

Strontium Alginate를 담체로 한 *Photobacterium phosphoreum* 고정화 조건의 최적화

이흥주 · 김현숙 · 정계훈 · 이은수 · 전억한*
경희대학교 생명자원과학부 식품가공학과

Optimization of the Condition of Immobilized *Photobacterium phosphoreum* with Strontium Alginate. Lee, Hong-Joo, Hyun-Suk Kim, Kye-Hun Chung, Eun-Su Lee, and Uck-Han Chun*. Department of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science, Kyung Hee University, Suwon, Kyungki 449-701, Korea - Since the condition of immobilization must be optimized, it is very important to know whether and on how conditions bacterial cells retain their metabolic activity during immobilization process. A bioluminescence intensity had the maximum value when cell concentrations were between 1.0 and 1.2 measured at O.D.₆₆₀. The strontium alginate was used as an immobilization matrix and two independent factors for immobilization of *Photobacterium phosphoreum* with strontium alginate were optimized with the response surface methodology(RSM) considering degree of bioluminescence. As a result, the optimum concentration for immobilization was found to be 2.4%(w/w) for sodium alginate and 0.31 M for strontium chloride, respectively. A dilution was carried out with 2.5%(w/v) NaCl solution that is an optimum environmental condition for growth of *P. phosphoreum*. Under the such condition of immobilization, hardness could be predicted as 4.66×10^4 N/m² and it took different time according to the volume of matrix to be immobilized completely.

Key words: *Photobacterium phosphoreum*, immobilization, bioluminescence, strontium alginate, RSM

발광 미생물을 고정화하여 이용한 예로는 *Vibrio fischeri*를 두 장의 반투과성 polypropylene 막 사이에 고정화하여 산소 sensor로써 이용하였고[7] *Beneckea harveyi*를 alginate gel에 고정화하여 세포내의 효소작용 하에서 H₂O₂로부터 형성되는 산소의 양을 측정하므로써 hydrogen peroxide의 농도를 결정하였다는 보고가 있다[9].

일반적으로 고정화 담체로서 calcium alginate[11], strontium alginate[2], κ-carrageenan[1], polyacrylamide[12], glass bead[8], cellulose, collagen, agar 같은 polymer가 사용되고 있으며 이 중 alginate는 미생물의 대사를 장기간 유지시켜 주어 고정화 물질로서 널리 사용되고 있다. 또한 고정화 과정이 비교적 간단하고 세포가 고정화 담체 내에서도 생존하며, 인체에도 무해하고 gel의 조직이 안정할 뿐 아니라 가격이 비교적 저렴하다는 장점도 있다[2, 4]. 발광 미생물의 생물 발광은 매우 민감하게 세포의 대사활성을 반영하는데 alginate에 고정화하였을 경우 세포가 생물 발광 발생을 위한 대사를 해치지 않고 유지시켰으며 *Beneckea harveyi* 세포를 calcium alginate에 고정화하였을 때 높은 생물 발광 투과성을 보였다[9]. Alginate를 견고하게 하는 양이온으로

서 일반적으로 많이 사용되는 것은 Ca²⁺이온이지만 *Photobacterium phosphoreum*은 해양성 세균으로서 배지 중 NaCl의 농도가 높는데, 이런 경우 Ca²⁺가 Na⁺로 대체되어 적합하지 않다. 따라서 고정화 물질로 strontium alginate의 이용이 제안되고 있다[2, 6].

고정화 세포를 이용할 경우 고정화 담체의 경도가 중요하며 너무 견고할 경우 기질과의 반응성이 떨어지고 경도가 너무 약하면 이용 상에 문제가 있게 된다. Sodium alginate의 농도와 strontium 이온의 농도는 고정화시 고정화 담체의 경도를 결정하는 중요한 요소로서 농도가 높을수록 경도가 증가할 것이라고 예상할 수 있다. 발광 미생물을 고정화하기 위해서는 경도뿐만 아니라 세포의 안정도 즉 생물 발광 유지도 역시 중요한 요소이므로 생물 발광 유지도가 좋으면서 어느 정도 경도도 유지할 수 있는 최적 고정화 조건을 확립하는 것이 고정화 발광 미생물을 이용하기에 앞서 선행되어야 한다. 발광 미생물을 strontium alginate로 고정화하는데 경도와 생물 발광 유지도가 중요한 요소이고 이 요소에 미치는 영향 인자로서 sodium alginate의 농도와 strontium chloride의 농도를 들 수 있는데 이러한 인자들의 고정화 조건을 통계적으로 최적화하기 위하여 반응 표면 분석법(Response Surface Methodology:RSM)을 이용하였다. 이 방법은 Box와 Wilson이 1951년 처음 소개한 방법으로서 종속 변수에

*Corresponding author
Tel. 82-331-201-2626, Fax. 82-331-204-8116
E-mail: uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

대하여 각 독립 변수의 영향이 어느 정도인가를 등고 분석으로 확인할 수 있도록 고안한 것이다[10]. 지금까지 고정화 한 발광 미생물의 연구는 기존의 다른 세포의 고정화 조건에 맞추어 연구되었을 뿐 생물 발광을 고려하여 고정화 조건을 최적화 시킨 연구는 없었다.

