

휘발성 물질에 대한 *Photobacterium phosphoreum*의 Bioluminescence의 변화

이은수 · 이용제 · 김은기¹ · 이정건² · 전역한*

경희대학교 생명과학부 식품공학과, ¹인하대학교 화공 · 고분자 · 생물공학부, ²LG산전(주)연구소

Studies on the Response of *Photobacterium phosphoreum* to the Volatile Substances. Lee, Eun-Su, Yong-Je Lee, Eun-Ki Kim¹, Jeong-Gun Lee², and Uck-Han Chun*. Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea, ¹School of Chemical Engineering and Science, Inha University, Incheon 402-751, Korea, ²Research and Development Center, LG Industrial Systems Co. Ltd., Anyang 431-080, Korea - Various materials including sodium alginate, *k*-carrageenan, collagen and polyacrylamide were studied in order to maintain the stability of bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* for the monitoring of volatile toxic substances. Kinetic parameters of specific rate(μ), and gamma(γ) value were determined for the relationship between bioluminescence of immobilized *P. phosphoreum* and toxic substances. The bioluminescence intensity was found to be proportional to the concentration of toxic substances and the free cells were shown to be more sensitive than immobilized cells when volatile substances were exposed to the cells. Bioluminescence increased slightly after several minutes, which was due to the volatility of toxic compounds. Furthermore, *P. phosphoreum* immobilized on strontium alginate was better than cells immobilized on sodium alginate for the response to substances used.

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

수질에 함유된 독성물질 즉, 중금속을 비롯해서 석유화학 물질 등의 독성정도를 측정하는 것은 용이하지 않다. 분석 화학적 측정 방법으로 정량, 정성 분석이 가능하지만 독성 정도는 정확히 알 수 없으며 또한 숙련된 기술과 시간이 요구된다[11]. 따라서 근래에는 발광미생물(bioluminescent bacteria)을 이용한 수질 오염 물질의 monitoring에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

발광 미생물은 해양 미생물로서 빛을 발하는데 이러한 발광 반응에 관여하는 효소는 luciferase로 알려져 있으며[1] 세포에 유해한 물질에 노출되면 발광 반응 기작에 영향을 주어 bioluminescence의 intensity가 감소한다[3]. 어떻게 독성물질이 발광 반응 기작에 영향을 주는지는 정확하게 밝혀지지는 않았지만 이러한 반응은 빠르고 적은 양에도 민감하게 반응하므로 이 원리를 이용하여 식품이나 수질에 함유된 독성물질을 탐색할 수 있다[2]. 한 예로 식품 중의 mycotoxin의 양을 bioluminescence의 intensity와 관계식을 이용하여 아주 미량까지도 측정하였으며[18], 따라서, 식품 산업에서 우유, 음료수, 급수, 고기, 계란 등의 가공 시 HACCP(Hazard Analysis Critical Control Point) system에의 적용 가능성을 제시하였다[6]. 또한 coliform bacteria를 기존의 방법보다 5배-10배 정도 더 빠르게 탐색할 수 있는 방법이 보고되었다[15].

본 연구에서는 수질 내의 독성 물질을 monitoring하기 위해서 *Photobacterium phosphoreum*을 사용하였으며 이 미생물은 저온에서 생육이 가능하기 때문에 수질의 독성물질 측정에 적합하다. 발광 미생물의 안정성을 유지하기 위하여 고정화 방법을 사용하였으며 일반적으로 세포 고정화에 많이 이용되는 물질로는 다공성의 고분자인 agar, gelatin, *k*-carrageenan[5,16], alginate[2,9], collagen[17], polyacrylamide [12], cellulose[14], chitosan 등이 있다. 본 연구에서는 이들 물질 중 bioluminescence가 용이하게 투과할 수 있는 고정화 물질을 탐색하였고 free cell과 고정화 세포의 독성물질에 대한 반응성을 비교, 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지 조성

