마이크로 레이저 형광 여기법을 이용한 미세채널 내부에서의 산소 확산에 대한 정량적 가시화

천취안* · 김현동* · 김경천†

Quantitative Visualization of Oxygen Transfer in Micro-channel using Micro-LIF Technique

Juan Chen, Hyun Dong Kim and Kyung Chun Kim

Abstract. In the present study, oxygen transfer process across gas-liquid interface in a Y-shape micro-channel is quantitatively visualized using the micro laser induced fluorescence (μ -LIF) technique. Diffusion coefficient of Oxygen (D_L) is estimated based on the experimental results and compared to its theoretical value. Tris ruthenium (II) chloride hexahydrate was used as the oxygen quenchable fluorescent dye. A light-emitting diode (LED) with wavelength of 450 nm was used as the light source and phosphorescence images of fluorescent dye were captured by a CMOS high speed camera installed on the microscope system. Water having dissolved oxygen (DO) value of 0% and pure oxygen gas were injected into the Y-shaped microchannel by using a double loading syringe pump. In-situ pixel-by-pixel calibration was carried out to obtain Stern-Volmer plots over whole flow field. Instantaneous DO concentration fields were successfully mapped according to Stern-Volmer plots and D_L was calculated as $2.0675 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

Key Words: μ -LIF(마이크로 레이저 형광 여기법), Microchannel(미세채널), Dissolved Oxygen Concentration Field(용존 산소 농도장), Diffusion Coefficient(확산계수)

1. 서 론

수처리, 생화학 생산 공정, 생물학 공정, 식품 산업 공정 등의 여러 가지 호기성 산업 공정(aerobic industrial processes)에서 용존 산소는 가장 기본적인 기질들(substrates) 중 하나이며, 이러한 공정 전반에 걸쳐 지속적이고 충분한 용존 산소의 공급은 수율과 생산성을 향상시키기 위한 필수적인 요소이다. 그러나 액체 속에서 산소의 낮은 용해성 때문에 일반적인 생물반응기(bioreactor)에는 내부에 교반기와 기포발생장치(sparger) 등을 설치하여 산소 전달률(oxygen transfer rate)을 증가시키고 용존 산소 농도를 일정한 수준으로 유지하기 위한 측정 및 제어 기법에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다⁽¹⁾.

용존 산소 측정 방법으로는 용존 산소에 의한 산화환원반응을 통해 생성되는 전류를 측정하는 polarographic 형태나 galvanic 형태의 전기 화학적 용존산소 센서를 이용하는 것이 가장 일반적이며, 최근에는 용존 산소에 의한 형광 강도 감쇄 원리를 이용한 광학 센서를 이용하는 방법이 있다. 특히 최근에 많이 연구되고 있는 마이크로 생물반응기와 같이 미세 유체 시스템에서 용존 산소 농도를 측정하기 위해 이와 같은 측정 방법들을 마이크로 스케일에 적합하도록 수정한 ultra-microelectrode array(UMEA), optode 센서 등의 기술이 소개되고 있다^(2, 3).

그러나 용존산소 센서들을 이용한 측정방법의 경우 용존산소 농도가 낮은 범위에서는 측정의 정확성이 떨어지며, 점 측정 방식이라는 한계 때문에 국부적인 용존산소 농도장이나 확산 계수 등을 측정하는 데는 적합하지 않다. 이러한 측정방법의 한계를 극복하기 위해 레이저 형광 여기법과 산소 지표 형광물질을 이용한 용존산소 농도장 측정 결과들이 발표되고 있다.

†부산대학교 기계공학부
E-mail : kckim@pusan.ac.kr

*부산대학교 일반대학원 기계공학과

Philip의 그룹은 LIF 기술을 이용하여 공기와 물의 wavy 경계면에서 산소 농도 분포를 측정하였으며, Dani와 Francois의 연구그룹은 대표적 산소 지표 물질인 ruthenium을 이용하여 유체 속에서 정지된 단일 기포와 상승하는 단일 기포 주변에서의 산소 전달 현상을 측정하였다^(4,5).

