

용존산소농도와 pH의 동시 검출용 이중층 광학 센서막의 특성 및 발효공정의 온라인 모니터링에의 응용

김춘광* . **** . ***** . 이종일** . **** . ***** . ***** . †

*전남대학교 물질·생물화학공학과, **전남대학교 응용화학공학부, ***전남대학교 촉매연구소, ****전남대학교 바이오광사업단, *****전남대학교 기능성나노정밀화학사업단 (2009년 1월 5일 접수, 2009년 4월 27일 채택)

Characterization of Double-layer Optical Sensing Membranes for Dual Sensing of Dissolved Oxygen Concentrations and pH and Their Application to the On-line Monitoring of Fermentation Processes

Chun-Kwang Kim* . **** . ***** and Jong Il Rhee** . **** . ***** . ***** . †

**Department of Material and Biochemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*
***School of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*
****Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*
*****Research Center for Biophotonics, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*
******Center for Functional Nano Fine Chemicals, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*
(Received January 5, 2009; accepted April 27, 2009)

용존산소농도(DO)와 pH를 동시에 검출하기 위하여 이중층 광학 센서 막을 제조하였다. DO 민감성 염료인 Rudpp를 MTMS 졸-겔에 혼합하고 24-웰 마이크로타이더 플레이트에 코팅하였다. DO-검출층 위에 HPTS와 혼합된 GA 졸-겔 용액을 코팅하고 pH 측정을 위해 사용하였다. 이중층 광학 센서 막은 온도와 이온 강도에 영향을 받았다. 또한 DO와 pH 이중층 광학 센서 막은 미생물발효공정에 온라인 모니터링 하는데 응용하였으며 좋은 성능을 보였다.

A double-layer optical sensing membrane has been fabricated to measure the concentration of dissolved oxygen (DO) and pH value simultaneously. (tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline (Rudpp) ruthenium(II) as a DO sensitive dye has been mixed in the methyl trimethoxy silane (MTMS) sol-gel solution and coated onto one well in a 24-well microtiter plate. On the DO-sensing layer the GA (3-glycidoxypropyl trimethoxy silane (GPTMS), 3-aminopropyl trimethoxy silane (APTMS)) sol-gel solution mixed with 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) has been coated and used to measure pH values. The double-layer sensing membrane was affected by ionic strength and temperature. The double-layer sensing membrane for DO and pH has been applied to online monitor in microorganism cultivation processes and showed a good performance.

Keywords: double-layer, optical sensing membrane, fermentation monitoring, DO, pH

1. 서 론

광학 센서는 민감성, 비독성, 비침투성 등의 특성으로 인해 여러 분석물질의 검출에 시간과 공간의 제약을 적게 받는다. 즉, 여러 화학적 변수를 동시에 측정할 수 있는 광학 센서의 측정 방법은 생물/화학공정의 실시간 모니터링을 가능하게 한다[1]. 용존산소(dissolved oxygen, DO)농도와 수소이온(hydrogen ion, pH)은 다양한 분야에서 중요한 변수이며 음용수의 수질, 식품의 신선도, 생물반응기에서 세포 활성 등을 모니터링하고 최적 반응 조건을 유지하기 위해 필요하다. 또한, pH와 용존산소농도의 분석은 혈액 등 생리학적 물질의 임상분석,

해수분석 및 연구에 필수적이다. 지금까지는 pH와 용존산소농도는 두 종류의 센서를 사용하여 검출해야 하므로 공간상의 제약 등 어려움이 있었다. 따라서 pH와 DO 등 두 변수를 함께 모니터링 할 수 있는 센서 기술은 화학, 생물 및 환경 등 다양한 분야에서 필요한 기술이다 [2-5].

루테늄(II) 복합체(Rudpp)를 기반으로 한 형광염료 분자들은 산소의 농도에 따라 형광 방출량이 달라지는 물질로써 산화효소를 이용한 바이오센서 등에 많이 사용되고 있다[6,7]. Rudpp는 산소 검출용 형광 염료 중 강한 형광을 발생시키며 양자 수율 및 형광지속시간이 길어 광학 산소센서에 많이 이용되고 있다[8]. Rudpp를 이용한 용존산소의 검출은 산소분자에 의한 형광감쇄원리를 이용하는데, 여기상태의 형광염료가 바닥상태로 떨어지면서 방출하는 에너지를 산소분자가 흡

