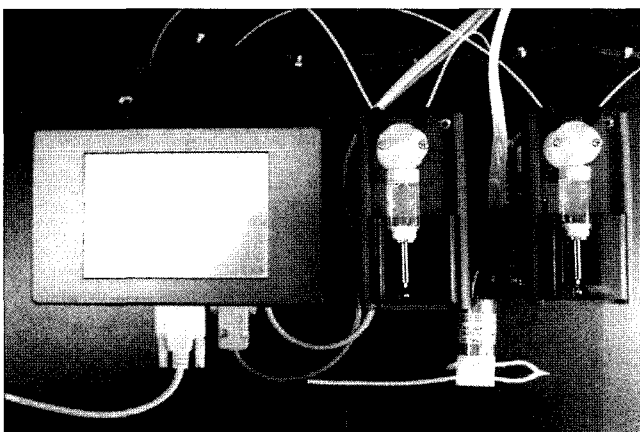


Fig. 3 Photograph of the auto dilution experimental apparatus.

이론체적은 희석비율에 따라 결정된 각 펌프의 토출량을 의미하며, 토출용액 총 체적은 각 펌프에서 실제 토출된 체적을 의미한다. 총 체적과 이론 체적과의 차를 총 체적으로 나눈

값을 상대오차로 하고, 상대오차 및 반복 간 표준편차를 기준으로 자동희석장치의 작동상태를 평가하였다. 각 펌프에서 토출된 증류수의 체적은 증류수의 밀도를 측정하여 중량으로 환산하였다. 펌프 토출량 5 ml/min에서 희석비율 5수준(1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50), 기질용액 체적 6수준(40, 50, 60, 70, 80, 100 μ l)에서 실험하였으며, 각 실험 조건에서 5회 반복 측정하여 총 중량을 측정하였다.

2) 농도비교

3 종류(포도당, 젖산, 에탄올) 기질과 증류수를 사용하여 희석 후 농도를 비교하여 자동희석장치의 성능을 검증하였다. 3 종류의 기질을 증류수에 희석하여 100 mM의 표준용액을 제조한 후, 자동희석장치를 사용하여 희석비율 1/10(10 mM), 1/20(5 mM), 1/30(3.33 mM), 1/40(2.5 mM), 1/50(2 mM)이 되도록 희석하였다. 희석된 포도당, 젖산용액은 HPLC, 에탄올은 GC(Gas Chromatograph)를 사용하여 농도를 측정하였

다. 측정된 기질용액 농도와 희석비율에 따른 농도를 이용한 상대오차 및 반복 간 표준편차를 기준으로 자동희석장치의 성능을 평가하였다. 각 실험 조건에서 희석된 용액 1 ml에 5 ml의 증류수를 첨가하여 혼합한 후, 12,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하고 0.45 μm의 필터로 여과시켜 HPLC 및 GC로 측정하였다. 펌프 토출량 5 ml/min에서 희석비율 5수준(1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50), 기질용액 체적 6수준(40, 50, 60, 70, 80, 100 μl)에서 실험하였으며, 각 실험 조건에서 5회 반복 측정하여 최대값과 최소값을 제외한 나머지 측정값으로 상대 오차 및 표준편차를 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 중량비교

그림 4는 희석비율과 기질용액 체적에 따른 펌프 토출량의

상대오차를 나타낸 것으로, 희석비율 1/20, 기질체적 70, 80 μl를 제외하고 희석비율이 증가할수록 기질용액 체적에 관계 없이 상대오차가 증가되는 것을 알 수 있다. 또한 뚜렷하지는 않지만 동일 희석비율에서 기질체적이 클수록 상대오차가 커지는 것을 알 수 있다. 상대오차의 최대값은 희석비율 1/50, 기질체적 100 μl에서 1.85%로 나타났으며, 최소값은 희석비율 1/10, 기질체적 50 μl일 때 0.49%로 나타났다.

표 2는 기질용액 체적에 따른 희석비율별 펌프 토출량을 측정된 결과로, 기질 체적 40 μl, 희석비율 1/10에서 최대 표준편차 0.0028을 제외하고 전 시험구별, 반복 간 매우 적은 표준편차 값을 나타내고 있다.