본 연구에 이용된 발광 미생물은 *Photobacterium phosphoreum* (KCTC2852) 으로 해양 미생물이므로 NaCl이 함유된 배지를 사용하여 배양하였다. NaCl이 함유된 배지의 조성은 12.5 g/L nutrient broth No.2(4.3 g/L meat peptone, 4.3 g/L casein peptone, 6.4 g/L sodium chloride), 25 g/L sodium chloride, 5 g/L yeast nitrogen base (without amino acid), 3 mL/L glycerol이며 potassium phosphate buffer를 이용하여 pH를 7.0 으로 조절하였다. 액체 배지에서 log phase상태, 즉, OD₆₆₀=0.5~1.0의 균주를 액체 배지에 10% 접종하여 20°C, 100 rpm에서 12~14시간 현탁 배

*Corresponding author
Tel. 82-331-201-2626, Fax. 82-331-2042-8116
E-mail: uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

양하였다.

고정화 물질

최적의 고정화 물질을 선택하기 위하여 gel 형성 방법에 따라 *k-carrageenan*(Sigma Co., U. S. A.), sodium alginate (Hayashi chemical Ltd., Japan), collagen(Sigma Co.), polyacrylamide (BIO-RAD, U. S. A)를 선정하였다. 각 물질의 gel 형성 농도를 제조하여 *P. phosphoreum*을 고정화하고 20분 동안의 bioluminescence의 변화를 조사하였다. 또한, bioluminescence의 안정성을 향상시키기 위하여 모든 고정화 물질은 2.5% NaCl로 제조하였고 세포는 2.5% NaCl로 100배 희석하여 각 물질과 1:9의 비율로 섞어 최종적으로 1000배 희석되도록 고정화하고 총 volume은 200 μ l로 정하여 bioluminescence의 안정성을 알아보았다. Sodium alginate는 2.5%(w/w), *k-carrageenan*은 0.7%(w/w), collagen은 10%(w/w), 그리고 polyacrylamide gel은 acrylamide (BIO-RAD)와 N, N'-methylenebisacrylamide (Bis) (BIO-RAD)를 19:1의 비율로 제조하여 100 μ l, 0.5%의 ammonium persulfate(Sigma Co.) 70 μ l, 50% TEMED (tetramethylethylenediamine) (BIO-RAD) 10 μ l를 혼합하여 gel을 제조하였다.

Bioluminescence의 측정

Free cell(control)인 경우 starter를 10% 접종 후 12~14시간 정도 배양한 세포를 2.5% NaCl 용액으로 10^3 배 희석한 후 luminometer tube에 200 μ l을 취하여 bioluminescence를 측정하였고, 고정화한 세포의 경우는 10^3 배로 희석한 세포를 고정화 물질과 1:9의 비율로 혼합 후 200 μ l 취하여 luminometer(Berthold Lumat LB 9507, Germany)로 측정하였다. Luminometer는 빛의 양에 따라 photocathode로부터 나온 photo electrons가 photomultiplier에 의해 증폭되어 pulse를 유발하는데 이때 생성되는 pulse의 양을 수치로 나타내며 빛의 양과 비례하고 bioluminescence intensity의 단위는 RLU(Relative Light Units)이며 측정 시간은 0.1초이다.

독성물질에 따른 bioluminescence 측정

이 실험에 사용하고자 하는 독성물질은 음용수 수질 기준에 있는 benzene류로서 benzene(D. S. P. GR Reagent, Korea), ethylbenzene(Sigma Co.), xylene (dimethylbenzene, Santoku Chemical Company Ltd., Japan), styrene(ethenylbenzene, Sigma Co.), toluene(methylbenzene, Katayama Chemical, Japan)으로서 이 독성물질들은 물에 잘 녹지 않기 때문에 이 실험에 사용한 독성물질은 methanol(Carlo Erba Reagent S. R. L.)에 용해하여 사용하였다. 또한 bioluminescence가 methanol에도 영향을 받기 때문에 methanol에 의해 영향을 받지 않도록 methanol의 %함량을

총 부피의 1%로 조절하였다.