따라서 본 연구에서는 *P. phosphoreum*을 strontium alginate로 고정화하기 위한 최적 고정화 조건을 확립하기 위하여 생물 발광량이 가장 높은 세포의 농도를 결정하였으며 경도와 생물 발광 유지 정도, 고정화하는데 소요되는 시간 등을 고려하여 최적 sodium alginate의 농도와 strontium chloride 농도 조건을 다중 회귀 분석하고 모델식을 설정하였다. 최적 고정화 조건의 타당성은 반응표면 분석을 이용한 등고 분석과 3차원 분석(3-D plot)을 수행하여 그 유의성을 조사함으로써 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 실험에 이용된 발광 미생물은 *Photobacterium phosphoreum* KCTC2852로서 NaCl이 함유된 배지에서 배양하였다. NaCl이 함유된 배지의 조성은 nutrient broth No.2(meat peptone 4.3 g/L, casein peptone 4.3 g/L, sodium chloride 6.4 g/L)(Fluka, Switzerland) 12.5 g/L, sodium chloride 25.0 g/L, yeast nitrogen base (without amino acid)(Sigma Co., U.S.A.) 5.0 g/L, glycerol(Difco Co. Ltd., U.S.A.) 3.0 mL/L이고 pH는 100 mM potassium phosphate buffer를 이용하여 7.0으로 조절하였다. 액체 배지에서 세포를 O.D₆₆₀ 0.8~1.0에 도달할 때까지 배양하였으며 이를 접종균(10%v/v)으로 사용하여 15.0°C, 100 rpm의 교반배양기(Vision Scientific Co., K.M.C.-8480SF, Korea)에서 배양하였다. 세포 농도는 UV visible spectrophotometer(Shimadzu Co., UV-1201, Japan)를 이용하여 660 nm에서 측정하였다.

세포 고정화

고정화 담체로서 strontium alginate를 사용하였다. 접종한 후 12~14시간 동안 배양한 세포를 2.5%(w/v)의 식염수에 10⁻²로 희석한 후 세포 희석액과 2.4%(w/w)의 sodium alginate(Hayashi Co. Ltd., Japan)를 1:8의 비율로 섞고 혼합액에 sodium alginate와 동량의 0.31M의 strontium chloride(Sigma Co., U.S.A.) 용액을 첨가하였다. Strontium 이온과 alginate가 완전히 결합할 때까지 10분 정도 지난 후에 사용한다.

생물 발광량의 측정

고정화하지 않은 세포(free cell)인 경우는 접종 후 12~14시간 배양한 세포(*P. phosphoreum*)를 2.5%(w/v)

식염수에 10⁻²의 비율로 희석한 후 luminometer tube (Röhren-Tubes No. 55.476, 5 mL, 75×12 mm, Sartstedt Co., Germany)에 0.2 mL를 취하여 생물 발광량 측정에 사용하였고, 고정화 세포의 경우 10⁻²로 희석한 세포를 0.2 mL의 반구형으로 고정화하여 luminometer (Berthold Lumat LB 9507, Germany)로 측정하였다. 생물 발광량의 단위는 RLU(Relative Light Units)로 10초당 1.0 mL의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다. 모든 시료는 상온에서 측정 시간은 0.1초로 하여 측정하였다.

고정화 담체의 경도 측정

Sodium alginate와 strontium chloride의 농도에 따른 고정화 담체의 경도를 측정하기 위하여 sodium alginate의 농도는 1%(w/w)에서 7%(w/w)까지, strontium chloride의 농도는 0.05M에서 0.35M까지 변화시켜 49가지의 실험구를 cross-check해 보았다. 경도만을 측정할 것이므로 세포는 첨가하지 않았으나 실제 고정화 조건과 동일하게 하기 위하여 각 농도의 sodium alginate와 2.5%(w/v) NaCl 용액을 8:1로 잘 섞은 후 strontium chloride를 sodium alginate와 같은 양만큼 첨가하였으며 완전히 고정화 되도록 72시간이 지난 후에 경도를 측정하였다. 시료는 반지름 0.55 cm, 높이 1.0 cm의 실린더형으로 만들었고 strontium chloride와 접촉한 면의 반대쪽으로부터 1.0 cm를 제거하고 난 면을 기준으로 하여 절단하였다. 경도의 측정은 rheometer(U.S.A.)를 사용하여 X-head speed는 200 mm/min, chart speed는 300 mm/min의 조건에서 hardness를 측정하였다.

고정화 물질의 발광 유지도 조사를 위한 통계적인 실험 설계

Strontium alginate를 담체로 하여 *P. phosphoreum*의 발광 유지도가 가장 좋은 최적 고정화 농도를 얻기 위해 Design Expert(Stat-Ease Inc. Minneapolis, U.S.A.) 프로그램 내의 중심합성 계획법(central composite design)을 이용하였으며 고정화 조건은 sodium alginate와 strontium chloride의 농도를 주요 독립 변수로 선정하고 실험점의 선택은 사전 실험 결과를 바탕으로 하여 임의로 7개의 점을 선택하였다. + α (max)와 - α (min) 값의 범위는 사전 실험 결과를 참조로 하여 sodium alginate 농도의 범위는 최소값 1.5%(w/w), 최대값 4.5%(w/w)와 중간값 2.5%(w/w)를, strontium chloride 농도는 0.15M, 0.4M과 중간값 0.3M을 선정하여 2변수를 3수준의 부분 요인 실험법에 의하여 실험구를 조합하였다.

반응표면 분석에 의한 고정화 농도조건의 최적화

Sodium alginate의 농도와 strontium chloride의 농도

를 각각의 독립 변수로 선정하고 고정화 후 20분 동안의 bioluminescence 변화와 고정화 담체의 경도를 종속 변수 y로 선정하여 Design Expert 프로그램을 이용하여 다중회기 분석하고 반응 변수에 대한 모델을 추정하여 이를 다항 회귀 모형식으로 변환하였다. 생물 발광 유지도와 고정화 조건을 최적화 시키기 위해 생물 발광 유지도에 대한 고정화 조건의 다중 회기 분석 및 t검정을 하여 종속 변량의 최적화를 확인하였고 반응 표면 분석에 의한 최대 정상점을 구하였으며, 등고 분석(contour plot)과 3차원 분석(3-D plot)을 통하여 추출 조건의 최적화를 실시하였다. 또한, 고정화 물질의 농도에 대한 고정화 담체의 경도를 다중 회기 분석 및 t검정을 하여 독립변량과 종속 변량의 상관 관계를 살펴보았다.