† 교신저자(e-mail: jirhee@chonnam.ac.kr)

수하여 결과적으로 방출하는 에너지를 소모시키게 되므로 형광세기가 감소하게 된다. 감소되는 형광세기는 산소분자의 농도와 반비례하여 나타난다. 즉, Rudpp는 480 nm의 빛에 의해 여기되어지고 600 nm의 형광을 방출하는데, 방출되는 형광의 세기는 Rudpp 주위의 산소분자 농도와 반비례하여 나타난다. 한편, pH 검출을 위해 사용되는 많은 형광염료 중 HPTS는 가장 많은 연구가 되어졌으며, 광학 pH센서에 많이 사용되어지고 있다[9]. HPTS는 강한 형광을 발생시킬 수 있으며, 독성이 없어 바이오센서에 적용 가능할 뿐만 아니라 저가의 염료로써 상업용 광학 pH센서 개발에 유리하다. 형광을 이용한 pH 검출은 산이나 알칼리에 의해서 형광염료가 양자화 또는 비양자화가 되어 질 때 형광이 발생하는 원리를 이용한다. HPTS는 405 nm의 빛이 조사되었을 때 전자를 흡수하여 여기되고 다시 바닥상태로 전환하면서 510 nm 형광을 방출한다[10].

최근, 광학 생물센서(optical biosensor) 분야에서 효소나 형광염료를 고정화하기 위하여 졸-겔 기법을 사용한다[11-13]. 이는 효소나 형광염료를 졸-겔 용액에 고정화하여 사용할 경우 장시간 사용이 가능하며 효소나 형광염료의 활성저하 현상을 감소시켜 생물센서의 정밀도를 증가시키는 장점을 가지고 있기 때문이다. 특히, 형광 센서 기술은 미생물 발효, 세포배양 공정 등에서 pH와 DO를 실시간 모니터링하기 위해 비침투적으로 사용된다[14].

한편, 24-웰 마이크로타이타 플레이트(24-well microtiter plate)는 고속처리(high-throughput, HT)용 소형 생물반응기로써 사용되고 있는데 [14], 형광물질을 24-웰 마이크로타이타 플레이트의 웰 바닥면에 고정화하여 *E. coli* 배양에서 DO와 pH를 실시간 모니터링 하는 24-웰 소형 생물반응기(miniature bioreactor, MBR) 시스템이 소개되었다[15]. 또한, 24-웰 MBR의 바닥면에 센서와 다양한 검출 방식을 통합시켜 각종 미생물 배양에 사용되기도 하였다[14]. 한편, 평평한 바닥면을 가지는 MBR에 각종 형광물질을 고정화하고 모터 부분에 검출 프로브를 장착한 24-웰 MBR을 이용하여 *Shewenella oneidensis*를 배양하는 동안 pH와 DO의 실시간 모니터링이 수행되었다[16].

본 연구에서는 형광 물질과 졸-겔(sol-gel) 기법을 사용하여 DO와 pH를 동시에 검출할 수 있는 이중층 광학 센서막을 제조하고 이를 24-웰 마이크로타이타 플레이트(24-well microtiter plate)에 적용시켜 광학 모니터링용 다채널 소형 생물반응기를 제작하고자 한다. 또한, 제작된 다채널 소형 생물반응기를 이용하여 *E. coli* DH5 α 와 *B. cereus* 318을 발효하는 동안 DO와 pH를 실시간으로 모니터링 하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서 사용된 시료 및 완충용액 제조용 시약 등은 시그마회사(Sigma Co., USA)에서 구입하였다. 용존산소 검출용 형광염료로는 루테늄 복합체(tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium(II), Rudpp)를 사용하였으며, pH 검출을 위한 형광염료는 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS)를 사용하였다. 각종 완충용액, 즉, 나트륨인산완충용액(100 mM)과 아황산나트륨 수용액(40 g/L)은 실험실에서 제조하여 사용하였다.

2.2. 졸-겔 제조

Rudpp 고정화 졸-겔을 형성하기 위해 methyl trimethoxy silane (MTMS, Aldrich Co., USA)을 사용하였으며, 용매로는 99% 에탄올

(Et-OH)을, 촉매로는 35% HCl을 사용하였다. 각 물질의 혼합비율은 MTMS : Et-OH : H₂O : HCl = 3.97 mL : 1.84 mL : 0.72 mL : 18 μ L이며 혼합 후 3 h 동안 격렬히 교반하여 졸-겔을 제조하였다. 또한, HPTS를 고정화하기 위한 졸-겔로는 3-glycidoxypopyl trimethoxy silane (GPTMS)과 3-aminopropyl trimethoxy silane (APTMS)를 사용하였으며, 용매와 촉매제로는 각각 99% 에탄올과 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 혼합 후 2 h 동안 교반하여 졸-겔을 제조하였다.

