

## 독성물질에 대한 *Photobacterium phosphoreum*의 bioluminescence 특성

이 흥 주 · 이 은 수 · <sup>1</sup>박 철 진 · <sup>2</sup>이 정 건 · †전 역 한  
경희대학교 생명자원과학부 식품가공학과, <sup>1</sup>국립환경연구원, <sup>2</sup>LG산전(주)연구소  
(접수 : 1998. 9. 18., 게재승인 : 1998. 11. 16.)

### The Character of Bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* with Toxic Substances

Hong-Joo Lee, Eun-Su Lee, Chul-Jin Park<sup>1</sup>, Jeong-Gun Lee<sup>2</sup>, and Uck-Han Chun†  
Department of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science, Kyung Hee University,  
Suwon, Kyungki 449-701, Korea

<sup>1</sup>National Institute of Environmental Research, Seoul 122-040, Korea  
<sup>2</sup>R&D Center, LG Industrial Systems Co., Ltd., Anyang, Kyungki 431-080, Korea  
(Received : 1998. 9. 18., Accepted : 1998. 11. 16.)

The relationship between bioluminescence of immobilized *Photobacterium phosphoreum* and toxic substances was investigated to monitor toxic substances in aqueous solution. The sodium alginate was used as an immobilization matrix. A bioluminescence intensity was maximum when OD<sub>660</sub> for cell concentrations were between 1.0 and 1.2 and the bioluminescence was stable at the pH range of between 6.0 and 8.0. The optimum concentration of alginate for immobilization was found to be 5.0%(w/v) in which dilution was carried out with 2.5%(w/v) NaCl solution that is an optimum environmental condition for the growth of *P. phosphoreum*. The bioluminescence intensity responded against the toxic substances was proportional to the concentration and a regression curve were established with linearity by using specific bioluminescence reduction rate and Gamma values. It was also found that the response was very rapid and sensitive. The response with such rapidity and sensitivity is a very important factor for the real time monitoring. The immobilized cells showed higher sensitive response to the toxic substances than free cells.

Key Words : *Photobacterium phosphoreum*, immobilization, bioluminescence, toxicity

### 서 론

화학 물질 중에는 세포에 들어가면 분해되지 않고 특정한 세포나 조직에 축적되는 성질을 갖는 것이 있다. 환경에 오염된 이러한 화학물질은 그 초기단계에서는 생체에 영향을 미치지 못할 정도로 극미량이지만 생태계에서의 먹이사슬에 의해 몇 단계의 생물체를 거치는 동안 계속 축적되고 농축되어 이런 것을 사람이 오랜 기간 섭취하면 인체 내에 축적되어 중독량에 이르게 된다(1). 따라서 극소량이라도 조기에 monitoring하여 적절한 조치가 취해져야 한다.

발광 현상을 이용한 독성물질의 분석과 검출법이 있으며 민감하면서도, 반응이 빠르고 분석 비용이 적게 들어갈 뿐만 아니라 독성이 없기 때문에 많은 주목을 받고 있다(2). 발광 미생물

(luminescent bacteria)은 크게 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Altenomonas*, *Xenorhabdus* 4가지로 분류되며 luciferase에 의한 반응 결과 bioluminescence를 발생하며(3) luminescent bacteria가 독성 물질에 노출될 경우 bioluminescence 발생 메카니즘에 영향을 받아 bioluminescence가 감소하게 된다. 이와 같은 반응은 짧은 시간 내에, 아주 미량의 독성 물질에도 민감하게 일어나며 이러한 반응성을 이용하여 독성 물질을 monitoring 할 수 있다(4)

독성 물질 monitoring에 luminescent bacteria를 이용하기 위한 여러 방법들이 보고되었다. 본 연구에서는 고정화 세포와 독성물질의 반응성에 관한 실험을 수행하였다. 발광 미생물을 고정화하여 이용한 예로는 *Vibrio fischeri*를 두 장의 반투과성 polypropylene 막 사이에 고정화하여 산소 sensor로써 이용하였고(5) *Beneckea harveyi*를 alginate gel에 고정화하여 세포내의 효소작용 하에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로부터 형성되는 산소의 양을 측정하므로써 hydrogen peroxide의 농도를 결정하였다는 보고가 있다(6), 또 *Photobacterium phosphoreum*을 이용하여 식품중의 mycotoxin을 분석한 경우 등이 있다(6). 식품 중의 mycotoxin 분석은 고정화 한 발광 미생물을 이용한 것 이외에도 동결 건조한

† Corresponding Author : Dept. of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea  
Tel : (0331)201-2626, FAX : (0331)204-8116  
e-mail : uhchun@nms.kyunghee.ac.kr.

*P. phosphoreum*의 이용도 연구되었다(7). 독성물질 검사를 위해 미생물을 고정화 할 때 matrix의 선택이 매우 중요하며, 예를 들면 불용성이어야 하고, 독성물질과 화학 반응을 일으키거나 분해되어서는 안되며, 분산성이 좋아야 한다. 그리고 특히 monitoring에 따른 비용이 저렴해야 하며 발광 미생물에 이용하기 위해서는 빛 투과성이 좋아야 한다(8). 일반적으로 고정화 matrix로서 calcium alginate(9), strontium alginate(4),  $\kappa$ -carrageenan(10), polyacrylamide(11), glass bead(12), cellulose, collagen, agar 같은 polymer가 사용되고 있지만 이 중 alginate를 많이 사용하는 이유는 고정화 과정이 비교적 간단하고 세포가 matrix 내에서도 생존하며, 인체에도 무해하고 gel의 조직이 안정할 뿐 아니라 가격이 비교적 저렴하기 때문이다(4, 13). 또한 luminescent bacteria의 bioluminescence 발생을 위한 metabolism을 해치지 않고 오히려 유지시켰으며 *Beneckea harveyi* 세포를 calcium alginate에 고정화하였을 때 높은 bioluminescence 투과성을 보였다(6). Alginate를 견고하게 하는 양이온으로서 일반적으로 많이 사용되는 것은  $Ca^{2+}$  이온이지만 *P. phosphoreum*은 해양성 박테리아로서 배지 중의 NaCl의 농도가 높는데 이런 경우  $Ca^{2+}$ 가  $Na^{2+}$ 로 대체되어 적합하지 않다. 따라서 고정화 물질로 strontium alginate의 이용이 제안되고 있다(4, 8).

