

용존산소와 pH의 동시 검출용 광학 센서 막을 이용한 미생물 발효공정의 온라인 모니터링

김춘광^{1,4,5} · 이종일^{2,3,4,5*}

¹전남대학교 물질·생물화학공학과, ²응용화학공학부, ³촉매연구소, ⁴바이오광사업단, ⁵기능성 나노정밀화학사업단

On-line monitoring of microorganism cultivation processes using optical sensing membranes for simultaneous detection of dissolved oxygen and pH

Chun-Kwang Kim^{1,4,5} and Jong Il Rhee^{2,3,4,5*}

¹Department of Material and Biochemical Engineering, ²School of Applied Chemical Engineering, ³Research Institute for Catalysis, ⁴Research Center for Biophotonics, ⁵Center for Functional Nano Fine Chemicals

Abstract An optical sensing membrane has been fabricated to measure the concentration of dissolved oxygen(DO) and pH value simultaneously. It has employed HPTS as a pH sensitive dye and a ruthenium(II) complex as a DO sensitive dye. The sensing membrane has been applied to wells in a 24-well microtiter plate. Using the 24-well microtiter plate the concentrations of dissolved oxygen and pH values have been on-line monitored during the cultivations of *E.coli DH5a*, *B.cereus 318* and *P.pastoris X-33*. On-line monitoring of DO and pH in microorganism cultivation processes showed good performance of the sensing membrane containing 5 mM HPTS and 2 or 5 mg/mL Rudpp.

Keywords: Process monitoring; Optical sensing membrane; DO; pH; Microorganism

서 론

용존산소 (dissolved oxygen, DO)와 수소이온 (hydrogen ion, pH)의 측정은 환경 모니터링, 해양연구, 식품산업, 생물공학 그리고 의약분야에서 매우 중요하다(1). 용존산소 양의 모니터링은 생물 산업에 있어서 미생물의 성장과 반응 상태에 대한 정보를 제공하며 생물공정을 최적화하는데 필요할 뿐만 아니라 환경산업에서 오폐수의 오염정도를 측정하는데 매우 중요하다. 또한, 의용공학 분야에서 환자의 생리상태를 파악하기위해 혈액 중에 녹아있는 산소 농도를 측정할 필요가 있다. 수소이온 농도는 혈액과 체액의 임상분석, 식품의 신선도 조절에 대한 특성변

수로써 중요하며 생화학 반응에서 최적 반응조건을 찾기 위한 공정매개변수로써 사용되고 있다. 이러한 용존산소 농도와 pH의 검출은 복잡한 환경이나 산업 공정등에서 요구되고 있으며, 최근 두가지 변수의 동시 검출에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(2-7).

광섬유와 집적광학 부분의 발전 그리고 LED와 같은 마이크로 레이저 기술의 발달은 기존의 전기화학 센서를 대체할 만한 광학센서의 개발에 크게 기여하고 있다(8-10). 광학 센서는 기존의 전자소자 대신 빛을 이용하여 신호를 측정하고 측정 정보의 전달도 빛으로 하므로 전자기장이 발생하지 않는 장점을 지니고 있다(11). 특히, 특정물질 (용존 산소 분자, 이산화탄소 분자 등)이나 pH 변화에 따라 선택적으로 발광하는 광학 염료가 개발되어 광학 센서분야에서 활발히 이용되고 있다(12). 즉, 광학적 분석기술은 시간과 비용 절감이라는 상업적 요소를 충분히 갖추고 있어 각종 산업 분야에서 다양하게 응용되고 있다. Shi(13) 등

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1847, Fax: +82-62-530-0846
e-mail: jirhee@chonnam.ac.kr

은 철 지시제인 페로신 (ferrocene)과 pH 지시제인 HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt)를 동일한 박막 상의 인접부에 고정화하여 철과 pH를 감쇠 전반사 (attenuated total reflection, ATR) 분광분석에 의해 검출하는 기술을 보고하였다. Vasylevska(2) 등은 카복시플루오레세인 (carboxyfluorescein)을 pH 프로브로, 루테늄 복합체 (Rudpp)를 용존산소 프로브로 각각 사용하여 pH와 용존산소를 동시에 검출할 수 있는 단일 광섬유 광학센서를 개발, 보고한 바 있다. 또한, Jorge(14) 등은 양자점과 루테늄 복합체를 이용하여 온도와 용존산소를 동시에 검출하는 기술에 대해 개발하였는데, 동일한 박막 상의 인접한 위치에 양자점과 루테늄을 각각 고정화하여 사용하였다.