2.3. 이중층 광학센서막 제조

용존산소와 pH 검출용 형광염료인 Rudpp와 HPTS를 24-웰 마이크로 플레이트(24-well microtiter plate, NUNC Co., Denmark)의 웰 바닥면에 고정화하기 위해 상기에서 제조한 졸-겔을 사용하였다. 용존산소 검출용 센서막을 제조하기 위해 MTMS 졸-겔 용액에 Rudpp를 5 mg/mL 정도 혼합하여 센서막 용액을 제조하였다. 제조된 용존산소 센서막 용액, 20 μ L를 하나의 웰 바닥면에 떨어뜨린 후 자체 개발한 코팅기(one-well knife coating)를 이용하여 얇게 코팅한 후 실온에서 하루 동안 건조하였다. 그리고 센서막 표면을 매끄럽게 하기 위하여 60 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 건조시켜 용존산소 검출용 센서막을 제조하였다. pH 검출을 위해 GPTMS-APTMS (GA) 졸-겔 용액에 HPTS를 5.2 mg/mL을 혼합하여 센서막 용액을 제조한 후 완전 건조된 용존산소 검출막 위에 20 μ L를 떨어뜨린 후 코팅기를 이용하여 얇게 코팅한 후 실온에서 하루 동안 건조한 후, 다시 60 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 건조시켜 용존산소와 pH의 이중 검출이 가능한 이중층 광학 센서막을 완성시켰다.

2.4. 용존산소농도 및 pH의 측정을 위한 형광세기 측정

용존산소와 pH의 변화에 따른 24-웰 마이크로 플레이트의 각 웰의 바닥면에 고정화된 광학 센서막의 형광세기의 변화를 측정하기 위하여 형광다분분석기(Sapphire², TECAN Co., Austria)를 이용하였다. 용존산소농도를 측정하기 위해 여기파장(ex) 480 nm와 방출파장(em) 600 nm에서의 형광세기를 측정하였으며 pH는 여기파장 410 nm와 방출파장 520 nm에서 형광세기를 측정하였다.

2.5. 발효 공정

미생물을 발효하는 공정에서 발효액의 용존산소농도와 pH의 값을 실시간 모니터링 하기 위해 각 웰에 Rudpp와 HPTS로 구성된 이중층 센서막을 가진 24-웰 마이크로 플레이트반응기를 이용하였다. 본 연구에서 미생물은 *E. coli* DH5 α 와 *B. cereus* 318을 사용하였는데 *E. coli* DH5 α 의 배양에는 LB배지(yeast extract: 5 g/L, tryptone: 10 g/L, NaCl: 10 g/L), *B. cereus* 318의 배양에는 바실러스용 배지(glucose: 5 g/L, peptone: 5 g/L, yeast extract: 5 g/L, NaHCO₃: 3 g/L)를 사용하여 균주 활성화 및 본 배양을 하였다. 각각의 미생물은 LB배지 3 mL에 접종하여 진탕 배양기(Jeiotech Co., Korea)에서 *E. coli* DH5 α 는 37 $^{\circ}$ C 180 rpm으로 중간배양하고, *B. cereus* 318은 30 $^{\circ}$ C 200 rpm에서 중간 배양을 하였다. 12 h 중간 배양 후 새로운 배지에 1% 접종하고, 이중층 센서막을 가진 24-웰 마이크로 플레이트 반응기에 1.5 mL/well로 분주한 후, 450 nm와 470 nm의 LED가 장착된 광학 온라인 모니터링 기반 다채널소형생물반응기(MABOOMS, B&P Tech Co., Korea)를 이용하여 37 $^{\circ}$ C 또는 30 $^{\circ}$ C에서 교반속도 400 rpm으로 24 h 동안 각각 배양하였다.