독성물질과 bioluminescence의 상관 관계 분석

독성물질의 농도가 크면 그만큼 bioluminescence의 변화량도 클 것이라는 가정 하에 specific bioluminescence reduction rate(μ)[3], bioluminescence intensity ratio (I_0/I)[3], 그리고 gamma(γ) value[10]을 이용하여 독성물질 농도와 bioluminescence의 linearity를 조사하였고 EC_{50} 값을 계산하였다.

Specific bioluminescence reduction rate는 일정 시간 동안 bioluminescence의 감소를 나타내는 것으로 다음 식에 의하여 계산할 수 있는데 μ 는 specific bioluminescence reduction rate를 나타내며 t_1 은 초기시간, t_2 는 일정한 시간이고, L_1 , L_2 는 각각 초기(독성물질 첨가하지 않았을 때)와 일정 시간 후에서 측정된 bioluminescence의 intensity이다.

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

그리고 bioluminescence intensity의 ratio는 아래와 같이 나타낼 수 있는데 I_0 은 독성물질을 첨가하지 않았을 때의 bioluminescence intensity이고 I 는 독성물질을 첨가하였을 때의 bioluminescence intensity이지만 이 실험에서는 I 를 독성물질을 첨가한 후 일정 시간 후의 변화한 bioluminescence intensity로 계산하였다. K 는 독성물질에 대한 상수이고 $[Q]$ 는 독성물질의 농도로서 독성물질의 농도와 bioluminescence의 비(I_0/I)의 상관 관계를 알아볼 수 있다.

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

EC_{50} 은 일정 시간 내에 bioluminescence를 50%로 줄이는데 필요한 독성물질의 농도를 말하며 gamma(γ) value를 이용하여 구할 수 있다. Gamma(γ) value는 잔류하는 bioluminescence에 대하여 감소한 bioluminescence의 비이며 다음 식에 의하여 계산할 수 있다.

$$\gamma(t) = \frac{\text{Light Lost}}{\text{Light Remaining}} = \frac{R(t)L(0) - L(0)}{L(t)} = \frac{R(t)L(0)}{L(t)} - 1 \quad (3)$$

$\gamma(t)$ 는 t 시간 동안의 gamma value이고 $R(t)$ 은 t 시간 동안 blank (독성물질을 넣지 않은 시료)의 bioluminescence의 비로 t 시간 후 blank의 bioluminescence intensity를 0시간일 때의 값으로 나누어서 구한다. $L(0)$ 은 0시간에서 시료의 bioluminescence intensity(독성물질을 첨가하기 전)이고 $L(t)$ 은 t 시간 후의 bioluminescence, 즉 독성물질을 첨가하

고 t 시간 동안 변화한 bioluminescence intensity이다. 각 농도에서의 γ 값을 구하여 독성물질의 농도와 γ 값을 log-log graph에 나타내면 직선으로 나타나고 $\gamma=1$ 이 되는 독성물질의 농도가 t 시간 동안의 $EC_{50}(t)$ 이다.

결과 및 고찰

고정화 물질의 bioluminescence 안정성 비교

고정화 물질에 따른 bioluminescence의 안정성을 비교하였다. 예비 실험에 의해서 sodium alginate로의 고정화 시 대체적으로 모든 농도에서 빛 안정성이 좋았으나 농도가 높으면 높은 점도 때문에 고정화 공정이 용이하지 않았다. 따라서 alginate 농도를 2.5%(w/w)로 하여 고정화한 세포의 0시간에서의 bioluminescence의 intensity는 free cell 보다는 다소 낮은 48,000(RLU)이었으나 20분 후에는 free cell 보다 안정성이 향상되어 42,000이 유지되었다. 또한 *k-carrageenan*은 gel 형성 능력이 매우 좋으므로 0.6%의 적은 농도에서도 gel 형성이 가능하며 sodium alginate와 비슷하게 모든 농도에서 bioluminescence의 안정성이 좋았다. 그러나, *k-carrageenan*은 가열 후 냉각되면서 gel이 형성되는 특징을 지니고 있으므로[5] gel이 형성되기 전인 45°C이상의 온도에서 세포와 혼합해야 하며, 따라서 저온균인 *P. phosphoreum*의 bioluminescence 생성 능력에 영향을 끼치는 문제점이 있다. 0.9%이하의 농도에서는 bioluminescence가 안정하게 생성될 뿐만 아니라 낮은 온도에서도 고정화하기가 쉬운 반면 gel의 경도가 너무 낮아 잘 파괴되기 쉽고, 1%이상의 농도에서는 gel의 경도는 좋으나 세포의 빛 안정성에 영향을 미치는 온도에서 고정화하여야 하므로 bioluminescence가 급격히 떨어진다. 따라서 *k-carrageenan*은 저온성인 발광 미생물의 고정화 물질로는 부적합하다.