한편, 기존의 대형 미생물발효기를 소형화하고 광학 모니터링 기법을 이용하여 생물공정을 실시간으로 모니터링 하고자 다중 소형생물반응기의 개발이 활발히 진행되고 있다(15). 즉, 기존에 많이 사용되는 진탕 배양기를 이용한 미생물 발효의 경우 배지 및 발효 조건에 최적화에 많은 시간과 비용이 소요될 뿐만 아니라 발효 공정 중 용존산소, pH 등 주요 매개변수의 실시간 모니터링이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 반면에, 다중 소형 생물반응기는 제약, 생물제품 생산 공정의 최적화에 있어서 적은 비용과 짧은 시간에 최적 공정조건을 개발할 수 있도록 하여 공정개발 비용을 최소화 할 수 있으며, 광학 센서 막을 적용시켜 발효 공정 중에 pH, 용존산소 등 각종 변수를 실시간으로 모니터링 하는 것이 가능하다는 장점을 가지고 있다(3, 16).

따라서, 본 연구에서는 형광 물질과 졸-겔 (sol-gel) 기법을 사용하여 용존산소농도와 pH를 동시에 검출할 수 있는 광학 센서 막을 제조하고, 이를 24-웰 마이크로플레이트 (24-well microtiter plate)에 적용시켜 광학 모니터링 용 다중 소형 생물반응기를 제작한다. 그리고 제작된 다중 소형 생물반응기를 이용하여 *E.coli* DH5a, *B.cereus* 318, *P.pastoris* X-33 등을 발효하는 동안 용존산소와 pH의 농도를 실시간으로 모니터링 하고자 한다.

재료 및 방법

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, 또한 pH 검출을 위해서 형광염료인 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS)을 사용하였다. 그리고 나트륨인산완충용액 (0.1 mM)과 질산나트륨 수용액 (40 g/L)은 실험실에서 제조하여 사용하였다.

졸-겔 제조

졸-겔을 형성시키기 위해 methyl trimethoxy silane (MTMS, Aldrich Co., USA)을 사용하였으며, 용매로는 99% 아세톤을, 촉매로는 35% HCl을 사용하였다. 각 물질의 혼합 비율은 MTMS : 아세톤 : 물 : HCl = 3.97 mL : 1.84 mL : 0.72 mL : 18 μ L이며 혼합후 3시간 동안 격렬히 교반하여 졸-겔을 제조하였다.

센서 막 제조

용존산소와 pH 검출용 형광염료인 Rudpp와 HPTS를 24-웰 마이크로 플레이트 (24-well microtiter plate, NUNC Co., Denmark)에 고정화하기 위해 위에서 제조한 졸-겔을 사용하였다. 용존산소와 pH의 검출용 센서 막을 제조하기 위해 졸-겔 용액에 2 mg/mL 또는 5 mg/mL Rudpp와 5 mM HPTS를 각각 혼합하여 센서 막 용액을 제조하였다. 그리고 제조된 센서 막 용액 20 μ L를 24-웰 마이크로 플레이트의 각 웰 바닥 면에 떨어뜨린 후, 공기 중에 하루 동안 건조하였다. 그리고 센서 막 표면을 매끄럽게 하기 위하여 60°C에서 하루 동안 건조시켜 검출용 센서 막을 제조하였다.

형광세기, 용존산소농도 및 pH의 측정

용존산소와 pH의 변화에 따른 형광 센서 막에서 각 형광염료의 형광세기의 변화를 측정하기 위하여 형광다중분석기 (Sapphire², TECAN Co., Austria)를 이용하였다. 한편, 용액중 용존산소 농도와 pH 값을 측정하기 위하여 pH 전극 (Orion 8102BNUWP)과 용존산소 전극 (Orion 081010MD)을 이용한 전류 측정기 (pH-DO benchtop, Thermo Co. USA)를 사용하였다.

미생물 발효

미생물을 발효하는 중 용존산소와 pH의 값을 실시간 모니터링 하기위해 균주로 *E.coli* DH5a, *B.cereus* 318과 *P.pastoris* X-33을 사용하였다. *E.coli* DH5a의 배양에는 LB배지 (Yeast extract : 5 g/L, Tryptone : 10 g/L, NaCl : 10 g/L), *B.cereus* 318의 배양에는 바실라스용 배지 (Glucose : 5 g/L, Peptone : 5 g/L, Yeast extract : 5 g/L, NaHCO₃ : 3 g/L) 그리고 *P.pastoris* X-33의 배양에는 YPD배지 (Yeast extract : 10 g/L, Peptone : 20 g/L, Dextrose : 20 g/L)를 사용하여 균주를 활성화 시켰다. 복합 배지 내에는 많은 단백질이 포함되어 있으며 특히, NADH와 같은 조효소는 강한 형광을 발하는 물질이므로 본 배양 과정에서는 최소 배지인 MS8배지(17)를 사용하였다. 각각의 균주는 복합 배지 3 mL에 접종하여 진탕 배양기 (SI-600R, Jeiotech Co., Korea)에서 *E.coli* DH5a는 37°C 180 rpm으로 종균