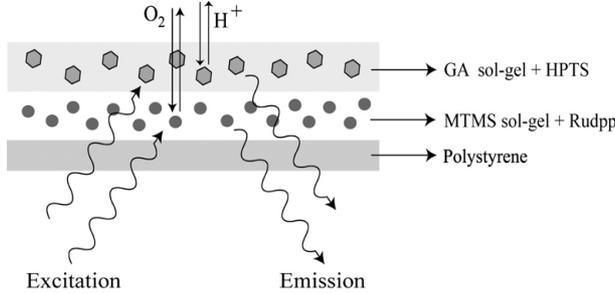


Figure 1. Diagram of the double layer sensing membranes for dual detection of pH and DO.

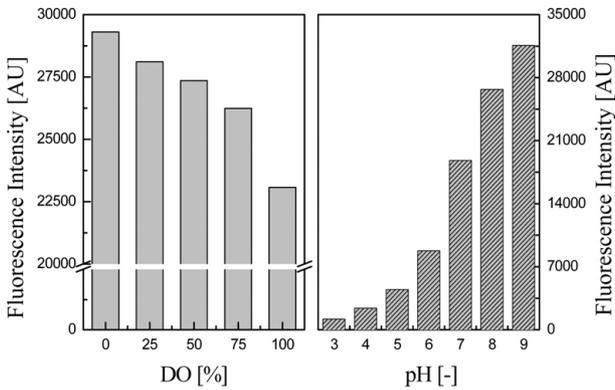


Figure 2. Fluorescence intensity of a dual sensing membrane for DO and pH at different dissolved oxygen concentrations and pH values.

3. 결과 및 고찰

3.1. 용존산소농도와 pH의 동시 검출용 이중층 광학 센서막의 구성

본 연구에서 제조한 용존산소와 pH의 이중 검출용 광학 센서막의 구조를 Figure 1에 나타내었다. Rudpp와 HPTS 형광염료를 MTMS 졸-겔 용액에 각각 혼합하고 웰의 하단에 Rudpp 막을 코팅한 후 상단에 HPTS 막을 코팅한 경우는 하단의 Rudpp 막이 손상되어 용존산소 검출이 이루어지지 않았다. 또한, HPTS를 GA 졸-겔 용액에 혼합하고 웰의 하단에 코팅하고 Rudpp를 MTMS 졸-겔 용액에 혼합하여 상단에 코팅한 경우는 용존산소의 검출은 가능하였으나 pH가 측정되지 않았다. 즉, 용액중의 수소 이온이 MTMS 막을 투과하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 Rudpp 형광염료는 MTMS 졸-겔 용액과 혼합하여 웰의 하단에 코팅하였고 HPTS 형광염료는 GA 졸-겔 용액과 혼합하여 상단에 적층하는 구조로 제조하였다.

3.2. 용존산소농도와 pH의 검출용 이중층 광학 센서막의 특성

용존산소 검출막과 pH 검출막이 적층구조로 이루어진 이중층 광학 센서막의 산소 및 수소이온 검출 특성을 알아보았다. 3차 증류수와 아황산나트륨 수용액(40 g/L)을 혼합하여 용존산소농도가 100%와 0% 사이일 때의 형광세기를 여기 파장 480 nm, 방출 파장 600 nm에서 측정하였다. Figure 2에서 용존산소 농도가 높을 때 형광세기는 낮은 값을 나타냈고 용존산소 농도가 낮을 때 형광세기는 높게 나타났다. 또한, pH에 따른 형광 특성 변화를 조사하기 위하여 각기 다른 pH의 인산완충용액(pH 3~9)을 제조하여 형광세기를 측정하였다. Figure 2에서 pH가 증가함에 따라 측정된 형광세기가 증가함을 알 수 있었다.

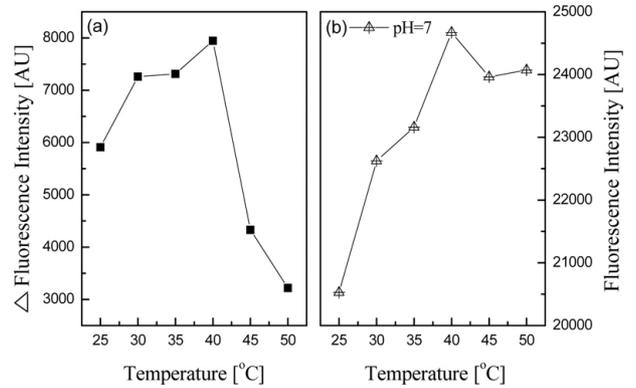


Figure 3. Fluorescence intensity of a dual sensing membrane for (a) DO and (b) pH at different temperatures.

