

Characterization of carbon dioxide sensitive fluorescence dye immobilized on the sol-gel

Ok-Jae Sohn^{1,3,4}, Tuan Hung Lam^{3,4} and Jong Il Rhee^{2,3,4}

¹Department of Material and Biochemical Engineering, ²Faculty of Applied Chemical Engineering,

³BioProcess Technology lab., ⁴Center for BioPhotonics,

Chonnam National University,

Yong-Bong dong 300, 500-757 GwangJu, Republic of Korea

Tel: 82-062-530-0847, Fax: 82-062-530-0846

Abstract

In this study optical sensing membrane was developed for the queantification of dissolved carbon dioxide in micro-bioreactor using an immobilized 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS). For the immobilization of HPTS sol-gel was synthesied by using 3-glycidoxypropyl-dimethoxymethylsiline and tetraethyl orthosilicate.

서 론

생물공정에서 용존 이산화탄소는 미생물 성장과 밀접한 관계를 지니고 있다. 따라서 용존산소, pH 뿐만 아니라 최근 배양기내의 용존 이산화탄소를 모니터링 하기 위한 기술 개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히 광학 검출기술을 이용하여 광섬유 이산화탄소 센서, pH 그리고 용존산소 센서의 개발이 많이 이루어지고 있다. 광학기술을 이용한 분석 및 온라인 모니터링 기술은 기존의 전기화학적 방법을 이용한 시스템보다 구성이 간단하고 전자기적 잡음을 일으키지 않으며, 특히 소형으로 제작이 용이하다. 최근에는 용존산소, pH 그리고 이산화탄소를 감응할 수 있는 형광염료를 고정화시킨 졸-겔 기술이 연구되어지고 있다. 졸-겔 기술은 다른 고정화기술에 비하여 간단하고 결합력이 강하며 다른 환경 인자에 대한 저항성이 크다는 장점을 가지고 있다. 또한 투명한 결정을 이루기 때문에 광학 검출 시스템으로의 적용성이 뛰어나다.

본 연구에서는 광학 온라인 모니터링을 이용한 마이크로 어레이 생물공정 시스템 개발을 위해 배양액 내에 존재하는 용존 이산화탄소 검출용 형광염료의 고정화 기술을 개발하였고, 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구에서는 이산화탄소 검출용 형광염료로 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS; pyranine, Molecular Probes, Netherland)를 사용하였다. 그리고 형광염료를 96well-microplate 또는 glass에 고정화하기 위해 3-glycidoxypropyl-dimethoxymethylsilane, Methyltrimethoxysilane, 3-Amino-propyl-trimethoxysilane 그리고 Tetraethyl orthosilicate(Sigma)를 사용하였다.

HPTS의 고정화

3-Glycidoxypropyl-dimethoxymethylsilane과 tetraethyl orthosilicate용액을 ethanol(95%)에 30% (v/v)이 되도록 용해한 후 HCl 첨가하여 sol-gel을 형성시켰다. 그리고 얻어진 sol-gel용액에 HPTS(1 mM)를 첨가한 후 96 well-microplate와 glass에 도포하여 HPTS 필름을 형성시켰다.

분석 방법

그림 1에서 보이는 바와 같이 각각 다른 pH의 완충용액을 이용하여 여러 농도의 이산화탄소 용액을 사용하였다. HPTS는 이산화탄소의 농도에 반비례하여 Ex 460 nm/ Em 510 nm에서 형광특성을 나타낸다(Fig 2). 따라서 HPTS의 형광 세기를 측정하기 위해 F4500 (Hitachi, Japan)과 Wallac 1420 VICTOR2 (Wallac, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

광학 온라인 모니터링을 위한 마이크로 어레이 생물공정 시스템 개발을 위해 배양액 내에 존재하는 용존 이산화탄소 검출용 형광염료인 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt를 sol-gel에 고정화하는 기술을 개발하였다. 또한 각종 sol-gel을 이용하여 HPTS가 최적의 형광특성을 나타낼 수 있는 조건을 조사하였으며, 그 결과 3-glycidoxypropyl-dimethoxymethylsilane과 tetraethyl orthosilicate를 1:1로 혼합한 sol-gel이 가장 우수한 성능을 보였다. 그리고 sol-gel 합성에 있어서 촉매로는 NaOH 보다 HCl이 sol-gel 합성에 뛰어난 효과를 나타내었다. 그리고 glass와 microplate에 고정화 된 HPTS의 저장 안정성을 조사하기 위해 20일 동안 pH 표준완충용액을 사용하여 매일 5회 반복 측정하였다. 또한 조작 안정성을 살펴보기 위해 24시간 동안 연

속 측정하였다.