본 연구에서는 우선 *P. phosphoreum*을 strontium alginate로 고정화하기 위한 최적 고정화 조건을 확립하였고 monitoring 가능한 독성물질의 농도 범위를 조사하였다. 또, free cell과 고정화 세포의 독성물질에 의한 bioluminescence 변화와 상관 관계를 조사하여 독성 물질 monitoring을 위한 linearity를 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양방법

본 실험에 이용된 bioluminescent bacteria는 *Photobacterium phosphoreum* KCTC2852로서 NaCl이 함유된 배지에서 배양하였다. NaCl이 함유된 배지의 조성은 nutrient broth No.2 (meat peptone 4.3g/L, casein peptone 4.3g/L, sodium chloride 6.4g/L) (Fluka, Switzerland) 12.5g/L, sodium chloride 25.0g/L, yeast nitrogen base (without ammo acid) (Sigma Co., U.S.A.) 5.0g/L, glycerol (Difco Co. Ltd., U.S.A.) 3.0mL/L이고 pH는 100mM potassium phosphate buffer를 이용하여 7.0으로 조절하였다 액체 배지에서 세포 농도를 O.D<sub>660</sub> 0.8~1.0에 도달할 때까지 배양하였으며 이를 접종균(10%v/v)으로 사용하여 15.0°C, 100rpm의 교반배양기(Vision Scientific Co., K.M.C.- 8480SF, Korea)에서 배양하였다. 세포 농도는 UV visible spectrophotometer (Shimadzu Co., UV-1201, Japan)를 이용하여 660nm에서 측정하였다.

### 세포 고정화

고정화 matrix로서 sodium alginate를 사용하였다. 접종한 후 12~14시간 동안 배양한 세포를 2.5%(w/v)의 식염수에  $10^4$  배로 희석한 후 세포 희석액과 5.0%(w/v)의 sodium alginate(Hayashi Co. Ltd., Japan)를 1:8의 비율로 섞어 고정화하였다. Sodium alginate는  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  그리고 K와 같은 양이온과 결합하여 견

고해지나 모든 실험에서는 양이온을 첨가하지 않고 sodium alginate와 cell 희석액만을 혼합하여 사용하였다

### Bioluminescence의 측정

Free cell인 경우 접종 후 12~14시간 지난 세포(*P. phosphoreum*)를 2.5%(w/v) 식염수에  $10^4$ 의 비율로 희석한 후 cuvette에 1.0mL를 취하여 bioluminescence 측정에 사용하였고 고정화 세포의 경우 세포와 alginate 혼합액을 1.0mL 취하여 luminometer (Berthold Lumat LB 9507, Germany)로 측정하였다. Bioluminescence의 단위는 RLU(Relative Light Units)로 1.0mL의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다.

### Luminometer의 조작

Luminometer는 Berthold사(Germany)로부터 Lumat LB 9507를 Tube는 Sarstedt사(Germany)로부터 Röhren-Tubes No. 55.476(5mL, 75×12mm)를 구입하여 사용하였다. Free cell이나 고정화 세포 모두 1.0mL의 동일한 volume과 세포 농도를 사용하였다. 사전 실험결과 모든 시료는 상온에서 측정 시간은 0.1초로 하여 측정하였다.

### 독성 물질에 대한 반응

각 독성물질이 bioluminescence에 미치는 영향을 조사하기 위하여 독성물질 가운데 phenol(Tedia Co Inc.), *p*-nitrophenol (Sigma Co., U.S.A.),  $PbCl_2$ (Kokusan Co. Ltd, Japan),  $CdCl_2 \cdot H_2O$ (Junsui Co., Ltd, Japan)를 선택하여 20분 동안 bioluminescence의 변화를 측정하였다 각 독성물질은 증류수에 용해시킨 stock 용액을 4°C에 저장하였다가 실험하기 직전에 농도별로 희석하여 사용하였다 Free cell과 고정화한 세포에 여러 농도의 독성물질을 첨가하여 bioluminescence intensity의 변화를 luminometer를 이용하여 측정하였다. Bioluminescence 측정은 모두 25°C에서 행하였다.

### 결과 분석

독성물질에 대한 반응 결과 bioluminescence의 intensity가 감소하며 linearity를 조사하기 위하여 specific bioluminescence reduction rate(2), bioluminescence intensity의 ratio(2) 및 EC<sub>50</sub>값(14)을 이용하였다

일정 시간동안 bioluminescence의 감소에 대한 specific bioluminescence reduction rate를 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\mu = \frac{(\ln L_2 - \ln L_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

여기서  $\mu$ 는 bioluminescence의 specific bioluminescence reduction rate이며  $t_1$ ,  $t_2$ 는 0시간과 20분이고,  $L_1$ ,  $L_2$ 는 0시간과 20분에서 측정된 bioluminescence의 intensity이다.