고정화 원료 시점 조사

Sodium alginate에 strontium chloride를 첨가한 후 고정화되는 과정을 살펴보고 완전히 고정화되기까지 걸리는 시간을 측정하기 위하여 고정화 과정 동안의 bioluminescence 변화와 색도의 변화를 측정하였다. 색도의 변화는 colorimeter(Color JC 801, Color Techno System Co., Japan)를 사용하여 명도(lightness)를 나타내는 L*-value를 측정하였으며 이 때의 표준색은 L*-value가 81.21, a*-value가 -32.46, b*-value가 8.78인 2.4%(w/w) sodium alginate 용액을 사용하였다. 여기서 a*는 redness이고 b*는 yellowness이다.

결과 및 고찰

세포 농도와 bioluminescence의 관계

세포 농도는 생물 발광의 중요한 요소로서 세포 수에 따라 발광량이 비례할 것으로 예상할 수 있다. *P. phosphoreum* KCTC2852의 세포 농도와 발광량의 상관 관계를 조사하기 위하여 세포 배양 시간 동안 발광량을 측정하였으며 Fig. 1에 나타내었다. 발광량의 측정은 시료로 취한 세포를 10³배로 희석하여 사용하였다. O.D₆₆₀ 값이 0.8에서 1.0 사이인 세포 배양액을 접종한 후 10시간 동안 배양하였을 때 발광량이 최고값에 도달하였고 이 때 O.D₆₆₀ 값은 1.1이었다. 10시간 이후에는 세포의 성장은 계속되지만 발광량은 오히려 감소하는 경향을 보였다.

이는 세포가 대수 증식기 동안은 농도에 따라 발광량의 증가가 비례하지만 대수 증식기 후반에는 즉, 세포의 농도가 너무 높아지면 오히려 발광량이 감소하는 것을 의미한다. 따라서, 세포 농도와 발광량의 관계를 여러 농도의 세포 희석액을 만들어 조사하였다. Fig. 2에서 보듯이 세포의 농도가 일정 수준에 도달할 때까지는 발광량도 증가하지만 그 이상이 되면 오히려 발광량이 감소하는 현상을 볼 수 있다. 이것은 발광 미생물이 생물 발광

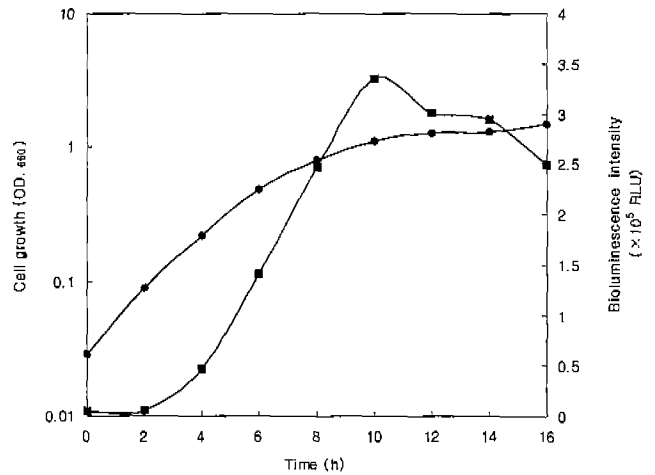


Fig. 1. The relationship between cell growth and bioluminescence emission.

The bioluminescence was measured with 10⁻³ diluted solution of *Photobacterium phosphoreum*. Cells were cultivated on the NaCl medium containing 12.5 g of nutrient broth No.2, 25 g of sodium chloride, 5.0 g of yeast nitrogen base (without amino acid), and 3.0 ml of glycerol in 1.0 L of distilled water at 15°C. ●, optical density of cell at 660 nm; ■, bioluminescence intensity.

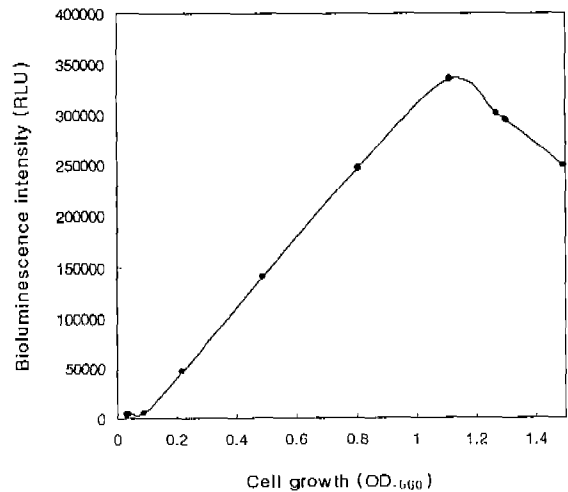


Fig. 2. The relationship between cell concentrations of *P. phosphoreum* and a bioluminescence intensity.

A various cell concentrations were prepared from cells harvested after 14 h growth.

을 발생하기도 하지만 흡수 또는 분산하기 때문으로 사료된다[3]. 발광 미생물의 생물 발광 발생에 관여하는 luciferase는 유도 효소로서 초기에는 세포가 성장함에 따라 효소 생산량이 증가하지만 발광이 어느 수준에 도달하면 자가유도에 의하여 오히려 감소하는데, 이 자가유도 현상에 의한 효소 생산의 감소도 일정 농도 이상에서 발광량이 감소하는 원인이 되는 것으로 사료된다[5]. 따라서 본 연구에서는 발광량이 최대값을 나타내는 O.D₆₆₀이 1.0에서 1.2인 세포를 사용하였다.

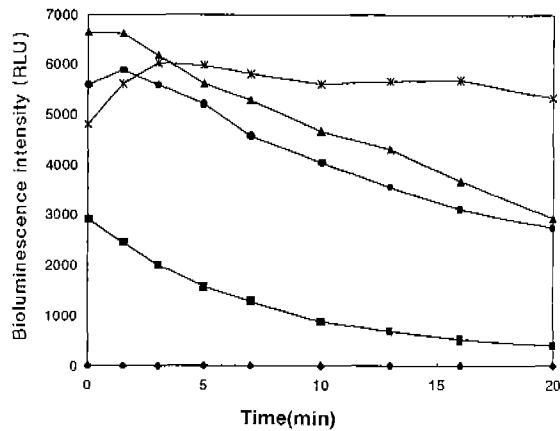


Fig. 3. The effect of dilute solutions on bioluminescence for 20 min.