마이크로 스케일에서의 용존 산소 농도 측정 방법으로는 크게 PEBBLE(Photonic Explorer for Biomedical use with Biologically Localized Embedding) 센서를 이용한 방법과 필름 센서를 이용한 방법이 있다. Koo et. al.은 ruthenium 형광 염료를 실리카 나노 입자 속에 혼합시킨 PEBBLE 센서를 제작하여 C6 신경교종 세포 주변에서 산소 변화를 측정하였으며⁽⁶⁾, Song et. al.과 Matsuda et. al은 용존 산소 필름 센서와 고속 카메라를 이용하여 미세채널 벽면에서 용존 산소 농도가 서로 다른 액상 유체 사이에서의 용존 산소 농도 분포 변화를 측정하였다^(7,8).

그러나 마이크로 스케일에서 액상과 기상 유체의 경계면에서 물질 전달 현상을 측정하기 위한 연구는 시도되지 않았으며, 여러 가지 마이크로 바이오 반응기에서 산소 공급을 위해 기상의 산소와 액상의 유체 사이의 물질 전달을 이용하고 있다는 점을 고려하면, 액상과 기상의 경계면에서 물질 전달 특성을 규명하는 것은 필수적이라고 할 수 있다. 또한, 마이크로 스케일에서 시간에 따른 액상과 기상 사이의 용존 산소 농도 변화를 측정할 수 있다면 국부적인 물질 전달 계수는 물론 마이크로시스템의 특성에 따른 시스템 전체에서의 물질 전달 계수를 근사할 수 있으며, 이러한 결과들은 마이크로시스템을 설계하고 평가하는 데 중요한 정보로 활용될 수 있다.

본 연구에서는 μ -LIF 기법을 이용하여 Y형 미세채널 내부에서 산소 가스와 0%의 용존 산소 농도를 가지는 물이 형성하는 경계면에서의 산소 전달 현상을 정량적으로 가시화하였다. 또한, 시간에 따른 산소 농도 분포 측정 결과를 Fick's law에 기초한 이론값과 비교하였으며, 이 결과들을 바탕으로 산소의 확산 계수를 근사하여 기존 연구 결과와 비교하였다.

2. 실험장치구성

Fig. 1은 μ -LIF 기법을 이용하여 Y형 미세채널 내부에서의 용존 산소 농도장을 측정하기 위한 실험 장치

Fig. 1. Experimental setup for measuring DO concentration field in Y-shaped microchannel using μ -LIF.

구성을 나타내고 있다. 일반적인 μ -LIF 기법 적용을 위해 독립형 형광현미경(Olympus, BX51)을 사용하였으며, 450 nm 파장의 빛을 방출하는 LED(Titan, TI-UV-ZOOM)를 이용하여 미세 채널 내부로 조사하였다. LED에 의해 여기(excited)된 후 방출되는 형광 이미지를 획득하기 위해 20배 배율의 대물렌즈(Olympus, LUCPlan FL N, N/A=0.45)와 CMOS 고속 카메라(PCO, 1200hs, 1024x1280, 10bit)를 사용하였다. 실험에서 산소 농도 지표 물질로 사용된 Tris(2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) Chloride Hexahydrate (Sigma Aldrich)의 최대 형광 파장이 607 nm인 것을 고려하여 대물렌즈와 카메라 사이에 590 nm의 고역통과 필터를 설치하여 이미지 잡음을 최소화하였다. 실험에 적용된 Y형 미세채널의 폭은 400 μ m이고 높이는 75 μ m이며, 채널의 표면으로부터의 산소 투과를 방지하기 위해 유리를 이용하여 리소그래피와 식각공정을 통해 제작되었다.

3. 용존산소 농도와 형광 강도 보정

용존산소 농도와 형광 강도 사이의 관계는 일반적으로 아래와 같은 Stern-Volmer 방정식으로 표현된다.

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[O_2] \quad (1)$$

여기서 I_0 는 용존 산소가 존재하지 않을 때의 형광 강도이며, K_{SV} 는 Stern-Volmer 상수, $[O_2]$ 는 용존 산소 농도이다.