또한 Bioluminescence intensity의 ratio는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$I = \frac{I_0}{(1 + K_s [Q])} \quad (2)$$

이 때  $I_0$  와  $I$ 는 각각 독성물질을 첨가하지 않았을 때와 첨가

했을 때의 bioluminescence intensity로서 본 실험에서는 specific rate값과 비교하기 위하여  $I$ 를 독성물질을 첨가하고 20분에 측정된 bioluminescence intensity로 정하였다  $K_s$ 는 상수이고  $[Q]$ 는 독성물질의 농도이다.

식(2)를 다시 정리하면

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s[Q] \quad (3)$$

로 나타낼 수 있고 독성물질의 농도와 bioluminescence의 감소비( $I_0/I$ )의 상관 관계를 산출 하였다.

$EC_{30}$ 는 일정 시간 내에 발광량을 50%로 줄이기 위해 필요한 독성 물질의 농도를 나타내는 값으로 bioluminescence의 감소를 측정하는 한 방법인 Gamma( $\gamma$ ) value로부터 구한다. Gamma( $\gamma$ ) value는 잔류하는 bioluminescence에 대하여 감소한 bioluminescence의 비로서 다음 식에 의하여 계산할 수 있다.

$$\gamma = \frac{\text{Light Lost}}{\text{Light Remaining}} = \frac{R(t)L(0) - L(t)}{L(t)} = \frac{R(t)L(0)}{L(t)} - 1 \quad (4)$$

$\gamma(t)$ 는 t시간동안의 Gamma value이고  $R(t)$ 은 t시간동안 blank의 bioluminescence의 비로 t시간후의 blank의 bioluminescence intensity를 0시간일 때의 값으로 나누어서 구한다  $L(0)$ 는 0시간에서 sample의 bioluminescence, 즉 독성물질에 의해 영향을 받지 않았을 때의 bioluminescence intensity이고  $L(t)$ 는 t시간후의 bioluminescence, 즉 독성물질에 t시간동안 노출된 후의 bioluminescence intensity이다 각 농도에서의  $\gamma$ 값을 구하여 독성물질의 농도와  $\gamma$ 값을 log-log graph에 나타내면 직선으로 나타나고  $\gamma=1$ 이 되는 독성물질의 농도가 t시간 동안의  $EC_{30}(t)$  값이다.

**결과 및 고찰**

**세포 성장과 bioluminescence의 관계**

세포 성장은 bioluminescence의 중요한 요소로서 세포가 성장함에 따라 bioluminescence의 intensity가 비례할 것으로 예상할 수 있다 *Photobacterium phosphoreum* KCTC2852의 bioluminescence intensity와 세포의 성장과의 상관 관계를 조사하기 위하여 세포 배양 시간 동안 bioluminescence를 측정하였으며 Figure 1에 나타내었다 Bioluminescence 측정 시 시료로 취한 세포는  $10^3$ 배로 희석하여 사용하였다. O.D<sub>660</sub> 값이 0.8에서 1.0사이인 세포 배양액을 점종한 후 10시간 경과하였을 때 bioluminescent intensity가 최고값에 도달하였고 이 때 O.D<sub>660</sub> 값은 1.1이었다. 10시간 이후에는 세포의 성장은 계속되지만 bioluminescence는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

이는 세포가 성장함에 따라 bioluminescence의 증가가 비례하지만 세포가 과도하게 성장하여 세포 밀도가 너무 높아지면 오히려 bioluminescence가 감소하는 것을 의미한다 따라서, 660nm에서의 optical density와 bioluminescence의 관계를 여러 농도의 세포 희석액을 만들어 조사하였다. Figure 2에서 보듯이 O.D<sub>660</sub>이 일정 수준에 도달할 때까지는 bioluminescence intensity도 증가하지만 그 이상이 되면 오히려 bioluminescence가 감소하는 현상을 볼 수 있다. 이것은 luminescent bacteria가 bioluminescence를 발생하기도 하지만 흡수 또는 분산하기 때문으로 사료된다(15). luminescent bacteria가 bioluminescence를 발생하는데 관여하는 luciferase는 유도 효소로서 초기에는 세포가 성장함에 따라 효소 생산량이 증가하지만 발광이 어느 수준에 도달하면 자가 유도에 의하여 오히려 감소하는데 이 자가유도 현상에 의한 효소 생산의 감소도 일정 농도 이상에서 bioluminescence가 감소하는 원인이 되는 것으로 사료된다.

Figure 1. The relationship between cell growth and bioluminescence emission. The bioluminescence was measured with  $10^3$  times diluted solution of *Photobacterium phosphoreum* Cells were cultivated in the NaCl medium containing 12.5g of nutrient broth No.2, 25g of sodium chloride, 50g of yeast nitrogen base (without amino acid), and 3.0mL of glycerol in 10L of distilled water at 15°C. Symbols : (●), optical density of cell at 660nm : (■), bioluminescence intensity.

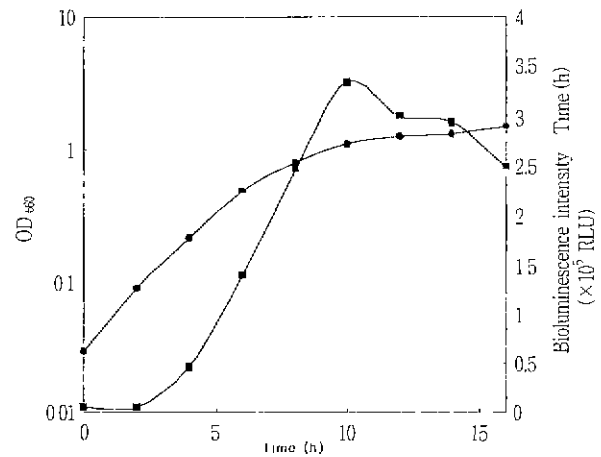


Figure 1. The relationship between cell growth and bioluminescence emission. The bioluminescence was measured with  $10^3$  times diluted solution of *Photobacterium phosphoreum* Cells were cultivated in the NaCl medium containing 12.5g of nutrient broth No.2, 25g of sodium chloride, 50g of yeast nitrogen base (without amino acid), and 3.0mL of glycerol in 10L of distilled water at 15°C. Symbols : (●), optical density of cell at 660nm : (■), bioluminescence intensity.