When diluted with ordinary medium, the bioluminescence intensity slightly increased for the first 5 min and stayed constant for last 15 min. 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. 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 고정화시 발광량에 영향을 미치는 것을 조사하기 위하여 세포를 네 가지 희석용액으로 희석한 후 고정화하여 발광량의 변화를 측정하였다. *P. phosphoreum*은 해양 미생물이므로 용균 현상을 방지하기 위하여 희석액 중에도 상당히 높은 NaCl 농도를 요구한다. 따라서 세포를 희석하여 세포의 활성을 최대로 유지할 수 있는 용액을 선택하기 위하여 NaCl 용액을 비롯해서 여러 가지 희석용액을 사용하여 세포를 희석하였다. 희석한 세포를 고정화 한 후 20분 동안의 발광량을 측정하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. NaCl이 함유된 배지 용액으로 희석하여 고정화하였을 때 발광량이 처음에 증가하여 20분 동안 같은 수준을 유지하였지만, NaCl 용액이나 증류수로 희석하였을 때는 감소하는 경향을 보였다. 따라서 생물 발광 유지를 위해서는 희석용액으로서 배지 용액이 적합하였다. 그러나 세포 생육요소 물질을 첨가하지 않는 것이 좋은 경우, 예를 들어 수질 중에 함유된 독성물질 측정에 고정화한 세포를 이용할 경우에는 NaCl의 배지 함유량과 같은 2.5%(w/v) NaCl 용액을 사용하였을

Table 1. Fraction factorial block of experimental design for hardness of strontium alginate matrix and hardness

Treatment No.	Process variables ¹⁾		Hardness ($\times 10^4 \text{N/m}^2$)	Treatment No.	Process variables		Hardness ($\times 10^4 \text{N/m}^2$)
	X ₁	X ₂			X ₁	X ₂	
1	1.0	0.5	-	26	5.0	2.0	5.1835
2	2.0	0.5	-	27	6.0	2.0	6.1554
3	3.0	0.5	-	28	7.0	2.0	6.9653
4	4.0	0.5	-	29	1.0	2.5	-
5	5.0	0.5	-	30	2.0	2.5	1.6198
6	6.0	0.5	-	31	3.0	2.5	3.0777
7	7.0	0.5	1.4579	32	4.0	2.5	3.8876
8	1.0	1.0	-	33	5.0	2.5	5.1835
9	2.0	1.0	-	34	6.0	2.5	6.4793
10	3.0	1.0	-	35	7.0	2.5	6.1554
11	4.0	1.0	3.2397	36	1.0	3.0	-
12	5.0	1.0	2.7537	37	2.0	3.0	2.1058
13	6.0	1.0	2.5917	38	3.0	3.0	2.9157
14	7.0	1.0	1.1339	39	4.0	3.0	4.5355
15	1.0	1.5	-	40	5.0	3.0	6.1554
16	2.0	1.5	1.6198	41	6.0	3.0	7.9372
17	3.0	1.5	3.2397	42	7.0	3.0	7.6132
18	4.0	1.5	2.9157	43	1.0	3.5	3.2397
19	5.0	1.5	4.6975	44	2.0	3.5	1.6198
20	6.0	1.5	6.3174	45	3.0	3.5	3.8876
21	7.0	1.5	4.0496	46	4.0	3.5	5.5074
22	1.0	2.0	-	47	5.0	3.5	4.0496
23	2.0	2.0	1.9438	48	6.0	3.5	8.0992
24	3.0	2.0	2.9157	49	7.0	3.5	9.2331
25	4.0	2.0	8.0992				

¹⁾X₁: Sodium alginate concentration(%), X₂: Strontium chloride concentration(M)

때 비교적 높은 발광량을 보였으므로 2.5%(w/v) NaCl 용액이 희석용액으로서 적합한 것으로 조사되었다.

고정화 물질의 농도에 따른 고정화 담체의 경도

*P. phosphoreum*을 고정화하기 위하여 고정화 담체로서 strontium alginate를 선택하였다. 고정화 세포를 이용할 경우 어느 정도 경도를 유지하는 것이 중요하며 특히 발광 미생물을 고정화 할 경우 발광 기작에 영향을 미치지 않고 유지시켜주는 고정화 물질을 선정하는 것이 중요하다. Strontium alginate가 이와 같은 조건을 만족시켜 주는 고정화 담체라는 보고가 있으나 발광미생물의 고정화를 위한 sodium alginate와 strontium chloride의 최적 농도를 조사하는 것이 선행되어야 하므로 각 물질의 농도에 따른 고정화 담체의 경도와 발광 유지도를 조사하여 최적 고정화 조건을 조사하였다. 우선 sodium alginate와 strontium chloride의 농도가 고정화 담체의 경도에 미치는 영향을 조사하였다. sodium alginate의 농도가 7.0%(w/w)을 초과하면 점도가 너무 높아서 세포와 혼합시 용이하지 않아 고정화 과정이 용이하지 않았으므로 1.0%(w/w)부터 7.0%(w/w)까지 변화 시켰으며 strontium chloride의 농도는 일반적으로 고정화 농도에 0.3 M이 사용되는 점을 고려하여 0.05M부터 0.35M까지 변화시켜 만든 실린더형 고정화 담체 경도를 측정하였고 그 결과는 Table 1과 같다. 1~6번 처리구인 1.0%(w/w)의 sodium alginate 용액의 경우 strontium chloride의 농도가 높고 아무리 장시간 고정화를 시켜도 완전히 고정화되지 않았으며 2.0%의 경우 8번 처리구인 0.05M과 9번인 0.1M 그리고 10번인 0.15M의 저농도의 strontium chloride와는 마찬가지로 결과를 보였다. 1번, 8번, 15번, 22번, 29번, 36번 처리구인 strontium chloride이 0.1M인 경우 sodium alginate의 농도가 높아도 담체가 형성되지 않았다. 따라서, 고정화 물질 중 한가지 물질의 농도가 너무 낮으면 나머지 물질의 농도를 아무리 높게 하여도 고정화 담체가 형성되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 49번 처리구인 7% strontium alginate와 3.5M strontium chloride일 때 경도는 $9.2331 \times 10^4 \text{N/m}^2$ 로 가장 높은 값을 보였다. Sodium alginate와 strontium chloride의 농도를 독립 변수로 설정하고 측정된 경도를 Y로 설