본 연구에서는 이와 같은 Stern-Volmer 방정식을 구하기 위하여 in-situ 보정 실험을 수행하였다. 증류수

200 ml에 25 mg/ml의 농도로 ruthenium을 용해한 수용액을 준비한 후, 용존산소 측정기의 센서(YSI 550A, 오차 범위 $\pm 2\%$)를 수용액 내부에 고정하고 자석 교반기를 작동시키면서 지속적으로 용존 산소 농도의 변화를 측정하였다. 증류수 내부의 용존 산소 농도를 조절하기 위한 시약으로는 Na_2SO_4 (Sigma Aldrich, sodium sulfite)를 사용하였다. 이때 온도 변화에 의한 형광 강도 변화를 최소화하기 위해 증류수가 담긴 플라스크 주위에 항온조를 설치하여, 수용액 온도를 $18^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 수준으로 제어하였다.

이와 같은 과정을 거쳐 준비된 시료들은 유리 주사기(Hamilton, 1 ml)와 주사기 펌프(KDS Scientific, KDS270)를 통해 미세 채널로 주입되었으며, 미세 채널에 시료가 완전히 주입된 후 주사기 펌프를 정지시키고 채널 내부의 유동이 정지된 상태에서 초당 10장의 이미지 획득 속도로 10초간 100장의 이미지를 획득하였다. 획득된 농도별 100장의 이미지는 Yoon and kim 이 미세 채널 내부에서의 혼합현상에 의한 농도 분포를 구하기 위해 이용한 pixel by pixel 보정 기법을 적용하여 조사 광원의 불균일성에 의한 보정 오차를 최소화하였으며, 이때 $\mu\text{-LIF}$ 측정의 공간 해상도는 $0.625 \mu\text{m}$ 수준이었다⁽⁹⁾.

Fig. 2는 pixel by pixel calibration을 사용하여 얻어진 (500, 200) 번째 화소에서의 Stern-Volmer 플롯의 실험값과 그 값을 선형 보간한 결과를 보여주고 있다. 선형 보간한 결과 K_{SV} 는 0.466이었으며, LED 광원의 시간에 따른 불균일성과 용존 산소 농도 센서의 오차 때문에 보간 결과와 측정값에 차이가 발생하기는 하지만

Fig. 2. Stern-Volmer plot at (500, 200) pixel.

Fig. 3. Image of instantaneous intensity distribution and coordinate system.

선형적인 관계가 성립하는 것을 확인할 수 있다.

보정 실험이 완료된 후 기상과 액상의 경계면에서 산소 전달 현상을 가시화하기 위해 Y형 미세 채널의 한쪽 주입구로는 순수 산소 가스를 다른 쪽 주입구로는 0%의 용존 산소 농도를 가지는 물과 ruthenium의 수용액을 1 mL/min의 유량으로 주입하다가 정지시킨 후, 보정 실험에서와 같은 촬영 속도인 10 fps(frame per second)로 10초 동안 100장의 이미지를 획득하였다. 획득된 이미지와 보정 함수를 이용하여 최종적으로 유동 공간 단면에서의 용존 산소 농도장을 정량적으로 가시화하였다.

4. 실험 결과 및 토의

Fig. 3은 이미지 획득을 시작하고 나서부터 0.1초 지난 순간의 미세채널 내부에서의 순간 형광 강도 분포를 나타낸 이미지와 함께 해석을 위해 이미지 위에 설정된 가상의 좌표계를 보여 주고 있다. Y형 미세채널 내부에서 순수 산소 가스와 ruthenium과 물이 혼합된 수용액이 만나는 부분에서 경계면이 형성되는 것을 볼 수 있으며, 경계면을 중심으로 아래쪽 영역에 산소에 의한 형광 감쇄 효과로 형광 강도가 낮아져 상대적으로 어둡게 나타나는 부분이 존재하는 것을 확인할 수 있다. 한편 경계면에서 산소에 의한 형광 약화 (fluorescence quenching) 원리에 부합되지 않는 상대적으로 형광 강도가 높게 나타나는 부분이 있는데, 이 부분은 액상과 기

Fig. 4. Time series of dissolved oxygen concentration field based on the fluorescent intensity distribution.