따라서, 본 연구에서 5 mg/mL Rudpp와 5.2 mg/mL HPTS로 구성된 이중층 센서막으로 용존산소농도와 pH의 동시 검출이 가능함을 알 수 있다.

이중층 광학 센서막을 이용하여 DO와 pH를 측정할 때 시료의 온도에 따른 형광 세기 변화를 조사하였다. 용존산소 농도가 낮은 경우(0%)에는 온도가 25 °C에서 40 °C로 증가함에 따라 형광세기(ex 480 nm/em 600 nm)가 증가하다가 그 이상의 온도에서는 Rudpp의 형광세기가 오히려 감소하는 결과를 보였으며, 용존산소 농도가 높은 경우(100%)에는 25 °C에서 50 °C로 증가함에 따라 형광세기가 감소하였다(데이터 표시하지 않음). Figure 3(a)에 온도에 따른 용존산소농도가 0%와 100%인 용액의 형광세기 차이를 나타내었는데, 이러한 변화는 온도에 따라 시료 내의 산소 용해도가 변하여 Rudpp의 형광감쇠 상수 (fluorescence quenching constants)값이 변하기 때문이다. 또한, 온도가 25 °C에서 50 °C로 증가함에 따라 이중층 광학 센서막에서 pH 7인 인산용액의 형광세기(ex 410 nm/em 520 nm)가 상당히 증가함을 볼 수 있었다(Figure 3(b)). 따라서 이중층 광학 센서막을 이용하여 시료 용액 중 pH 값을 정확히 측정하기 위해서는 온도에 따른 형광세기 변화를 고려하여야 할 것이다.

이중층 광학 센서막에 대한 나트륨 이온(Na⁺)의 세기에 의한 형광 특성 변화를 조사하였다. 용존산소 검출용 형광 파장(ex 480 nm/em 600 nm)에서는 나트륨 이온의 농도에 따른 형광 세기의 변화가 크지 않았다. Figure 4에서는 pH 7인 인산완충용액에 나트륨 이온(Na⁺)을 첨가한 후 pH 검출용 형광 파장(ex 410 nm/em 520 nm)에서 형광 세기를 측정하였는데 이온세기가 25~150 mM로 높아짐에 따라 pKa' 값이 낮은 쪽으로 이동하므로 형광세기가 증가함을 볼 수 있었다. 따라서 pH값을 정확히 측정하기 위해서는 나트륨 이온의 세기에 따른 형광 세기의 변화를 고려할 필요가 있다.

3.3. 24-웰 마이크로 플레이트 생물 반응기를 이용한 발효공정에서 DO와 pH의 온라인 모니터링

국내에서 제작된 MABOOMS를 이용한 용존산소와 pH에 대한 형광검출 특성을 조사하기 위하여 용존산소농도가 100%와 0%일 때의 형광 세기를 측정하였는데 용존산소 농도에 따른 형광세기의 변화는 기존의 상업용 형광다중분석기를 이용한 것과 거의 같았다. 그러나 pH에 따른 형광 특성 변화를 조사했을 때 형광다중분석기를 이용한 실험결과와 달리 pH값이 감소함에 따라 형광세기는 증가하였다(데이터 표시하지 않음). 이는 형광다중분석기와 MABOOMS에서 사용된 여기광(excitation light source) 필터의 파장이 서로 다른데서 기인한

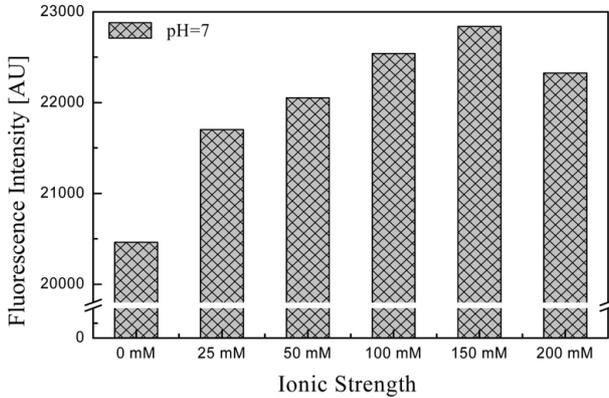


Figure 4. Fluorescence intensity of a dual sensing membrane for DO and pH at different ionic strength (Na^+).