Table 3. Values of regression coefficients calculated for the hardness

Independent variables	Parameters		
	Coefficient	Standard error	t-value
CONSTANT	3.50	0.28	12.38
X ₁	2.51	0.43	5.84
X ₂	2.05	0.44	4.69

정하여 다중 회귀 분석하였다. ANOVA test한 결과는 Table 2와 같았으며 유의차 5% 이내에서 각 인자의 변수에 대한 회귀 계수는 1차 선형 효과와 반응 표면이 곡면을 이루는 2차 모형의 곡선 효과 분석치와 각 물질의 농도간에 상호작용이 있었다. 유의차가 더 적은 값(0.1%)을 가지는 1차 상관관계를 다중 회귀 분석을 수행한 결과 t-value의 절대값이 1.75 이상인 항은 다중 회귀 분석 모델식에 채택하고 t-value의 절대값이 1.75 미만인 항은 기각하였다(Table 3). 독립 변수 중 기각되는 항이 없었으므로 다음의 모델식 $Y=3.50+2.51X_1+2.05X_2$ ($r^2=0.99$)을 얻었다. 이는 고정화 담체인 strontium alginate의 농도에 sodium alginate와 strontium chloride 두 변수가 모두 큰 영향을 주는 것으로 sodium alginate의 농도와 strontium chloride의 농도가 높을수록 더 견고한 고정화 담체를 얻을 수 있었다(Fig. 4). 이 때 다중 상관 계수의 제곱의 합은 100이었으며 유의 수준을 검정하는 자유도와 F-value도 99.9% 수준에서 ($P<0.001$) 유의성을 나타내어 다중 회귀 분석에 의하여 각 변수가 선별되어 설정된 모델식이 99.9% 수준에서 유의성이 있었다. 고정화 담체가 너무 견고하면 고정화 세포의 이용 시 기질의 침투가 용이하지 않으므로 sodium alginate와 strontium chloride가 완전히 결합할 수 있는 0.3%와 0.1M이상만 되면 고정화 담체로서 이용이 가능하였다. 이 때 또한 고려해야 할 것은 완전히 고정화되기까지 걸리는 시간인데 저농도일수록 더 많은 시간이 요구되므로 이상의 조건을 만족시켜주는 최적 고정화 농도를 찾는 것이 중요하다. 또한 발광 미생물의 경우 생물 발광 유지도가 무엇보다도 중요한 요인이므로 고정화가 가능한 3%이상의 sodium alginate와 0.1M이상의 strontium chloride로 생물 발광 유지도가 좋은 농도를 우선 조사하여 경도와

Table 2. The result of ANOVA test of models for the hardness

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	prob.>F
Mean	698.6	1	698.6		
Linear	100.0	2	50.0	22.66	<0.001
Quadratic	26.9	3	9.0	5.86	0.003
Cubic	11.7	4	2.9	2.23	0.093
Residual	34.2	26	1.3		
Total	871.5	36			

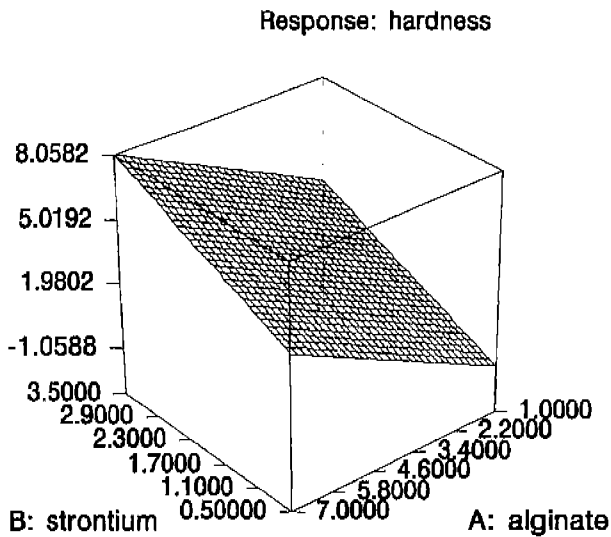


Fig. 4. Response surface of the hardness ($\times 10^4 \text{N/m}^2$) of matrix immobilized at sodium alginate concentration (%) and strontium chloride (M), respectively.

The hardness increases as concentration of two materials increase. The hardness of optimum condition, 2.4% (w/w) of sodium alginate and 0.31M of strontium chloride, could be predicted as $3.66 \times 10^4 \text{N/m}^2$ and the model equation was $Y = 3.50 + 2.51X_1 + 2.05X_2$ ($r^2 = 0.99$).

고정화에 소요되는 시간 등을 고려하여 최적 고정화 조건을 찾기로 하였다.