상의 경계면에서 물의 표면장력에 의해 구면 형태의 경계면을 형성하기 때문에 형광이 중첩되어 형광 강도가 높게 나타난 것으로 생각하며, 이 영역의 데이터는 차후 정량적인 해석 과정에서 무시하였다.

해석을 위해 설정된 좌표축의 원점은 경계면이 시작되는 부분으로 y 축 방향으로 용존 산소 농도 변화가 커서 1차원적인 확산 현상을 해석하기에 쉬운 지점으로, CMOS 이미지 센서에서(425, 260)에 위치하는 화소이다. Fig. 4는 형광 강도 분포와 각 화소의 보정함수에 기초하여 구해진 용존 산소 농도장의 시간 변화를 나타낸 그림으로 시간에 따라 경계면을 통해 용해된 산소가 물속에서 확산하는 과정을 보여 주고 있다. 산소와 물의 경계면에서 산소 전달현상을 정확하게 측정하기 위해서는 미세채널 내부에서 만나는 시점부터 시작해서 시간에 따른 형광 이미지를 획득해야 하지만 실제 실험에서는 미세채널 내부에서 유동이 멈추는 순간까지 기다렸다가 그 시점부터 이미지를 저장하기 때문에 시작 시점은 경계면을 통해 어느 정도의 물질전달 과정이 진행된 이후가 된다. 따라서 본 연구에서는 경계면을 통해 물질전달이 시작되고 난 후 임의의 순간을 시작 시점으로 하여 그 후 10초 동안의 용존 산소 농도 변화를 측정하여 산소 전달률과 확산 계수를 계산하였다.

Fig. 5는 Fig. 3에서 보이는 것과 같이 y 축 위의 선분 A-B를 따라서 추출한 형광 강도를 플롯한 그래프이다. $-150\ \mu\text{m}$ 와 $-50\sim 0\ \mu\text{m}$ 사이에서 형광 강도가 높은 부분들은 채널 벽면과 바닥면에 부착된 염료에서 발생한 형광 때문으로 생각된다. 원점에서 $40\ \mu\text{m}$ 까지의 구간은 앞서 언급한 형광중첩에 의한 이미지 잡음이며 확산이 진행되고 있는 부분은 $40\sim 110\ \mu\text{m}$ 구간이다.

Fig. 5. Fluorescent intensity distribution along the A-B line of Fig. 3.

Fig. 6은 Fig. 5에서 추출된 형광 강도를 바탕으로 좌표축 원점에서 미세 채널 벽면까지 $0\sim 225\ \mu\text{m}$ 구간에 대한 용존 산소 농도를 계산한 그래프이다. $120\ \mu\text{m}$ 지점부터 y 축의 음의 방향으로 원점인 경계면에 가까이 갈수록 용존 산소 농도가 증가하며, 원점에서부터 $30\ \mu\text{m}$ 까지는 경계면에서의 형광중첩에 기인한 오차 구간이다. 산소 농도가 증가하는 $30\sim 120\ \mu\text{m}$ 구간을 선형적으로 보간한 결과 경계면에서의 포화 용존 산소 농도(saturated dissolved oxygen concentration) C_S 는 484.4% 였고, $120\ \mu\text{m}$ 이후의 구간에서 체적 농도(bulk concentration) C_L 은 16.2% 였다. 경계면 농도 C_S 와 체적 농도 C_L 은 다음 장에 설명할 Fick's law를 이용한 이론적 확산 방정식을 계산할 때 필수적인 경계조건 값으로 이용되었다.

Fig. 6. Dissolved oxygen concentration calculated from intensity distribution in Fig. 5.