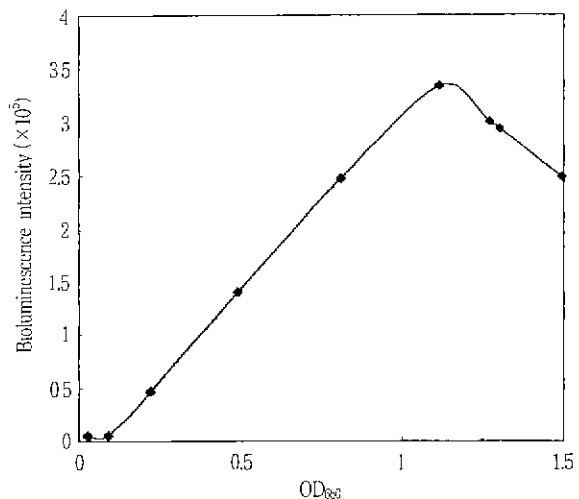


Figure 2. The relationship between optical density of *P. phosphoreum* in 660nm and a bioluminescence intensity. A various cell concentrations were prepared from the cells harvested grown for 14hr.

(16). 따라서 본 연구에서는 bioluminescence intensity가 최대 값을 나타내는 O.D<sub>600</sub>이 1.0에서 1.2인 세포를 사용하였다.

**pH에 따른 Bioluminescence의 영향**

*P. phosphoreum*의 bioluminescence 발생 메커니즘이 pH에 의해 영향을 받아 수질 중의 독성 물질이 존재하지 않더라도 monitoring하고자 하는 수질의 pH에 따라 bioluminescence의 변화가 생길 수 있다. 따라서 monitoring 가능한 수질의 pH 범위를 조사하기 위하여 10<sup>4</sup>배로 희석한 세포에 pH4.0에서 pH10.0 사이의 증류수를 첨가한 후 실온에서 bioluminescence를 측정하였다. 2.5% NaCl 용액으로 희석한 세포의 초기 pH는 6.5였으며 각기 다른 pH의 용액을 세포에 첨가하고 20분이 지난 후 bioluminescence를 측정할 결과 예상하였듯이 적정 pH 범위 외에서 bioluminescence는 급격히 감소하였다. bioluminescence를 위한 최적 pH는 7.0이나 pH 6.0~8.0의 범위에서도 bioluminescence는 초기 bioluminescence intensity를 유지 또는 증가하는 경향을 보여주었으며 이 범위 밖에서는 bioluminescence가 급격히 감소하므로 pH 6.0~8.0 범위에서 수질의 특성물질 검사에 충분히 이용할 수 있다고 조사되었다 (Figure 3)

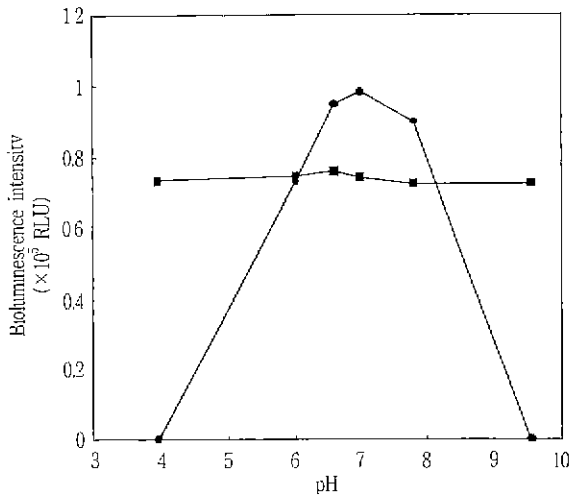


Figure 3. The effect of pH on bioluminescence intensity of *P. phosphoreum*. Bioluminescence was not affected between pH 6.0 and 8.0 after 20min.

Symbols : (■), bioluminescence intensity measured at 0min ; (●), bioluminescence intensity measured after 20min with distilled water of each pH.

**Alginate의 농도**

*P. phosphoreum*을 고정화하기 위하여 matrix로서 alginate를 선택하였다. 우선 alginate는 고정화 시 경도가 유지될 수 있는 농도를 결정하는 것이 중요하다. Alginate의 농도가 너무 높으면 경도는 높지만 고정화가 용이하지 않기 때문에 어느 정도의 경도를 유지하면서 고정화 과정도 용이한 농도를 조사하였다. Alginate 용액과 세포 희석액을 8:1로 혼합하였으며 이때 alginate 농도는 1.0%(w/w)에서 6.0%(w/w)까지 변화시켜 사용하였다. Alginate 농도가 1.0%(w/w)와 5.0%(w/w), 6.0%(w/w)로 하였을 때 비교적 bioluminescence 유지도가 좋았다 (Figure 4). 그러나 1.0%(w/w)는 gel형성이 견고하지 못하였으며 6.0%(w/w)

는 점도가 너무 높아 고정화 과정에 어려움이 있어 5.0%(w/w) alginate가 가장 적합한 것으로 조사되었다. 특히, 5%의 alginate로 고정화 하였을 경우 bioluminescence의 투과성도 양호하였다. Alginate가 bioluminescence의 투과성에 영향을 미치지 않는다는 보고(1, 3, 4)도 있었으나 이는 bioluminescent bacteria를 고정할 경우 매우 중요한 변수이다.