배양하고, *B.cereus* 318과 *P.pastoris* X-33는 30°C 200 rpm에서 종균배양을 하였다. 12시간 종균 배양 후 최소배지인 MS8 (Glucose : 6 g/L, MgSO₄ · 7H₂O : 1 g/L, NH₄Cl : 0.2 g/L, (NH₄)₂SO₄ : 2 g/L, KH₂PO₄ : 13 g/L, K₂HPO₄ : 10 g/L, NaH₂PO₄ : 6 g/L, Trace elements stock solution : 400 µL/mL, Vitamin stock solution : 400 µL/mL)과 BMGY 배지 (Yeast extract : 10 g/L, Peptone : 20 g/L, 1 M potassium phosphate buffer : 10% v/v, YNB (Yeast nitrogen base) : 13.4 g/L, Biotin : 0.4 mg/L, Glycerol : 1% v/v)에 1% 접종하고, 2 mg/mL Rudpp와 5 mM HPTS로 구성된 센서 막을 가진 24-웰 마이크로 생물반응기에 1.5 mL/well로 분주하여 진탕 배양기를 이용하여 37°C 또는 30°C에서 120 rpm으로 24시간 동안 각각 배양하였다. 발효중 형광다중분석기를 이용하여 2시간 간격으로 형광세기를 측정하였는데 용존산소의 변화는 여기파장 480 nm와 방출파장 600 nm에서의 형광세기를 측정하였으며 pH는 여기파장 410 nm와 방출파장 520 nm에서 형광세기를 측정하였다.

결과 및 고찰

용존산소와 pH의 동시 검출용 혼합 형광 조성물의 특성

용존 산소와 pH를 동시에 검출하는 검출막을 제조하기 위해서는 두 종류의 형광염료 (Rudpp, HPTS)를 적절한 비율로 혼합하는 것이 중요하다. 우선 pH 검출용 형광물질인 HPTS 50 µM과 용존산소 검출용 형광물질, Rudpp 500 µg/mL를 혼합하여 혼합된 형광 염료의 형광 특성을 살펴보았다. 두 형광염료를 3차 증류수와 황산나트륨용액 (40 g/L)에 각각 혼합하여 용존산소농도가 100%와 0%일 때의 형광 세기를 여기파장 480 nm와 방출파장 600 nm에서 측정한 것을 Fig. 1에 나타냈다. Fig. 1에서 용존산소 농도가 높을 때 형광 세기는 낮은 값을 나타냈고 용존산소 농도가 낮을 때 형광세기는 높게 나타났다. 또한, 황산나트륨용액에 의해 pH값이 7에서 9로 변화됨에 따라 여기파장 410 nm와 방출파장 520 nm에서 형광세기도 변화하였다. 따라서 500 µg/mL Rudpp와 50 µM HPTS를 혼합한 경우 용존산소와 pH의 변화를 모두 관찰할 수 있음을 알 수 있다.

혼합된 형광염료의 pH에 따른 형광 특성 변화를 자세히 조사하기 위하여 각기 다른 pH 용액 (pH 3 - pH 10)에 두 형광 염료를 첨가하여 형광 세기를 측정하였다. Fig. 2에서 pH가 증가함에 따라 측정된 형광 세기가 증가함을 알 수 있다. 또한, Fig. 2에서 혼합된 두 형광 염료용액의 온도에 따른 형광 세기 변화를 조사한 결과 pH 7에서 용액의 온도가 25°C에서 35°C로 증가함에 따라 여기파장 410 nm와 방출파장 520 nm에서 검출된 형광세기 값이 커짐을 알 수 있으며 특히 높은 온도에서 보다 낮은 온도에서 형광세기의 편차 값이 크게 나타났다. 그리고 혼합

형광 조성물에 대한 나트륨 이온 (Na⁺)의 세기에 의한 형광특성 변화를 조사한 결과 DO 검출시 (여기파장 480 nm와 방출파장 600 nm)에는 이온 세기에 따라 형광 세기의 변화가 크지 않았으나, pH 검출 (여기파장 410 nm와 방출파장 520 nm)에서는 이온세기에 의해 영향을 받는데 이온세기가 높아짐에 따라 pKa' 값이 낮은 쪽으로 이동하며 형광세기의 편차는 감소함을 알 수 있다. 이것은 높은 이온세기 (IS 50~400 mM)에서 보다 특히 낮은 이온세기 (IS 2 mM)에서의 형광 특성변화를 고려해야 함을 의미한다(데이터 표시하지 않음).