이상 자동희석장치의 주사기 펌프와 방향절환 밸브의 작동 상태를 확인하기 위해 펌프 토출량의 상대오차와 실험구별 및 측정 반복 간 표준편차를 검토한 결과, 상대오차는 전 실험 구에서 2.00% 이하로 나타났으며, 표준편차 역시 0.0030 이

Table 2 Pump delivery according to dilution ratio and substrate volume

Substrate volume (μl)	Dilution ratio	Sample volume (μl)					Mean	S. D.
		#1	#2	#3	#4	#5		
100	1:10	1.0116	1.0132	1.0115	1.0109	1.0116	1.0118	0.0009
	1:20	2.0336	2.0322	2.0320	2.0315	3.0511	2.0323	0.0008
	1:30	3.0509	3.0500	3.0512	3.0512	3.0511	3.0510	0.0006
	1:40	4.0709	4.0711	4.0710	4.0716	4.0726	4.0716	0.0007
	1:50	5.0919	5.0924	5.0926	5.0930	5.0945	5.0929	0.0010
80	1:10	0.8106	0.8104	0.8109	0.8114	0.8124	0.8111	0.0008
	1:20	1.6148	1.6188	1.6192	1.6156	1.6183	1.6173	0.0020
	1:30	2.4421	2.4386	2.4391	2.4405	2.4380	2.4397	0.0016
	1:40	3.2555	3.2545	3.2533	3.2557	3.2520	3.2542	0.0016
	1:50	4.0651	4.0656	4.0660	4.0642	4.0639	4.0650	0.0009
70	1:10	0.7090	0.7100	0.7103	0.7092	0.7095	0.7096	0.0005
	1:20	1.4126	1.4155	1.4150	1.4138	1.4130	1.4140	0.0012
	1:30	2.1233	2.1226	2.1253	2.1250	2.1256	2.1244	0.0013
	1:40	2.8397	2.8379	2.8365	2.8389	2.8391	2.8384	0.0013
	1:50	3.5507	3.5473	3.5485	3.5490	3.5492	3.5489	0.0012
60	1:10	0.6074	0.6043	0.6076	0.6049	0.6040	0.6056	0.0017
	1:20	1.2129	1.2149	1.2109	1.2112	1.2140	1.2128	0.0017
	1:30	1.8214	1.8266	1.8229	1.8253	1.8219	1.8236	0.0022
	1:40	2.4320	2.4352	2.4361	2.4328	2.4350	2.4342	0.0017
	1:50	3.0460	3.0450	3.0462	3.0491	3.0495	3.0472	0.0020
50	1:10	0.5013	0.5041	0.5017	0.5032	0.5021	0.5025	0.0011
	1:20	1.0086	1.0105	1.0101	1.0095	1.0087	1.0095	0.0008
	1:30	1.5160	1.5182	1.5194	1.5164	1.5200	1.5180	0.0018
	1:40	2.0238	2.0242	2.0278	2.0271	2.0260	2.0258	0.0018
	1:50	2.5355	2.5382	2.5361	2.5370	2.5388	2.5371	0.0014
40	1:10	0.4080	0.4013	0.4038	0.4016	0.4052	0.4040	0.0028
	1:20	0.8078	0.8143	0.8120	0.8112	0.8120	0.8115	0.0024
	1:30	1.2195	1.2192	1.2160	1.2143	1.2154	1.2169	0.0023
	1:40	1.6252	1.6222	1.6250	1.6228	1.6239	1.6238	0.0013
	1:50	2.0331	2.0306	2.0311	2.0316	2.0304	2.0314	0.0011

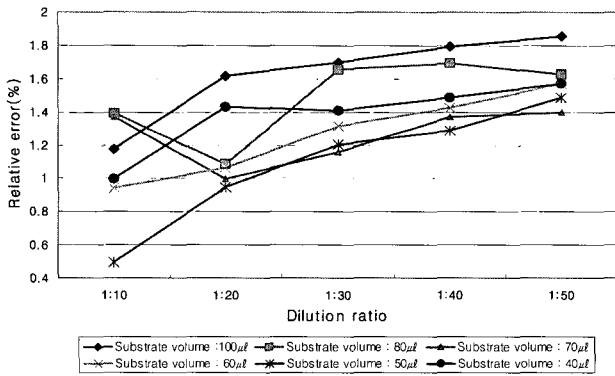


Fig. 4 Relative error of pump delivery according to dilution ratio and substrate volume.

하로 나타나 작동상태가 매우 안정적임을 확인할 수 있었다.