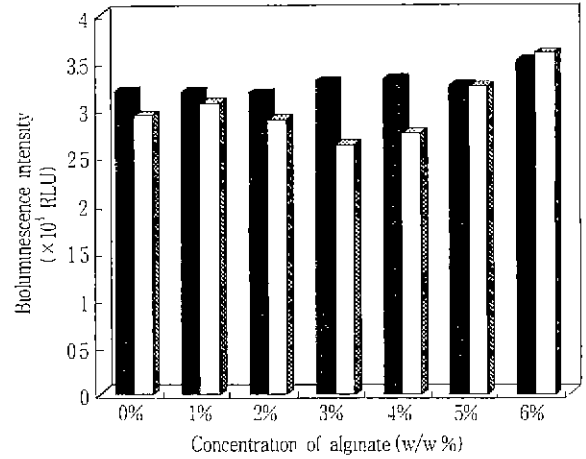


Figure 4. The effect of various alginate concentrations on the bioluminescence intensity. The bioluminescence was firstly monitored at 0 time and compared with bioluminescence measured at 20min.

Symbols : (■), bioluminescence intensity measured at 0 time ; (▨), bioluminescence intensity measured after 20min with various alginate concentrations.

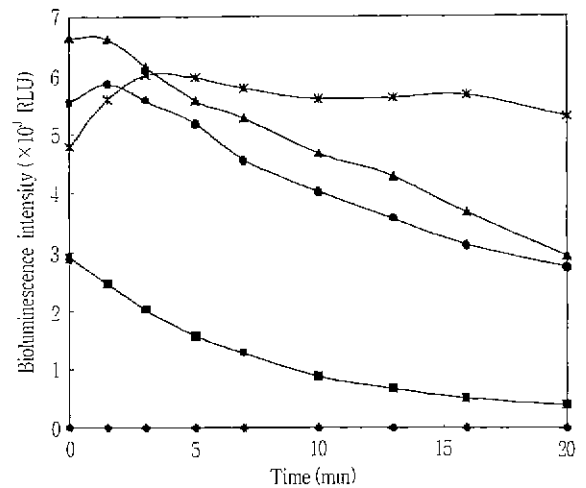


Figure 5. The effect of dilute solutions on bioluminescence for 20min When diluted with ordinary medium, the bioluminescence intensity slightly increased for the first 5min and stayed constant for the last 15min. When cells were diluted with 2.5%(w/v) NaCl solution which is same as NaCl concentration of culture medium for *P. phosphoreum*, a stability was shown for 20min with slight decay of bioluminescence. Symbols : Bioluminescence of cells mixed (◆), with distilled water ; (■), with 0.9%(w/v) NaCl solution ; (▲), with 2.5%(w/v) NaCl solution ; (●), with 3.0%(w/v) NaCl solution ; (\*), with medium.

**희석용액의 영향**

희석용액이 세포의 고정화 시 bioluminescence intensity에 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 세포를 네 가지 희석용액으로 희석한 후 고정화하여 bioluminescence intensity를 측정하였다. *P. phosphoreum*은 해양 미생물로 용균 현상을 방지하기 위하여 희석액 중에도 상당히 높은 NaCl 농도를 요구한다. 따라서 세포를 희석하여 세포의 activity를 최대로 유지할 수 있는 용액을 선택하기 위하여 NaCl 용액을 비롯해서 여러 가지 희석용액을 사용하여 세포를 희석하였다. 희석한 세포를 고정화한 후 20분 동안의 bioluminescence를 측정하였으며 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. NaCl이 함유된 배지용액으로 희석하여 고정화하였을 때 bioluminescence가 처음에 증가하여 20분동안 같은 수준을 유지하였지만, NaCl 용액이나 증류수로 희석하였을 때는 감소하는 경향을 보였다. Bioluminescence 유지를 위해서는 희석용액으로서 배지용액이 적합하나 수질 중에 함유된 독성물질 측정을 위해서는 세포 생육요소물질을

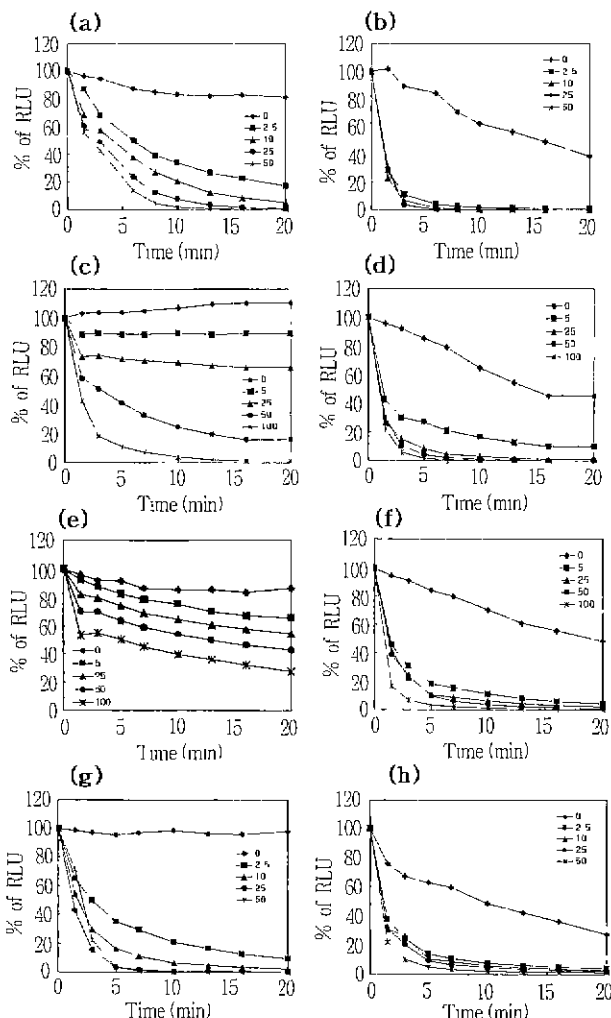


Figure 6. The dynamic response of bioluminescence in various toxic substances. The concentration unit of toxicant is ppm. The effect of CdCl<sub>2</sub> ; (a) on free cells (b) on immobilized cells, the effect of nitrophenol ; (c) on free cells (d) on immobilized cells, the effect of phenol ; (e) on free cells (f) on immobilized cells, the effect of PbCl<sub>2</sub> ; (g) on free cells (h) on immobilized cells.