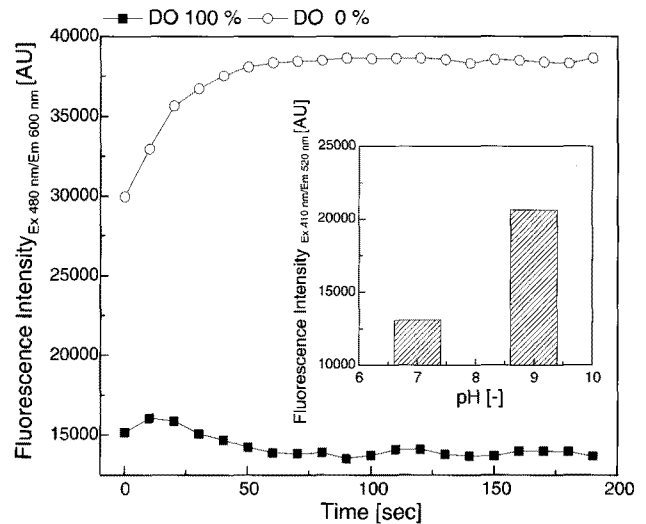


Fig. 1. Fluorescence intensity of Rudpp and HPTS in the mixed solution of fluorescence dyes (500 µg/mL Rudpp and 50 µM HPTS) at different DO and pH values.

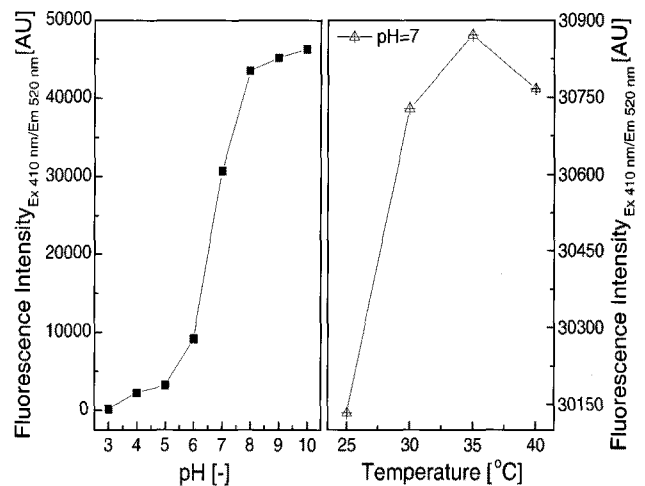


Fig. 2. Fluorescence intensity of HPTS in the mixed solution of fluorescence dyes (500 µg/mL Rudpp and 50 µM HPTS) at different pH values and different temperatures.

한편, 3차 증류수에 pH 검출용 형광물질 50 µM HPTS와 용존산소 검출용 형광물질 500 µg/mL Rudpp를 넣어 혼합

형광 조성물을 만든 후, 40 g/L sodium sulfite로 pH를 변화시키면서 각각의 파장 (Ex 410 nm/Em 520 nm와 Ex 480 nm/Em 600 nm)에서 형광세기를 측정하였다. 각 파장에서 측정된 형광세기를 용존산소 전극과 pH 전극을 이용하여 측정한 DO 및 pH값과 비교하여 상관관계를 Fig. 3에 나타냈다. Fig. 3에서 pH값이 증가함에 따라 형광세기 값이 증가하지만 용존산소 농도 값이 증가함에 따라 검출된 형광세기 값이 감소함을 볼 수 있다. pH 6에서 8.5까지의 범위에서 형광세기와 pH 전극과의 선형상관계수 (R^2)는 0.998이고 DO 0%에서 100%까지의 범위에서 형광세기와 DO 전극과의 선형상관계수는 0.991이다. 이와 같이 높은 상관계수로부터 혼합된 두 형광 염료 (50 μ M HPTS와 500 μ g/mL Rudpp의 혼합 형광조성물)는 pH와 DO의 측정에 매우 적절함을 알 수 있다. 따라서 미생물 배양공정에서 pH와 DO를 실시간 모니터링하기 위해 혼합 형광조성물을 줄-겔 용액에 고정화시켜 센서 막을 제작하고 그 형광 특성을 조사할 필요가 있다.