5. 확산 계수의 이론적 계산

일반적으로 Fick's law에 따른 1차원 확산 방정식은 아래와 같이 표현된다.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \quad (2)$$

여기서 C 는 농도, D_L 은 확산계수 이다. 아래와 같은 경계조건을 적용하면 1차원 확산 방정식을 계산 할 수 있다.

$$\begin{cases} t=0: c=c_L \\ t>0: y=0, c=c_s \\ y=\infty, c=c_L \end{cases} \quad (3)$$

여기서 t 는 경계면에서 두 유체가 만나 확산이 시작 될 때부터 경과된 시간이고, y 는 원점인 경계면에서부터의 거리이며 방정식 (2)에 경계 조건 식 (3)을 대입 하여 전개하면 식 (4)를 얻는다.

$$\frac{c-c_L}{c_s-c_L} = \operatorname{erfc} \frac{y}{2\sqrt{D_L t}} = 1 - \operatorname{erf} \frac{y}{2\sqrt{D_L t}} \quad (4)$$

식 (4)에서

$$X = \frac{y}{2\sqrt{D_L t}} \quad (5)$$

라고 가정하면

$$D_L \cdot t = \frac{y^2}{4X^2} \quad (6)$$

이 되고, 시간 t 를 경계면에서 확산이 시작되고 난 후 이미지 저장이 시작되기 전까지의 시간 t_0 와 이미지 저장에 시작되고 난 후의 경과시간 t' 의 합으로 식 (7)과 같이 나타내면,

$$t = t' + t_0 \quad (7)$$

동일한 위치 y 에서 서로 다른 시간에 대한 확산 계수는 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$\begin{cases} D_L(t'_1 + t_0) = \frac{y^2}{4X_1^2} \\ D_L(t'_2 + t_0) = \frac{y^2}{4X_2^2} \end{cases} \quad (8)$$

식 (8)을 연립하여 풀면, t_0 와 확산 계수 D_L 은 다음과 같이 표현된다.

$$\begin{aligned} t_0 &= \frac{t'_2 \cdot X_2^2 - t'_1 \cdot X_1^2}{X_1^2 - X_2^2} \\ D_L &= \frac{\left(\frac{y}{2X_2}\right)^2 - \left(\frac{y}{2X_1}\right)^2}{t'_2 - t'_1} \end{aligned} \quad (9)$$

식 (4)와 (5)로부터 X 값을 구하면 아래와 같이 표현 되고

$$\operatorname{erf} X = 1 - \frac{c-c_L}{c_s-c_L} \quad (10)$$

실험으로부터 측정된 C_s, C_L 을 대입하여 X 값을 구한 후 식 (9)에 대입하면, y 지점에서의 t_0 와 확산 계수 D_L 을 구할 수 있게 된다. 이러한 과정을 거쳐 y 축을 따라 470번째 화소에서부터 600번째 화소까지 131개의 화소에 대해 확산 계수를 근사하고 산술 평균한 결과 $t_0=1.13$ 초, 확산 계수는 $2.0675 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 로 계산되었으며, 이 값은 20°C 물에서의 확산 계수로 알려진 $1.97 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 유사하다.

Fig. 7은 시간 변화에 따른 y 축 방향으로 무차원화된 용존 산소 농도 분포 변화에 대해 실험 결과와 이론적 계산 결과를 비교한 그래프이다. 계산을 위해 선택된 시간은 $t_1=1.23$, $t_2=2.13$, $t_3=4.13$ 초였으며, $D_L=1.97 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 로 가정하고 식 (4)를 이용하여 계산한 결과와 비교하였다. 경계면에서 멀어질수록 산소 농도가 감소

Fig. 7. Change of normalized dissolved oxygen concentration along the y -axis at time $t_1=1.23$ s, $t_2=2.13$ s, $t_3=4.13$ s. Experimental results were compared with theoretical calculation.

하는 경향은 실험 결과와 이론적 계산 결과 모두 유사하게 나타나지만, t_1 과 t_2 의 경우 용존 산소 농도 구배에 있어서 다소 차이가 생기는 것을 볼 수 있다. 이러한 차이는 앞서 언급한 경계면에서의 이미지 잡음으로 경계면에 가까울수록 용존 산소 농도 분포에서 섭동이 크게 나타나며, 결과적으로 경계조건인 C_s 값이 정확하게 측정되지 않았기 때문에 발생하는 것으로 생각한다. 따라서 경계면 오차를 줄이기 위해서는 미세 채널의 높이를 최소화하여 경계면 잡음을 없애는 등의 추가적인 연구가 필요하다.