침가하지 않는 것이 좋다. NaCl 2.5%(w/v)를 사용하였을 때 비교적 높은 bioluminescence intensity를 보였으므로 2.5%(w/v) NaCl solution을 희석액으로 희석한 세포를 고정화에 사용하였다.

**Free cell과 고정화 세포의 독성물질에 대한 반응**

독성 화학 물질 중 CdCl<sub>2</sub>, phenol, nitrophenol, PbCl<sub>2</sub>를 선택하여 독성에 대한 bioluminescence 반응을 조사하였다. 이들 독성 물질에 세포를 노출시킨 후 20분 동안 발광 현상의 변화를 살펴보았다. 예상했던 대로 모든 독성 물질에서 농도가 높을수록 bioluminescence intensity가 반비례하였다. 그리고 감소하는 정도는 독성 물질마다 상이하였다. 독성물질마다 free cell과 고정화 세포를 동시에 조사, 비교하였으며 Figure 6에서 보듯이 sodium alginate와 혼합하여 고정화 세포가 독성물질에 대한 반응성이 더 민감하였고 독성물질마다 bioluminescence intensity

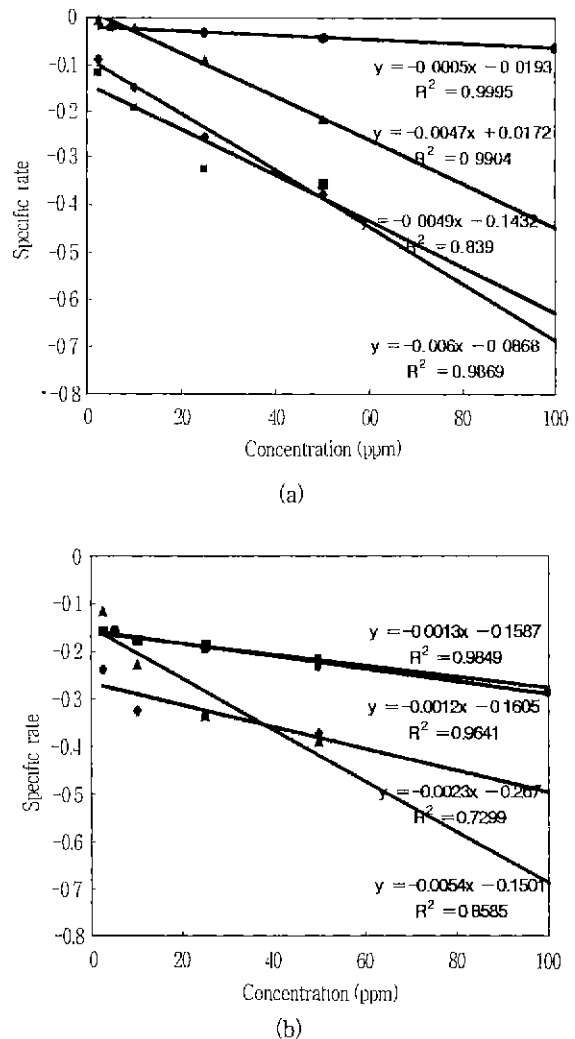


Figure 7 The specific bioluminescence reduction rate of each toxic substances. The relationship between concentration of toxic substances and specific bioluminescence reduction rate (a) with free cells and (b) with immobilized cells. Symbols : (●), the specific bioluminescence reduction rate pool phenol ; (▲), of nitrophenol ; (■), of PbCl<sub>2</sub> ; (◆), of CdCl<sub>2</sub>

의 감소가 특이적으로 나타났다. 고정화를 하였을 때 일반적으로 독성물질에 대한 민감도가 떨어지나 본 조사에서는 alginate를 gel화 시키지 않고 세포와 단순히 혼합한 상태로 이용하였으므로 일반적인 경향과는 다른 결과를 보였다. bioluminescence intensity의 각 독성물질에 대한 특이적인 반응은 각 독성물질의 농도 및 독성 정도를 측정하는데 있어 매우 중요하며 독성물질의 real time assay sensor를 개발하기 위하여 고정화 세포의 사용이 가능하다.

Free cell과 고정화 세포의 독성물질과의 상관 관계

독성물질에 대한 발광 현상의 감소는 specific bioluminescence reduction rate(2), bioluminescence intensity의 ratio(2), 그리고 Gamma value(14)로 분석하였으며 농도에 대한 linear