고정화 물질의 농도에 따른 생물 발광 유지도

Strontium alginate로 고정화하기 위한 sodium alginate와 strontium chloride의 최적 농도를 결정하기 위하여 생물 발광을 가장 잘 유지해주는 즉, 세포의 안정도를 높여주는 농도를 조사하였다. 최적조건을 설정하기 위하여 반응 표면 분석법을 이용하였는데 이 방법의 특성은 최종 생산물질의 성질을 크게 좌우할 수 있는 요소를 찾아 독립변수로 지정하여 예비 실험이나 문헌적인 배경을 근거로 그 요소들의 수준을 정한 후 중심 합성법에 따라 실험 설계하고 전체요인 실험법이나 부분요인 실험법에 의하여 실험을 수행한다. 이 때 실험에서 얻은 값을 종속 변수로 회귀 분석하고, 회귀 분석에 대한 분산 분석을 통해 모델식을 결정하고 또한 결정된 모델식을 독립 변수가 2개가 되도록 고정하여 등고 분석이나 3차원 분석을 수행한 후 최고의 반응값을 찾는다. 이 때 고정되어진 조건과 최고 반응값이 출력된 독립변수의 좌표를 읽어 그 조건대로 최종 생산물이 생산하는 방법으로써 시간적, 경제적 이득이 있다. 본 연구에서는 독립변수로서 sodium alginate와 strontium chloride의 농도를 선정하고 사전 실험을 통하여 임의로 7개의 실험점을 택하여 다양한 농도의 고정화 담체 내에서 생물 발광 유지 정도를 비교 분석하였고 그 결과는 Table 4와 같다. 11번

Table 4. Fraction factorial block of experimental design for maintenance of bioluminescence test and the ratio of bioluminescence at 20 min to 0 time

Treatment No.	Process variables		The ratio of bioluminescence
	X_1	X_2	
1	1.50	0.20	0.3756
2	3.50	0.20	0.2215
3	1.50	0.40	0.4211
4	3.50	0.40	0.3459
5	1.00	0.30	0.3604
6	4.00	0.30	0.3685
7	2.50	0.15	0.4000
8	2.50	0.45	0.4397
9	2.50	0.30	0.4808
10	2.50	0.30	0.6055
11	2.50	0.30	0.7112
12	2.50	0.30	0.5855
13	2.50	0.30	0.6171

처리구인 sodium alginate 2.5%와 strontium chloride 0.3M일 때 발광량 유지 정도가 71.12%로 가장 높은 값을 보였으며, 2번 처리구인 3.5%와 0.2M일 때 22.15%로 가장 낮은 값을 보였다. sodium alginate의 농도가 1.0에서 2.4% (w/w)까지, strontium chloride의 농도는 0.01에서 0.31M로 농도 증가에 따라 생물 발광 유지도가 좋아졌으나 그 이상의 농도가 되면 오히려 생물 발광이 감

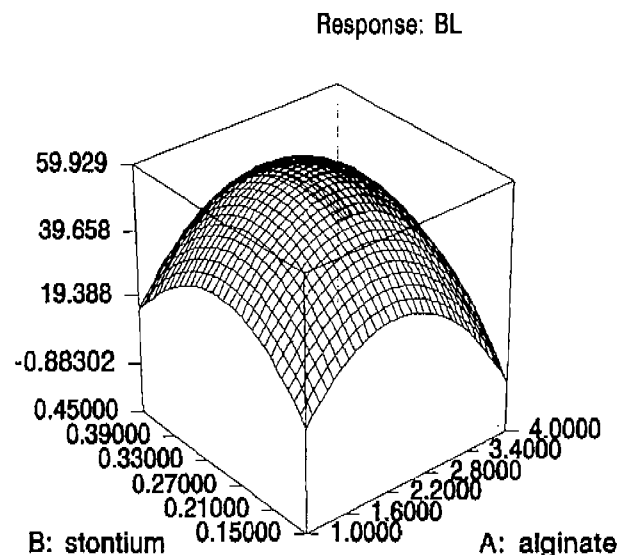


Fig. 5. Response surfaces of the maintenance of bioluminescence on sodium alginate concentration (%) and strontium chloride (M), respectively.

At any concentration the maintenance of bioluminescence increases as concentration of two materials increase but beyond the optimum point it decrease. The model equation was $Y = 0.60 + 2.83X_2 + 16.65X_1 + 19.42X_2^2$ ($r^2 = 0.99$).

Table 5. The result of ANOVA test of models for maintenance of bioluminescence test

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	prob.>F
Mean	27072.3			1	27072.3
Linear	117.8	2	58.9	0.28	0.765
Quadratic	1653.3	3	551.1	7.91	0.012
Cubic	94.2	2	47.1	0.60	0.585
Residual	393.4	5	78.7		
Total	29331.0	13			

소하는 결과를 나타내었다(Fig. 5). 이는 고정화 물질이 어느 정도까지는 농도가 높아질수록 경도가 증가하여 세포의 자유로운 이동을 막고 세포의 안정도를 증가시켜 발광유지도가 좋아지나 그 이상이 되면 오히려 경도의 증가가 세포의 발광 반응을 방해하기 때문이라고 사료된다. Sodium alginate와 strontium chloride의 농도를 독립 변수로 설정하고 20분 동안의 발광량의 변화비를 종속 변수 Y로 설정하여 다중 회귀 분석을 수행하였다. ANOVA test한 결과는 Table 5와 같았으며 유의차 5% 이내에서 각 인자의 변수에 대한 회귀 계수는 반응 표면이 곡면을 이루는 2차 모형의 곡선 효과 분석치와 각 물질의 농도간에 상호작용이 있었다. 2차 상관관계를 다중 회귀 분석하여 t-value의 절대값이 1.75 이상인 항은 다중 회귀 분석 모델식에 채택하고 1.75 미만인 항은 기각하였다(Table 6). 독립 변수 중 X_1 항인 sodium alginate의 농도와 상호작용을 나타내는 계수가 기각되어 다음 모델식 $Y=0.60+2.83X_2+16.65X_1^2+19.42X_2^2$ ($r^2=0.99$)을 얻었다(Fig. 5). 다중 회귀 분석 전체에 대한 분산 분석의 결과 다중 상관 계수의 제곱의 합은 1653.3이었으며 자유도와 F-value도 98.8% ($P<0.012$) 유의성을 나타내서 다중 회귀 분석에 의하여 각 변수가 선별되어 설정된 모델식이 98.8% 수준에서 유의성이 있었다. 다중 회귀 분석에 의하여 설정된 모델식을 분석할 때 독립 변수에 대하여 미분하여 해당 독립 변수의 최적값은 나타내는 방법과 3차원 분석 상에서 나타난 종속 변수값이 모든 독립 변수의 최소·최대값에서 나타날 때 3차원 분석의 독립 변수 좌표를 직접 읽어 최적값을 찾는 방법으로