2) 농도비교

그림 5는 포도당의 희석비율별 체적에 따른 샘플 농도의 상대오차를 나타낸 것으로, 희석비율이 클수록, 기질체적이 작을수록 상대오차가 커지는 것을 알 수 있다. 특히 기질용액 체적이 40 μ l인 경우 희석 비율에 관계없이 상대오차가 크게 나타난 것을 보여준다. 이는 용액 희석 시 기질용액 사용량이 적을수록 오차가 크게 나타난다는 사실을 보여주는 것이다. 희석비율 1/10에서 기질용액 체적 40 μ l를 제외하곤 모든 구간에서 상대오차율이 2.0% 이내로 가장 작게 나타남을 알 수 있으며, 기질용액 체적 100 μ l에서는 희석비율에 관계없이 상대오차율이 4.0% 이내로 비교적 작게 나타나는 것을 알 수 있다. 따라서 사용하는 기질의 체적이 클수록 상대오차가 작아지는 것을 알 수 있다.

그림 6은 젖산의 희석비율별 체적에 따른 샘플 농도의 상대오차를 나타낸 것으로, 포도당 용액의 경우와 같이 희석비율이 클수록 상대오차가 커지는 것을 알 수 있으나, 기질용액

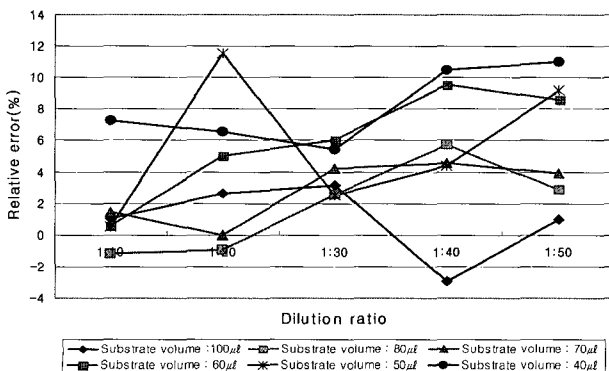


Fig. 5 Relative error of auto diluted glucose solution according to dilution ratio and substrate volume.

체적과는 무관한 것을 알 수 있다. 오히려 기질용액 체적 40, 50 μ l인 경우 상대오차가 작게 나타나는 것을 보여준다. 특히 기질용액 체적 80 μ l의 경우 희석비율 1/10을 제외하고는 상대오차가 매우 크게 나타나고 있다. 이는 포도당 용액에서와 동일하게 용액 희석 시 기질용액 사용량이 적을수록 오차가 크게 나타난다는 사실을 보여주는 것이다. 희석비율 1/10에서 기질용액 체적 60 μ l를 제외하곤 모든 구간에서 상대오차율이 2.0% 이내로 가장 작게 나타남을 알 수 있으며, 기질용액 체적 100 μ l에서는 희석비율 1/50을 제외하고는 상대오차율이 4.0% 이내로 비교적 작게 나타나는 것을 알 수 있다.

그림 7은 에탄올의 희석비율별 체적에 따른 샘플 농도의 상대오차를 나타낸 것으로, 포도당, 젖산 용액의 경우와 같이 희석비율이 클수록 상대오차가 커지는 것을 알 수 있으며, 특정 시험 구를 제외하고는 5.0% 이상으로 크게 나타났다. 특히 기질용액 체적이 80 μ l인 경우 희석비율 1/40, 1/50의 경우 상대오차가 각각 32.0%, 51.0%로 크게 나타난 것을 보여준다. 그 이유는 에탄올이 포도당, 젖산 용액과는 다르게 공기 중에 쉽게 휘발이 되기 때문에 나타난 것으로 판단된다.

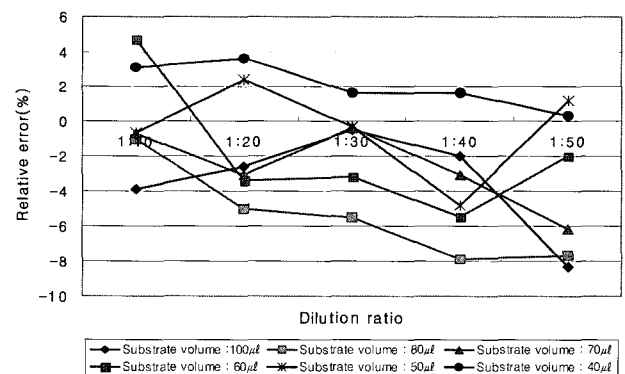


Fig. 6 Relative error of auto diluted lactic acid solution according to dilution ratio and substrate volume.