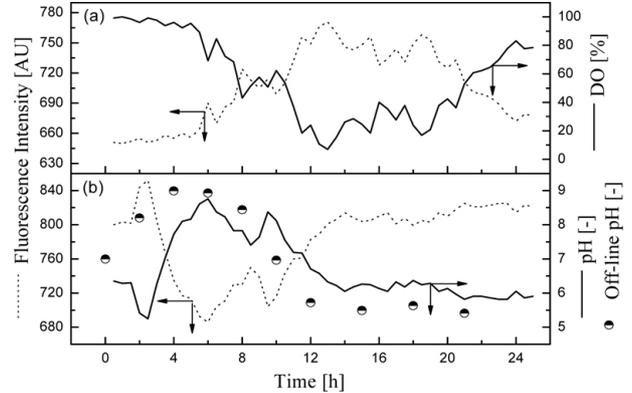


Figure 6. Dual monitoring of the fluorescence intensity for (a) DO and (b) pH during the fermentation of *B. cereus* 318.

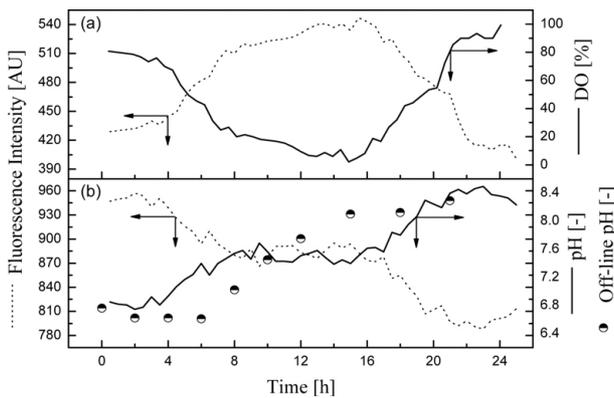


Figure 5. Dual monitoring of the fluorescence intensity for (a) DO and (b) pH during the fermentation of *E. coli* DH5 α .

것으로 사료된다.

한편, 본 연구에서 제작된 24-웰 마이크로 플레이트 생물 반응기를 이용하여 MABOOMS에서 *E. coli* DH5 α 와 *B. cereus* 318의 배양 중 DO와 pH에 대한 형광세기의 변화를 조사하였다(Figures 5, 6). 용존 산소농도에 따른 형광세기의 변화는 *E. coli* DH5 α 와 *B. cereus* 318이 일정시간의 정체를 거친 후 미생물이 성장하는 지수 성장기에서 산소를 소모하기 때문에 형광세기가 급격하게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 지수성장기 이후 사멸기에서는 형광세기가 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 Figure 5와 6에서 각 발효공정의 pH에 따른 형광세기의 변화는 미생물의 성장에 따라 각 공정마다 다르게 나타났다. *E. coli* DH5 α 는 배양 초기에 이산화탄소의 발생으로 pH가 감소하며 이에 따라 형광 세기는 증가하다가 배양 2 h 이후 pH가 증가함에 따라 ex 450 nm/em 520 nm에서 형광세기가 감소하는 경향을 나타내었다. *B. cereus* 318의 경우에는 배양 초기에는 형광세기가 증가하다가 배양 2.5 h 이후 형광세기가 급격히 감소한 후 배양 6 h 부터 형광세기가 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 pH 변화에 따른 형광 세기의 변화는 각 미생물에 대한 오프라인 데이터와 유사한 경향을 나타내었다. 그러나, 균주 접종 직후, 형광 센서 막에 배양액이 침투되어 안정화 되는 시간으로 인해 발생하는 오차와 오프라인 측정 시 발생하는 오차로 인하여 온라인 데이터와 오프라인 데이터 값의 차이가 나타난 것으로 사료된다. 따라서, 온라인 데이터는 배양액 중의 용존산소 농도와 pH의 정확한 값을 측정하기보다는 배양액 중의

두 변수의 변화를 파악하는데 적합하다.

각 형광과장에서 측정된 형광세기를 DO와 pH값으로 전환하기 위해 보정곡선을 이용하는데, DO는 0%와 100% 용존 산소 용액을 이용하여 보정곡선을 만들었고 pH는 pH 5~9 용액을 이용하여 보정곡선을 만들었다. 본 연구에서 표준 pH 용액과 측정된 형광세기와 상관은 37 °C (*E. coli* DH5 α)에서는 상관계수(R^2) 값이 0.971 ($Y = -0.010X + 16.630$, X : 형광세기, Y : pH)이며, 30 °C (*B. cereus* 318)에서는 R^2 값이 0.981 ($Y = -0.021X + 23.251$, X : 형광세기, Y : pH)로 좋은 상관관계를 갖는다.