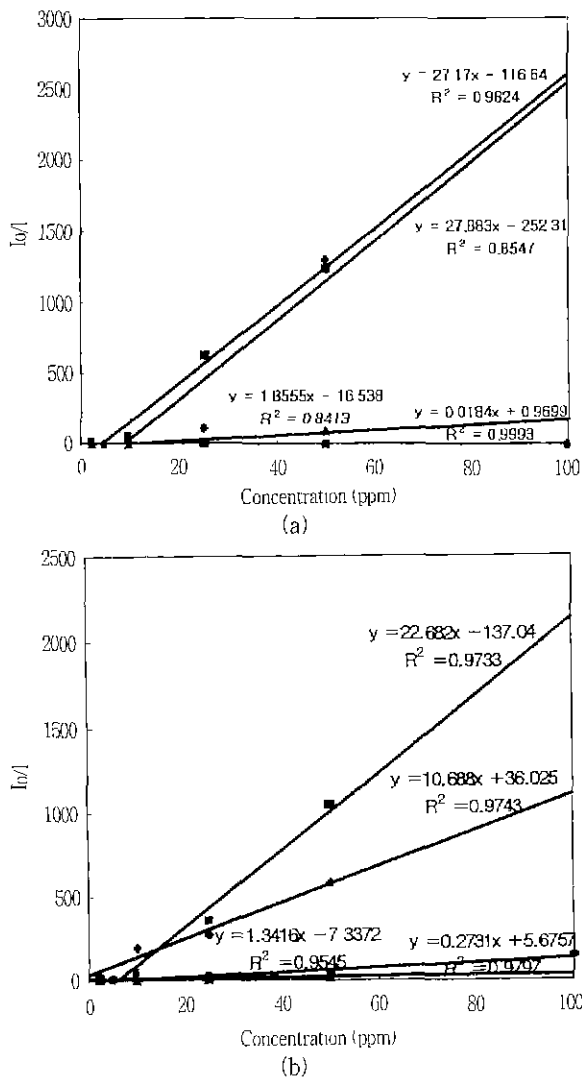


Figure 8. The relationship between concentration of toxic substances and the ratio of initial intensity(I<sub>0</sub>) and intensity with toxic substance(I) (a) with free cells and (b) with immobilized cells.

Symbols : (●), the ratio of bioluminescence intensity with phenol ; (▲), with nitrophenol ; (■), with PbCl<sub>2</sub> ; (◆), with CdCl<sub>2</sub>

그래프를 얻었다. Specific bioluminescence reduction rate는 일정 시간동안 발생하는 bioluminescence의 감소를 나타낸 것으로 독성물질의 각 농도에 따른 specific bioluminescence reduction rate와 독성물질 농도와의 linearity가 형성되었다 (Figure 7). 독성물질의 농도에 대한 bioluminescence intensity의 ratio(I<sub>0</sub>/I) 그래프 역시 linearity를 나타내었다(Figure 8)

Bioluminescence intensity의 감소를 측정하는 한 방법인 Gamma(γ) value로부터 EC<sub>50</sub>를 계산하였다. 또한 각 농도에서의 γ 값을 구하여 독성물질의 농도와 γ 값을 log-log graph로 나타낸 결과 역시 직선의 관계식이 성립되었다 (Fig. 9) 이 그래프에서 γ=1.0이 되는 독성 물질의 농도가 t시간 동안의 EC<sub>50</sub>(t) 값이다. 독성 시험에 이용된 4가지 독성물질로부터 Gamma(γ) value를 구하고 이 값으로부터 EC<sub>50</sub>(3min), EC<sub>50</sub>(10min), EC<sub>50</sub>(20min)을 구하여 Table 1에 나타내었다. EC<sub>50</sub>값이 작은 물질일수록

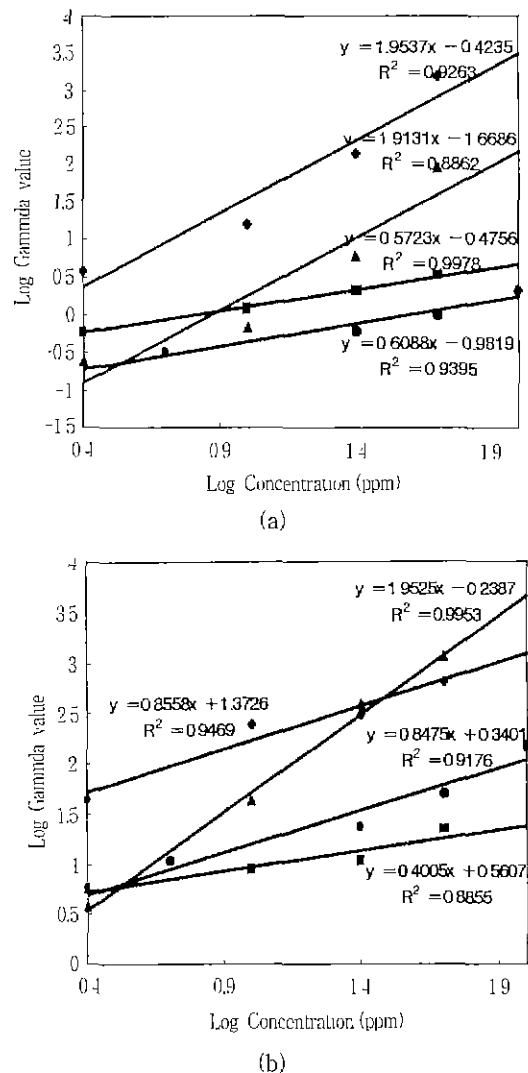


Figure 9. The gamma value of each toxic substances The relationship between log concentration of toxic substances and the log gamma value (a) with free cells and (b) with immobilized cells.