요약 및 전망

본 연구에서는 sol-gel을 이용한 이산화탄소 감응 특성을 지닌 HPTS의 고정화 기술을 개발하였으며, 고정화 HPTS에 미치는 각종 영향인자에 대한 특성을 조사하였다. 향후 본 실험을 통해 연구된 고정화 HPTS를 마이크로 생물반응기로 도입하여 생물반응기 내의 용존이산화 탄소를 모니터링 하고자 한다.

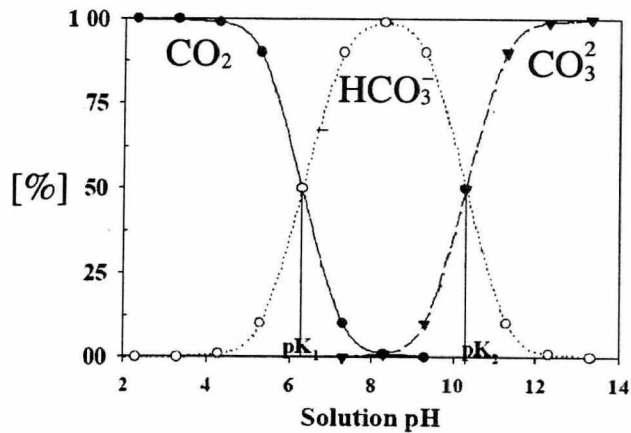


Figure 1. Dependence of carbon dioxide concentration on pH.

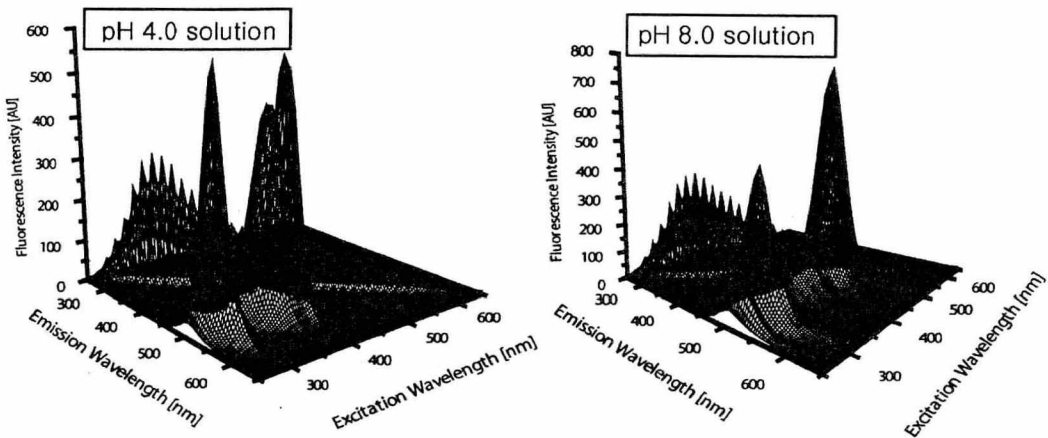


Figure 2. Fluorescence 3D-spectrum of HPTS in pH buffer solutions.

감 사

본 연구는 과학기술부/광주광역시 2004년 지자체 주도 연구개발사업의 바이오광기반기술개발 사업 연구과제(과제번호 BPF-2004-S-1-6)에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

1. X. Ge, Y. Kostov, G. Rao, "High-stability non-invasive autoclavable naked optical CO₂ sensor", (2003), *Biosensors and Bioelectronics*, **18**:857-865.
2. J. M. Lee, M. Li, S. H. Lee, Y. S. Kim, C. J. Kim and B. H. Lee, "A pH Optosensor Based on Fluorescence from Nile Blue Encapsulated within Silica Sol-Gel Film", (2004), *J. of Korean Sensors Society*, **13**(3):169-174.