따라서, 본 연구에서 개발한 DO와 pH를 측정하기 위한 이중층 광학 센서막은 미생물 배양 공정에서 pH와 DO의 모니터링에도 적합함을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 형광염료인 Rudpp와 HPTS를 줄-겔 용액에 혼합하여 용존산소농도와 pH를 동시에 검출할 수 있는 이중층 광학 센서막을 제조하였다. 이중층 광학 센서막을 구성하기 위하여 5 mg/mL Rudpp을 MTMS 줄-겔 용액과 혼합한 후 24-웰 마이크로 플레이트의 웰 바닥면에 먼저 코팅한 후 5.2 mg/mL HPTS를 GPTMS-APTMS (GA) 줄-겔에 혼합하여 Rudpp 막 상단에 적층구조로 코팅하여 이중층 광학 센서막을 제조하였다.

이중층 광학 센서막에 대한 온도와 이온 강도에 대한 영향성을 조사하였으며 정확한 용존산소농도와 pH를 검출하기 위해서는 이러한 외란에 대한 영향성을 고려해야 한다.

이중층 광학 센서막을 24-웰 마이크로 플레이트의 웰에 적용시켜 미생물 발효 공정 중 DO와 pH를 실시간 모니터링 하는데 적용하였다. 국내 개발된 MABOOMS를 이용하여 실제 미생물 배양 중에 용존산소와 pH를 모니터링 한 결과 일반 생물반응기에서 DO전극과 pH전극 센서에 의해 측정된 결과와 매우 유사하게 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발된 이중층 광학 센서막은 용존산소농도와 pH의 이중 검출이 가능하며 실제 발효 공정의 실시간 모니터링도 가능함을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI04-03-03)과 Post-BK21 사업 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. S. Nagl and O. S. Wolfbeis, *Analyst*, **132**, 507 (2007).
2. A. S. Kocincova, S. M. Borisov, C. Krause, and O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, **79**, 8486 (2007).
3. S. M. Borisov, C. Krause, S. Arain, and O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.*, **18**, 1511 (2006).
4. B. Zelelow, G. Khalil, G. Phelan, B. Carlson, M. Gouterman, J. B. Callis, and L. R. Dalton, *Sens. Actuators B-Chem.*, **96**, 304 (2003).
5. S. M. Borisov, G. S. Vasylevska, C. Krause, and O. S. Wolfbeis, *Adv. Funct. Mater.*, **16**, 1536 (2006).
6. K. P. McNamara, X. Li, A. D. Angela, and Z. Rosenzweig, *Anal. Chim. Acta*, **361**, 73 (1998).
7. A. C. Tizzard, J. H. Bergsma, and G. Lloyd-Jones, *Biosen. & Bioelectro.*, **22**, 759 (2006).
8. Y. Amao and I. Okura, *Sens. Actuators B-Chem.*, **88**, 162 (2003).
9. H. R. Kermis, Y. Kostov, and G. Rao, *Analyst*, **128**, 1181 (2003).
10. D. A. Nivens, M. V. Schiza, and S. M. Angel, *Talan.*, **58**, 543 (2002).
11. M. E. Koese, B. F. Carrol, and K. S. Schanze, *Langmuir*, **21**, 9121 (2005).
12. C.-K. Kim, O.-J. Sohn, and J. I. Rhee, *Proc. Korean Sensors Conference*, 77, Chosun University, Gwangju, Korea (2007).
13. C.-K. Kim, O.-J. Sohn, and J. I. Rhee, *Proc. 2008 Spring KSBB meeting and Intern. Symp.*, 96, Chonbuk National University, Jeonju, Korea (2008).
14. P. Harms, Y. Kostov, J. A. French, M. Soliman, A. Anjanappa, A. Ram, and G. Rao, *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 6 (2006).
15. F. Kensity, G. T. John, B. Hofmann, and J. Büchs, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **75**, 75 (2005).
16. Y. J. Tang, D. Laidlaw, K. Gani, and J. D. Keasling, *Biotechnol. Bioeng.*, **95**, 176 (2006).