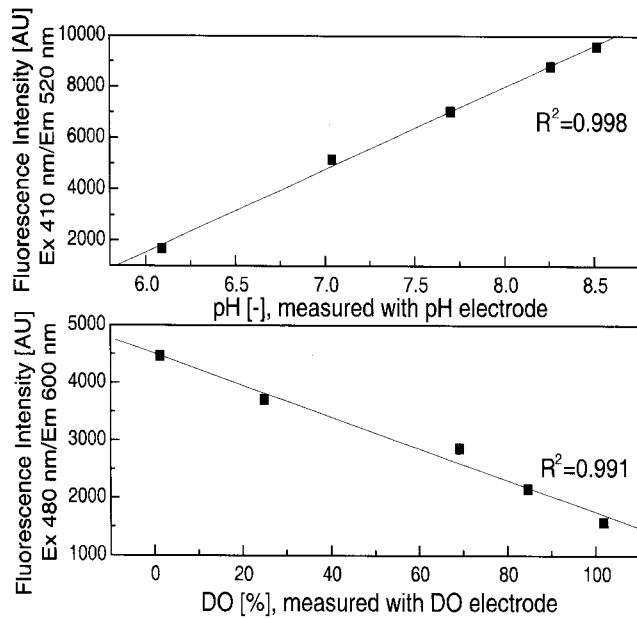


Fig. 3. Comparison of fluorescence intensity of Rudpp or HPTS in the mixed solution of fluorescence dyes (500 μ g/mL Rudpp and 50 μ M HPTS) with the measurement values of the DO electrode or the pH electrode.

용존산소와 pH의 동시 검출용 형광 센서막의 특성

500 μ g/mL Rudpp와 50 μ M HPTS 형광염료를 줄-겔 용액에 혼합한 후 균질 용액을 제조하기 위해 10분 동안 초음파 처리한 후 센서 막을 제조하여 형광 스펙트럼을 측정하였다. 동시 검출용 센서 막에서도 혼합 형광 염료 용액과 같이 pH 검출용 형광염료인 HPTS는 여기파장 410 nm과 방출파장 520 nm에서 최대 형광세기가 측정되었고, DO 검출용 형광염료인 Rudpp는 여기파장 480 nm

과 방출파장 600 nm에서 최대 형광세기가 검출 되었다. 그러나 그 형광세기는 혼합용액에서 보다 매우 작았으므로 용존산소와 pH의 동시 검출을 위한 센서 막 제조를 위해 Rudpp는 2 mg/mL 또는 5 mg/mL을 첨가하고 HPTS는 1 mM에서 10 mM로 변화하면서 동시 검출 센서 막의 형광 감응 특성을 조사하여 Fig. 4에 나타냈다. Fig. 4에서 5 mM HPTS와 2 mg/mL 또는 5 mg/mL Rudpp의 조건에서 pH와 DO가 동시에 잘 검출됨을 알 수 있다.

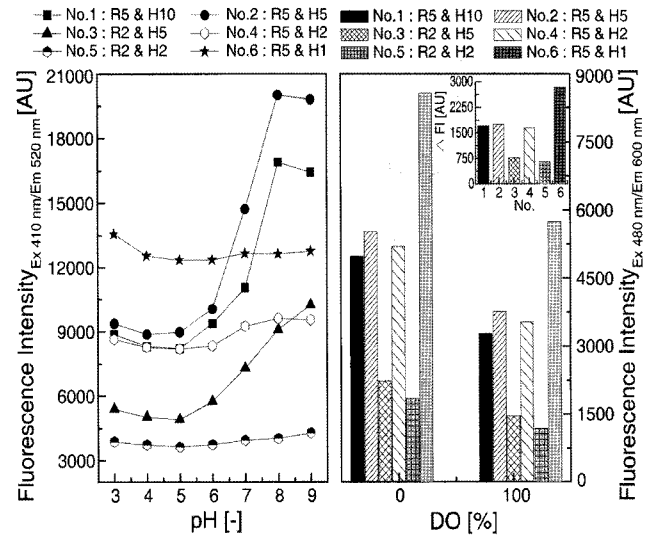


Fig. 4. Fluorescence intensity of simultaneous DO & pH sensing membrane with various composition of Rudpp and HPTS at different DO and pH values. R5 & H10 in the figure means the mixture of 5 mg/mL Rudpp and 10 mM HPTS in the simultaneous DO & pH sensing membrane.

5 mM HPTS와 5 mg/mL Rudpp의 조건으로 제조한 DO와 pH 동시 검출용 센서 막을 이용하여 pH와 DO를 측정할 때 온도에 따른 형광 세기 변화에 대해 연구하였다(데이터 표시하지 않음). pH 검출에서는 온도가 증가함에 따라 HPTS의 형광세기가 증가함을 알 수 있었다. 따라서 용액중 pH값을 정확히 측정하기 위해서는 온도에 따른 형광세기 변화를 고려하여 pH와 형광세기의 상관 관계를 구해야 할 것이다. 용존산소 검출에서는 용존산소 농도가 낮은 경우에는 온도에 따른 형광 세기의 변화가 거의 없으나 용존산소 농도가 높은 경우에는 센서 막이 온도에 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 온도에 따라 시료 내에 산소 용해도가 변하여 Rudpp의 형광감쇠 상수 (Fluorescence quenching constants)에 영향을 주기 때문이다.