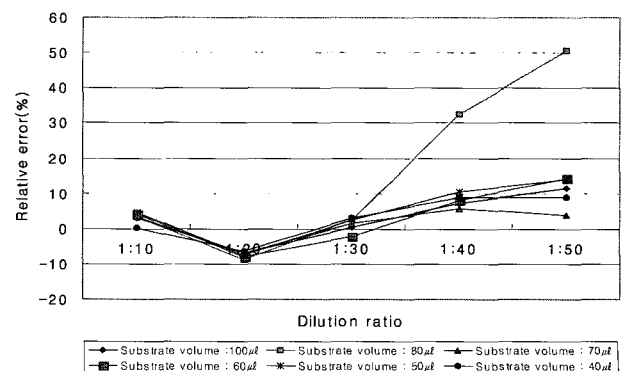


Fig. 7 Relative error of auto diluted ethanol according to dilution ratio and substrate volume.

이러한 현상은 기질용액 사용량이 적을수록 오차 발생이 크게 나타날 수 있으므로, 에탄올과 같이 휘발 특성이 있는 기질을 희석시키는 경우, 기질용액이 대기와 노출이 되지 않도록 하고, 채취된 샘플은 가능한 신속하게 농도측정이 이루어지도록 공정이 구성되어야 할 것으로 판단된다.

이상 포도당, 젖산, 에탄올의 희석 후 농도비교를 통한 자동희석장치 성능검증 결과, 포도당의 경우 최대 상대오차는 11.54%, 젖산의 경우 -8.33%, 에탄올의 경우 14.48%로 비교적 크게 나타났다. 그러나 포도당과 젖산의 경우 희석비율 1/10, 기질체적 70 μ l, 80 μ l에서 상대오차가 2.0% 이하로 나타났으며, 에탄올의 경우 희석비율 1/30, 기질체적 70 μ l에서 상대오차가 역시 2.0% 이하로 나타났다. 따라서 적절한 희석비율 및 기질체적 중량을 선택하고, 장치성능을 개선한다면 실제 적용가능성이 충분하다고 판단된다.

4. 요약 및 결론

기존의 흐름주입식 분석에서 사용된 확산에 의한 용액희석이 갖는 문제점을 해소하고, 발효공정의 온라인 감시를 위한 바이오센서 개발에 반드시 필요한 기질용액 자동희석장치를 화학분석에서 시행되는 관행의 방법을 이용하여 구성하고 그 성능을 평가하였다.

중류수를 이용한 펌프 토출량 실험결과 상대오차는 전 실험 구에서 2.00% 이하로 나타났으며, 표준편차 역시 0.0030 이하로 나타나 구성된 희석장치는 안정적으로 작동되는 것을 확인할 수 있었다.

3종류(포도당, 젖산, 에탄올)의 기질용액을 사용한 자동희석 실험 결과, 포도당과 젖산의 경우 희석비율 1/10, 기질체적 70 μ l, 80 μ l에서 상대오차가 2.0% 이하로 나타났으며, 에탄올의 경우 희석비율 1/30, 기질체적 70 μ l에서 상대오차가 역시 2.0% 이하로 나타나, 자동희석장치의 적용가능성을 확인할 수 있었다.

다만 실제 발효공정에 적용을 위해서는 장치구성, 공정제어, 자료수집 및 처리 등 여러 면에서 보다 많은 연구 및 보완이 필요할 것으로 판단된다.

참고 문헌

1. Hansen, E. H., J. Ruzicka, F. J. Krug and E. A. G. Zagatto. 1983. Selectivity in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. 148:111-125.
2. Olsen, S., J. Ruzicka and E. H. Hansen. 1982. Gradient techniques in flow injection analysis: Stopped-flow measurement of the activity of lactate dehydrogenase with electronic dilution. *Analytica Chimica Acta*. 136:101-112.
3. Ruzicka, J. and E. H. Hansen. 1978. Flow injection analysis: part X. theory, techniques and trends. *Analytica Chimica Acta*. 99:37-76.
4. Schuhmann, W., H. Wohlschlager, J. Huber, H. L. Schmidt and H. Stadler. 1995. Development of an extremely flexible automatic analyzer with integrated biosensors for on-line control of fermentation processes. *Analytica Chimica Acta*. 315:113-122.