Table 6. Values of regression coefficients calculated for maintenance of bioluminescence test

Independent variables	Parameters		
	Coefficient	Standard error	t-value
CONSTANT	0.60	2.01	0.30
X_1	-2.72	1.59	-1.72
X_2	2.83	1.59	1.78
X_1^2	16.65	1.70	9.78
X_2^2	19.42	1.70	11.40
X_1X_2	1.97	2.25	0.88

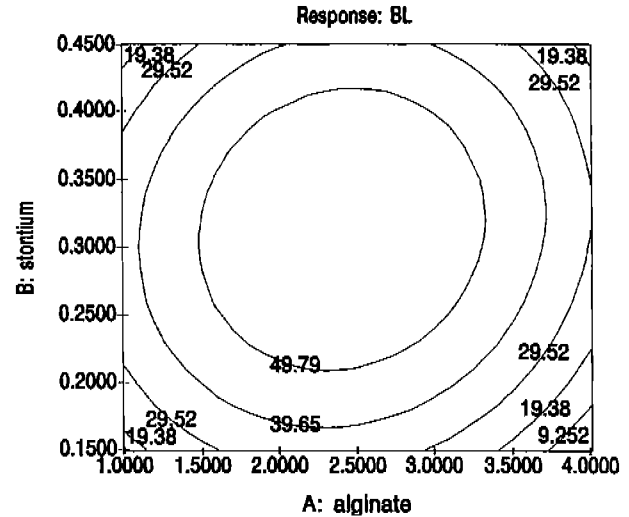


Fig. 6. Contour plots of the maintenance of bioluminescence at sodium alginate concentration(%) and strontium chloride (M), respectively.
The optimum condition of sodium alginate was 2.4%(w/w) and of strontium chloride was 0.31M.

반응 표면 분석법을 수행하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다. 따라서 발광 유지도 면을 고려하였을 때 최적 고정화 농도 조건은 2.4%(w/w)의 sodium alginate와 0.31M의 strontium chloride를 반응시킬 때였다.

Strontium alginate의 고정화 시점

발광 미생물의 고정화 조건 중 중요한 요소로서 고정화되는데 걸리는 시간도 고려해야 한다. Sodium alginate에 strontium chloride를 첨가하면 접촉면부터 반응하면서 strontium 이온이 sodium alginate 용액의 내부로 서서히 침투해가면서 점점 경도가 증가하는데, 이때 sodium alginate의 농도가 너무 높으면 이온 침투 속도가 느려져 완전히 고정화되는데 장시간이 소요되며 발광량은 시간이 지남에 따라 감소하므로 적합하지 않다.

Sodium alginate 용액은 투명한 액체이나 strontium 이온과 반응함에 따라 유백색으로 불투명하게 되는데 이러한 성질을 이용하여 colorimeter를 이용하여 고정화되는 과정을 살펴보았다. Redness나 yellowness는 거의 변화가 없었으므로 명도의 변화를 측정하였고 또한 고정화

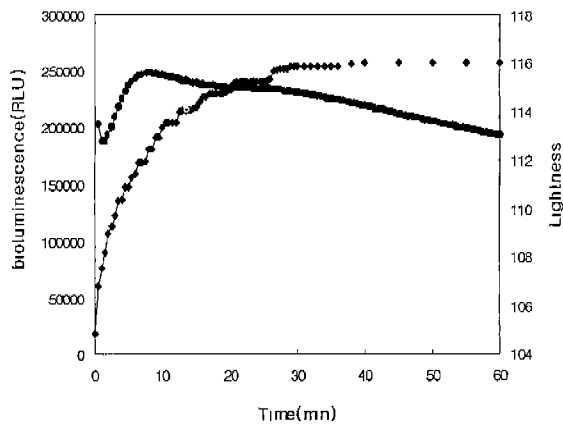


Fig. 7. The profile of bioluminescence and lightness of immobilized cell.

The strontium alginate was used as an immobilization matrix which is composed of 2.4% sodium alginate and 0.31M strontium chloride. The cell concentrations used were between 1.0 and 1.2 measured at O.D₆₆₀. The measuring time of bioluminescence intensity and lightness was every 30s. ◆, lightness; ●, bioluminescence intensity of immobilized cell as immobilization process goes on.

됨에 따라 발광량의 변화를 함께 조사하였다(Fig. 7). Fig. 7은 앞의 실험 결과를 바탕으로 생물 발광 유지도가 가장 좋았던 2.4%(w/w) sodium alginate와 0.31M strontium chloride로 고정화세포의 총 부피가 0.5 mL이 되도록 하였으며 고정화 담체의 형태를 반구형으로 한 것으로 strontium chloride 첨가 직후부터 명도는 점차 증가하다가 30분 정도 지나면 거의 일정하게 유지되었는데 이는 strontium 이온과 alginate의 반응이 진행됨에 따라 명도가 증가하고 결국 일정한 명도를 유지하게 되는 것은 반응이 끝났음을 즉, 완전히 네트워크를 형성하였음을 의미하는 것으로 사료된다. 또한, 발광량은 처음 8분간은 초기 free cell의 발광량보다 증가하였으며 그 이후에는 서서히 감소하여 60분 정도 지난 후에는 초기 발광량 값과 같아져 거의 일정하게 유지되었다. 발광 미생물의 발광현상은 외부 환경에 의하여 두 가지 반응이 기대된다. 첫째는 구성 발현(Constitution Expression) 체계로 세포가 외부 환경의 영향을 받아 안정도가 감소함에 따라 발광량의 생성 역시 감소하는 경우이고, 둘째는 stress에 대한 유도 발현의 경우로 구성 발현과는 반대로 발광량이 증가하는 경우이다. 고정화 과정이 세포에 미치는 stress는 유도 발현을 일으키는 경우로 네트워크 형성에 의해 세포의 안정도가 증가하면 발광량도 회복되어 일정한 값을 유지하는 것으로 생각된다. 따라서 lightness와 발광량의 변화를 살펴보았을 때 strontium chloride 첨가 후 60분 이상이 되면 완전히 고정화되는 것으로 조사되었다. 고정화되는데 걸리는 시간은 sodium alginate의 농도 뿐 아니라 양이나 형태에도 영향을 받는