그리고 DO와 pH 동시 검출용 형광센서 막에 대한 나트륨 이온세기의 영향은 혼합 형광 용액에서처럼 pH 측정 시 이온 세기가 높아짐에 따라 pKa' 값이 낮은 쪽으로 이동하고 형광 세기의 편차는 감소한다(데이터 표시하지 않음). 따라서 정확한 pH 값의 측정을 위해 이온농도에

따른 형광 세기의 상관관계를 고려할 필요가 있다.

미생물 배양공정의 용존산소와 pH의 동시 모니터링

졸-겔 용액에 혼합된 형광 염료들을 24-웰 마이크로플레이트의 웰 바닥에 고정하여 만들어진 광학 센서 막의 구조를 Fig. 5에 나타냈다. 각 웰 에 2 mg/mL Rudpp와 5 mM HPTS가 고정화 된 센서 막을 가진 24-웰 다중 소형생물 반응기를 이용하여 세 종류의 미생물, *E.coli* DH5a, *B.cereus* 318, *P.pastoris* X-33을 배양하였고 배양 중 용액의 pH와 용존산소농도의 변화를 실시간으로 동시에 모니터링 하였다.

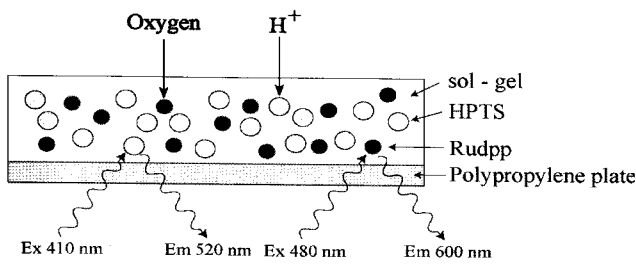


Fig. 5. Schematic diagram of the DO & pH sensing membrane on the well in a 24-well microtiter plate.

Fig. 6-8에는 세 종류의 미생물 발효 과정중 용존산소 농도와 pH의 변화에 따른 형광세기 변화를 각각 나타냈다. 용존산소농도 모니터링을 위한 Rudpp의 형광세기 변화는 *E.coli* DH5a, *B.cereus* 318, *P.pastoris* X-33의 모든 균주가 일정시간의 정체기를 거치다 균주가 성장하는 지수 성장기에서 많은 산소를 소모하기 때문에 급격하게 형광 세기가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 지수성장기 이후 사멸기에는 산소 소모량이 감소하여 용존산소농도가 높기 때문에 형광세기가 감소한 후 일정하게 유지되었다.

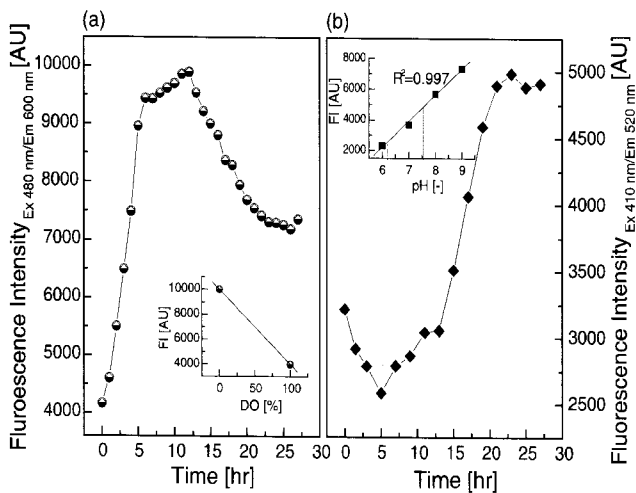


Fig. 6. Simultaneous fluorescence monitoring of (a) DO and (b) pH values during the cultivation of *E.coli* DH5a.

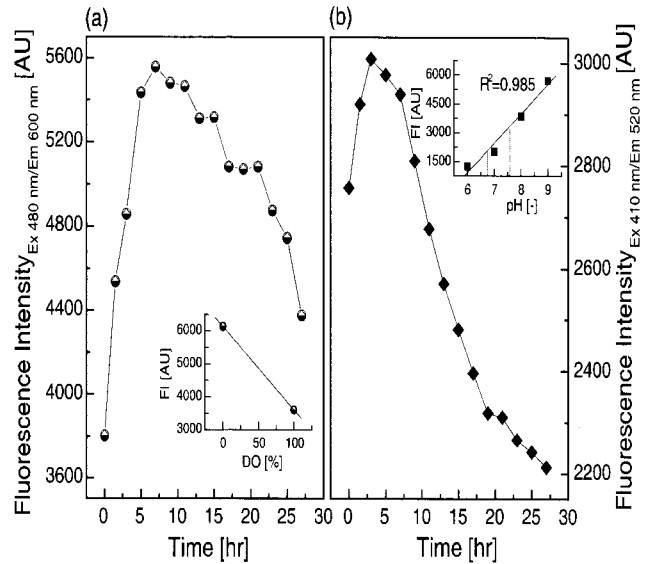


Fig. 7. Simultaneous fluorescence monitoring of (a) DO and (b) pH values during the cultivation of *B.cereus* 318.