Symbols : (●), the gamma values with phenol , (▲), with nitrophenol ; (■), with PbCl<sub>2</sub> , (◆), with CdCl<sub>2</sub>

Table 1. EC<sub>50</sub>(ppm) of each toxic substance on free cells and immobilized cells at 3min, 10min and 20min

Toxic substances	Free cells			Immobilized cells		
	EC <sub>50</sub> (3min)	EC <sub>50</sub> (10min)	EC <sub>50</sub> (20min)	EC <sub>50</sub> (3min)	EC <sub>50</sub> (10min)	EC <sub>50</sub> (20min)
PbCl <sub>2</sub>	2.15	1.19	6.78	6.23	0.06	0.19
Phenol	177.71	97.00	41.01	2.01	0.69	0.40
CdCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	37.51	2.31	1.65	0.04	0.04	0.02
Nitrophenol	17.71	9.47	7.45	0.80	1.62	1.33

bioluminescence에 더 강한 독성 작용을 한다. 따라서 Table 1에서 보듯이 20분 동안의 EC<sub>50</sub>로 볼 때 free cell의 경우 CdCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, PbCl<sub>2</sub>, nitrophenol 그리고 phenol의 순서로 독성이 약하게 작용하였고 고정화 세포의 경우 CdCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, PbCl<sub>2</sub>, phenol 그리고 nitrophenol의 순서로 독성이 약하게 작용하였다. 또한 측정시간이 길어질수록 더 낮은 농도까지 독성물질을 monitoring 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 고정화 세포에서도 동일하게 나타났으며 수질 중의 독성물질의 독성정도, 농도 등을 monitoring 하는데 alginate 고정화 세포의 사용이 가능한 것으로 사료된다.

요 약

고정화 한 *P. phosphoreum*의 bioluminescence와 독성물질과의 상관관계를 이용한 수계의 독성물질 monitoring 가능성을 조사하였다. *P. phosphoreum*을 이용한 수계의 독성물질 monitoring을 위한 적정 세포 농도는 최대 bioluminescence intensity를 보인 O.D<sub>600</sub> 1.0~1.2였으며 이 농도의 세포를 2.5% NaCl 용액에 희석하여 5.0%의 alginate에 고정화 했을 때 bioluminescence 유지도가 가장 좋았다. 이러한 방법으로 monitoring이 가능한 수계의 pH는 6.0~8.0이었다 Free cell과 고정화 세포로 CdCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, PbCl<sub>2</sub>, phenol 그리고 nitrophenol에 대한 bioluminescence를 조사하였을 때 고정화 방법에 의해 독성물질에 대한 민감성이 증가되었다. 고정화 세포의 경우 각 독성물질에 따라 20분 이내에 0.01~1.50ppm이하까지 monitoring이 가능하였다 뿐만 아니라 specific bioluminescence reduction rate, bioluminescence intensity의 ratio 그리고 Gamma value로 분석함으로써 독성물질의 농도와 bioluminescence의 변화를 직선의 관계로 나타낼 수 있어 독성 물질의 농도 예측이 가능하다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 생물화학공학 학술연구조성비(96-F-4) 및 공업기술기반 연구비(Project No. 971-327('97 11. 1))에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. 문범주 (1996), 식품 위생학, pp. 263-310, 수확사, 서울  
 2. Lee, J H and Uck-Han Chun (1996), Monitoring of

Environmental Pollutants With *Photobacterium Phosphoreum* Immobilized on Strontium Alginate(1)(II), 유전공학 논문집, 8, 48-55.  
 3. Edward, A. M. (1991), Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence, *Microbiological reviews*, 55(1), 123-142.  
 4. Chun, U. H., Nina Simonov, Yaping Chen, and Margaret L. Britz (1996), Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*, *Resources, Conservation and Recycling*, 18, 25-40.  
 5. Lloyd, D., James K., Williams J., and Williams N. (1981), A Membrane-Covered *Photobacterium* Probe for Oxygen Measurements in the Nanomolar Range, *Anal. Biochem.*, 116(17), 17-21.  
 6. Nathalia, N. U. and Olga V. Lebedeva (1987), Immobilized Bacterial Luciferase and its Applications, *Application Biochemistry and Biotechnology*, 15, 35-51  
 7. Ida, E. Y and James K. Poster (1982), Bacterial Bioluminescence as a Bioassay for Mycotoxins, *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1072-1075.  
 8. Leenen, E. J T. M., Vitor A. P. Dos Santos, Katja C. F. Grolle, Johannes Trampler, and René H. Wijffels (1996), Characteristics of and Selection Criteria for Support Materials for Cell Immobilization in Wastewater Treatment, *Wat. Res.*, 30(12), 2985-2996.  
 9. Overgaard, S., J M. Scharer, M. Moo-Young, and N C. Bols (1991), Immobilization of Hybridoma Cells in Chitosan alginate Bead, *The canadian journal of chemical engineering*, 69, 439-443  
 10. Buyukgungor, H (1992), Stability and Lactobacillus bulgaricus Immobilized in κ-carrageenan Gels, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 53, 173-175.  
 11. Sidney, P. C. and Nathan O. Kaplan (1987), Immobilization of Living Microbial Cells in Polyacrylamide Gel in *Methods in Enzymology*, Vol 135, Academic press. Inc. pp. 198-216.  
 12. McEldowney, S. (1994). Effect of Cadmium and Zinc on Attachment and Detachment Interactions of *Pseudomonas fluorescens* H<sub>2</sub> with Glass, *Applied and environmental microbiology*. 60(8), 2759-2765.  
 13. Dietrich, K., Suzanne M. Mrazga. and Rita A. Teutonico (1985), Immobilization and permeabilization of cultured plantcells, *Food Technology*, Oct., pp. 135-142.  
 14. Paton, G. I., C D. Campbell. L. Anne Glover, and K Killham (1995), As sessment of bioavailability of heavy metals using lux modification constructs of *Pseudomonas fluorescens*, *Letters in Applied Microbiology*, 20, 52-56.  
 15. Kenedy, M J., M. S. Thakur, D. I. C. Wang and G. N. Stephanopoulos (1992), Estimation Cell Concentration in the Presence of Suspended Solids : A Light Scatter Technique, *Biotechnol. Bioeng.* 40(8), 875-888.