데 양이 적고 strontium chloride와 접촉면이 넓을수록 빨라진다. 예를 들어 strontium chloride와 접촉하는 면을 일정하게 하고 고정화 세포의 총 부피를 0.2 mL로 하였을 때는 30초 이내에 발광량은 최대값을 가졌고 15분 이상 지났을 때 lightness가 일정하게 유지되어 strontium chloride 첨가 후 15분이면 완전히 고정화되었다. 이 결과는 최대 발광량에 이르는 과정이 단시간에 진행되어 고정화되는 과정을 잘 나타내지 않으며 Fig. 7로 고정화 진행과정을 확인할 수 있으므로 본 논문에는 보이지 않았다.

Strontium alginate의 최적 고정화 농도

발광 미생물의 고정화를 위한 sodium alginate와 strontium chloride의 최적 농도를 선정하기 위하여 고려되어야 할 몇 가지 중요한 요소들 중 경도와 생물 발광 유지도 그리고 고정화되는데 걸리는 시간 등을 들 수 있다. 경도는 농도 증가에 따라 증가하므로 고정화 세포의 반응성이나 고정화되는데 걸리는 시간과 관계가 있다. 발광 미생물의 고정화에서 가장 중요하게 생각되어지는 생물 발광 유지도 면에서 2.4%(w/w)의 sodium alginate와 0.31M의 strontium chloride가 적합하였고 이 때 경도도 어느 정도 유지가 되었으며 완전히 고정화되는데 걸리는 시간도 총 고정화 담체의 부피가 0.5 mL일 경우 60분 이내로 비교적 짧았다. 따라서 생물발광 유지도와 경도, 그리고 고정화되는데 소요되는 시간을 고려했을 때 2.4%(w/w)의 sodium alginate와 0.31M의 strontium chloride가 적합한 농도로 조사되었다.

요 약

고정화 과정 동안에 미생물이 세포의 대사 활성을 유지하는지 또 어느 정도 유지하는지는 매우 중요하며 따라서 고정화 조건의 최적화가 고정화 세포를 이용하기 이전에 반드시 선행되어야 한다. Strontium alginate는 고정화 담체로서 일반적으로 사용되는 물질이며 *P. phosphoreum*을 strontium alginate로 고정하기 위해서는 발광 유지도를 고려하여 주요한 독립 요인인 sodium alginate와 strontium chloride의 농도가 최적화 되어야 한다. 고정화 할 발광 미생물이 가장 높은 발광량을 보인 것은 O.D₆₆₀이 1.0에서 1.2일 때의 세포였다. 또한 최적 성장 상태에 있는 세포를 2.5%(w/v)의 NaCl 용액에 희석한 것이 가장 높은 발광량을 나타내었다. 또한 고정화 물질의 최적 농도를 결정하기 위하여 생물 발광 유지도를 반응 표면 분석법에 의해 분석한 결과 2.4%(w/w)의 sodium alginate에 0.31M의 strontium chloride를 첨가 하였을 때 가장 좋은 생물 발광 유지도를 보였다. 이 때의 경도는 $4.66 \times 10^4 \text{N/m}^2$ 이었으며 고정화되는데 걸리는

시간은 고정화 세포의 총 부피가 0.5 mL일 때 60분 0.2 mL일 때 15분이었다. 따라서 2.4%(w/w)의 sodium alginate에 0.31M의 strontium을 첨가하여 고정화하는 것이 가장 적합한 것으로 생각된다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 교육부 생물화학공학 학술연구조성비(생물화학 96-4-F) 및 공업기술기반 연구비(Project No. 971-327('97.11.1))에 의하여 연구되었습니다.

REFERENCES

- Buyukgungor, H. 1992. Stability and *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in κ -carrageenan gels. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **53**: 1753-1755.
- Chun, U. H., N. Simonov, Y. Chen, and M. L. Britz. 1996. Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Res. Cons. Recyc.* **18**: 25-40.
- 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**: 875-888.
- Knorr, D., S. M. Miazga, and R. A. Teutonico. 1985. Immobilization and permeabilization of cultured plant cells. *Food Technology* Oct. pp. 135-142.
- Lee, J. and U. Chun. 1996. Monitoring of environmental pollutants with *Photobacterium phosphoreum* immobilized on strontium alginate(I)(II). *The Kyung Hee J. of Genet. & Mol. Biol.* **8**: 48-55.
- Leenen, E. J. T. M., V. A. P. Dos Santos, K. C. F. Grolle, J. Tramper, and Rene H. Wijffels. 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Wat. Res.* **30**: 2985-2996.
- Lloyd, D., K. James, J. Williams, and N. Williams. 1981. A membrane-covered *Photobacterium* probe for oxygen measurements in the nanomolar range. *Anal. Biochem.* **116**: 17-21.
- McEldowney, S. 1994. Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H₂ with glass. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2759-2765.
- Nathalia, N. U. and O. V. Lebedeva. 1987. Immobilized bacterial luciferase and its applications. *Appl. Biochem. Biotech.* **15**: 35-51.
- Oh, H. I., S. J. Oh, and J. M. Kim. 1997. Optimization of crude papain extraction from papaya latex using response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**: 509-515.
- Overgaard, S., J. M. Schärer, M. Moo-Young, and N. C. Bols. 1991. Immobilization of hybridoma cells in chitosan alginate bead. *Can. J. Chem. Eng.* **69**: 439-443.
- Sidney, P. C. and O. K. Nathan. 1987. *Immobilization of Living Microbial Cells in Polyacrylamide Gel in Methods in Enzymology*, pp. 198-216, Vol. 135. Academic Press. Inc.

(Received November 12, 1998)