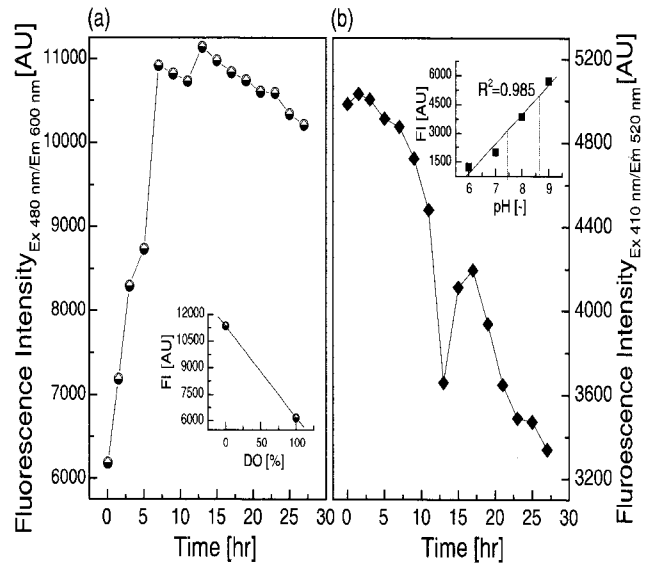


Fig. 8. Simultaneous fluorescence monitoring of (a) DO and (b) pH values during the cultivation of *P.pastoris* X-33.

한편, 용액의 pH에 대한 형광세기는 각 미생물의 성장과 호흡으로 인한 이산화탄소의 생성, 각종 유기산등의 합성 및 아미노산등의 분해등에 의해 변화한다. 발효초기 형광세기는 용액 내의 pH 변화에 의해 증가 또는 감소하다가 다시 감소 또는 증가하는 경향을 보인다. 이와같이 형광세기의 변화는 각각의 미생물 및 배양액에 따라 다르게 나타났으며 미생물의 성장 및 생산특성으로 보인다.

각 형광과장에서 모니터링된 형광세기를 용존산소 농도와 pH값으로 전환하기 위해 보정곡선을 이용하는데, 용존산소 농도는 0%와 100%를 이용한 보정곡선을 이용하였고, pH는 pH 6 - pH 9용액을 이용하였다. 측정된

형광세기와 표준 pH 용액과의 상관관계는 37°C (*E.coli* DH5a)에서는 R²값이 0.997이며, 30°C (*B.cereus* 318, *P.pastoris* X-33)에서는 R² 값이 0.985로 좋은 상관관계를 갖는다.

따라서, 본 연구에서 개발한 용존산소와 pH의 동시 검출용 센서 막은 미생물 배양 공정의 온라인 모니터링에도 잘 응용될 수 있다.

결론

본 연구에서는 형광염료인 HPTS와 Rudpp를 이용하여 pH와 용존산소농도를 동시에 검출할 수 있는 혼합 형광 조성물의 특성을 조사하였다. 또한, 혼합 형광 조성물을 졸-겔 용액에 혼합, 고정화시켜 pH와 용존산소농도를 동시에 검출할 수 있는 센서 막을 제조하였는데, 5 mM HPTS와 2 mg/mL Rudpp 또는 5 mg/mL Rudpp이 혼합 되었을 때 pH와 DO를 동시에 검출할 수 있었다. 또한, 용존산소와 pH의 동시 검출용 센서 막에 대한 온도와 이온 강도에 대한 영향성을 조사하였으며 pH와 용존산소농도를 정확히 검출하기 위해서는 이러한 외란에 대한 영향성을 고려해야 한다. 용존산소와 pH의 동시 검출용 광학 센서 막을 24 웰 마이크로 플레이트의 웰 바닥면에 고정화시켜 용존산소와 pH를 모니터링 할 수 있는 다중 소형 생물반응기를 제작하였다. 제작된 소형 생물반응기를 이용하여 *E.coli*, *B.cereus* 및 *P.pastoris* 등 미생물 배양 과정 중에 변화하는 용존산소와 pH를 실시간 모니터링 하였으며 상용 전기화학 센서에 의해 상관시켰을 때 기존 생물반응기에서의 모니터링 결과와 매우 유사한 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서 개발된 광학 센서 막은 pH와 용존산소농도를 동시에 검출할 수 있으며 미생물 발효 공정을 실시간 모니터링하는데 사용할 수 있다.