6. 결 론

대표적 산소 지표 물질인 ruthenium과 μ -LIF 기법을 이용하여 Y형 미세 채널 내부에서 산소 가스와 액상의 물 사이의 경계면에서 발생하는 산소 전달 현상을 정량적으로 가시화하는 데 성공하였다. 측정결과 시간이 경과함에 따라 경계면을 통해 산소가 전달되는 것을 관찰할 수 있었으며, 용존 산소 농도분포를 측정할 수 있었다.

용존 산소 농도분포의 측정결과를 바탕으로 Fick's law를 이용하여 물속에서의 산소 확산 계수를 계산한 결과 기존 알려진 값 $1.97 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 과 근사한 $2.0675 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 수준임을 확인하였다. 또한, 무차원화된 용존 산소 농도분포의 실험 결과와 이론적 계산 결과를 비교하여 유사한 분포를 나타내는 것을 확인하였으나 더욱 정확한 비교를 위해서는 추가 연구가 필요하다.

후 기

본 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원(No. 2010- 0000448)과 2012년도 지식경제부의 재원으로 한국에너지기술평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구 과제임(No.2010 2020100470-32-2-100, No.20112010100030-11-2-300).

참고문헌

- 1) Garcia-Ochoa, F. and Gomez, E., 2009, "Bioreactor

- Scale-up and Oxygen Transfer rate in Microbial Processes: An Overview", *Biotechnol. Adv.*, Vol. 27, pp. 153~176.
- 2) Schäpper, D., Alam, M. N. H. Z., Szita, N., Lantz, A. E. and Gernaey, K. V., 2009, "Application of Microbioreactors in Fermentation Process Development: A Review", *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 398, pp. 679~695.
- 3) Philip, T. W. and, Steve, R. D., 2001, "Laser-Induced Fluorescence Studies of Oxygen Transfer Across Unsheared Flat and Wavy Air-Water Interfaces", *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 40, pp. 1985-1995.
- 4) Dani, A., Guiraud, P. and Cockx, A., 2007, "Local Measurement of Oxygen Transfer Around a Single Bubble by Planar Laser Induced Fluorescence", *Chem. Eng. Sci.*, Vol. 62, pp. 7245~7252.
- 5) Francois, N., Dietrich, N., Guiraud, P., and Cockx, A., 2011, "Direct Measurement of Mass Transfer Around a Single Bubble by Micro -PLIFT", *Chem. Eng. Sci.*, Vol. 66 pp. 3328~3338.
- 6) Koo, Y. L., Cao, Y., Kopelman, R., Koo, S. M., Brasuel, M. and Philbert, M. A., 2004, "Real-time Measurements of Dissolved Oxygen Inside Live Cells by Ormosil (Organically Modified Silicate) Fluorescent PEBBLE Nano- sensors", *Anal. Chem.*, Vol. 76, pp. 2498~2505.
- 7) Song, D. H., Kim, H. D. and Kim, K. C., 2012, "Dissolved Oxygen Concentration Field Measurement in Micro-scale Water Flows using PtOEP/PS Film Sensor", *Opt. Lasers Eng.*, Vol. 50, pp. 74~81.
- 8) Matsuda, Y., Nagashima, F., Yamaguchi, H., Egami, Y. and Niimi, T., 2011, "Unsteady 2D Measurement of Dissolved Oxygen Distribution using Luminescent Sensor Film", *Sens. Act. B*, Vol. 160, pp. 1464~1467.
- 9) Yoon, S. Y. and Kim, K. C., 2006, "Signal Intensity Enhancement of μ -LIF by using Ultra Thin Laser Sheet Illumination and Aqueous Mixture with Ethanol/methanol for Micro-channel Applications", *Opt. Laser Eng.* Vol. 40(6), pp. 876~883.