감사

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

접수 : 2008년 9월 17일, 게재승인 : 2009년 1월 7일

REFERENCES

- Kocincova, A. S., S. M. Borisov, C. Krause, and O. S. Wolfbeis (2007), Fiber-optic microsensors for simultaneous sensing of oxygen and pH, and of oxygen and temperature, *Anal. Chem.* **79**, 8486-8493.
- Vasylevska, G. S., S. M. Borisov, C. Krause, and O. S. Wolfbeis (2006), Indicator-loaded permeation-selective microbeads for use in fiber optic simultaneous sensing of pH and dissolved oxygen, *Chem. Mater.* **18**, 4609-4616.
- Harms, P., Y. Kostov, J. A. French, M. Soliman, A. Anjanappa, A. Ram, and G. Rao (2006), Design and performance of a 24-station high throughput microbioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 6-13.
- Borisov, S. M., C. Krause, S. Arain, and O. S. Wolfbeis (2006), Composite materials for simultaneous and contactless luminescent sensing and imaging of oxygen and carbon dioxide, *Adv. Mater.* **18**, 1511-1516.
- Zelevelow, B., G. Khalil, G. Phelan, B. Carlson, M. Gouterman, J. B. Callis, and L. R. Dalton (2003), Dual luminophor pressure sensitive paint II. Life time based measurement of pressure and temperature, *Sens. Actuators B* **96**, 304-314.
- Borisov, S. M., G. S. Vasylevska, C. Krause, and O. S. Wolfbeis (2006), Composite luminescent material for dual sensing of oxygen and temperature, *Adv. Funct. Mater.* **16**, 1536-1542.
- Koese M. E., B. F. Carrol, and K. S. Schanze (2005), Preparation and spectroscopic properties of multiluminophore luminescent oxygen and temperature sensor films, *Langmuir* **21**, 9121-9129.
- Cunha-Vaz J. G. (1997), Optical sensors for clinical ocular fluorometry, *Progress in Retinal and Eye Research* **16**, 243-270.
- Lee, B. S., H. Y. Heo, D. H. Cho, S. Kim, and H. S. Cho (2005), Fabrication and characterization of plastic fiber optic temperature sensor using TSCM, *J. of the Kor. Sens. Soci.* **14**, 180-185.
- Kim, C.-K., O.-J. Sohn, and J. I. Rhee (2007), Simultaneous measurement of dissolved oxygen concentration and pH by a fiber-optic sensor, Proc. Korean Sensors Conference 2007, 18, pp77-79.
- Hwang, Y. M., D. H. Cho, B. S. Lee, H. S. Cho, and S. Kim (2005), Fabrication and characterization of plastic fiber-optic radiation sensor tips using inorganic scintillator material, *J. of the Kor. Sens. Soci.* **14**, 244-249.
- Kim, C.-K., O.-J. Sohn, S.-Y. Kim, J. H. Choi, B. R. Kim, and J. I. Rhee (2008), Simultaneous measurement of pH and dissolved oxygen concentration by optical sensing membrane, Proc. the 10th Korean MEMS Conference 2008, pp261-262.
- Shi, Y., C. J. Seliskar, and W. R. Heineman (1998), Dual-analyte spectroscopic sensing in sol-gel derived polyelectrolyte-silica composite thin films, *Talanta*, **47**, 1071-1076.
- Jorge, P. A. S., C. Maule, A. J. Silva, R. Benrashid,

- Kocincova, A. S., S. M. Borisov, C. Krause, and O. S. Wolfbeis (2007), Fiber-optic microsensors for simultaneous sensing of oxygen and pH, and of oxygen

- J. L. Santos, and F. Farahi (2008), Dual sensing of oxygen and temperature using quantum dots and a ruthenium complex, *Anal. Chim. Acta*, **606**, 223-229.
15. Arain, S., G. T. John, C. Krause, J. Gerlach, O. S. Wolfbeis, and I. Klimant (2006), Characterization of microtiterplates with integrated optical sensors for oxygen and pH, and their applications to enzyme activity screening, respirometry, and toxicological assays, *Sens. Actuators B*. **113**, 639-648.
16. Kim, C.-K., O.-J. Sohn, and J. I. Rhee (2008), Simultaneous monitoring of DO and pH in cultivation process based on 24-well microtiter plate, Proc. Korean Biotechnology and Bioengineering Conference 2008, pp261-262.
17. Chung, S.-Y., K.-H. Seo, and J. I. Rhee (2005), Influence of culture conditions on the production of extra-cellular 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli*, *Proc. Biochem.* **40**, 385-394.