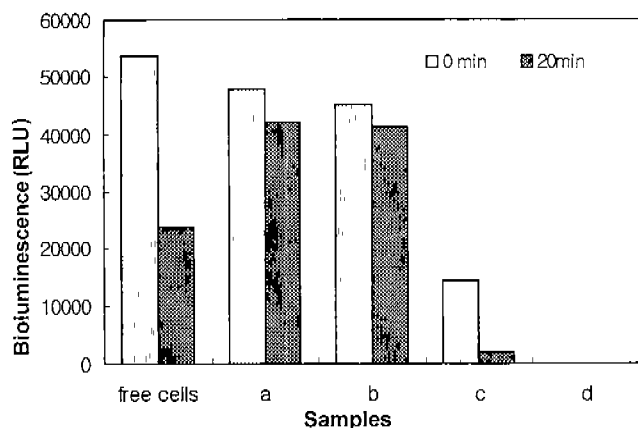


Fig. 1. The bioluminescence intensity of immobilized cells at various immobilization matrixes.

a : *k-carrageenan*(0.7%), b : sodium alginate(2.5%), c : collagen (10%), d : polyacrylamide gel

Collagen은 glutaraldehyde를 첨가함으로써 gel이 형성된다[16]. 본 연구에서 glutaraldehyde를 첨가하여 *P. phosphoreum*을 고정화하였으나 bioluminescence가 급격히 감소하였으며 또한 collagen만 사용하였을 때도 역시 bioluminescence 안정성은 좋지 않았다. 이는 glutaraldehyde가 세포의 호흡과 성장에 영향을 미치는 물질이기 때문에[4] bioluminescence 생성 기작에 저해를 일으킨 것으로 사료된다.

Polyacrylamide는 monomer 상태에서는 독성이 있으나 polymerization이 되면 독성이 없어지는 특성이 있다[12]. 그러나, 완전히 polymerization이 되어 gel이 형성되면 세포를 혼합할 수 없기 때문에 gel이 형성되기 전에 *P. phosphoreum* 세포를 혼합시켜 고정화한 후 bioluminescence의 intensity를 측정하였으나 Fig. 1에서 보듯이 bioluminescence가 측정되지 않았다. 이는 역시 polymer가 아직 형성되지 않은 free radical의 독성 때문에 빛 생성이 저해된 것으로 사료된다. Bioluminescence 생성 저해의 또 다른 원인은 polyacrylamide의 polymerization 중 생성되는 발생열이 저온균의 bioluminescence 생성 기작에 영향을 끼치는 것으로 사료된다. 따라서 polyacrylamide 역시 *P. phosphoreum*의 고정화 물질로는 적합치 않은 것으로 판명되었다.

독성물질과의 반응성 측정

전술하였듯이 저온성 균인 *P. phosphoreum*에 적합한 고정화 물질로 sodium alginate를 선택하였다. 독성물질에 대한 반응성 실험은 세 가지 형태의 세포를 사용하였다. 즉, free cell, sodium alginate 및 strontium alginate 고정화 세포의 독성물질에 대한 반응성을 비교, 분석하였다. Sodium alginate로 고정화한 세포의 견고성을 향상시키기 위해 대부분 Ca^{2+} 과 결합한 calcium alginate를 세포의 고정화에 많이 이용하지만 Ca^{2+} 는 외부의 Na^+ 나 Mg^{2+} 와 치환되어 gel이 분해될 가능성이 있기 때문에[9, 13] Sr^{2+} 과 결합한 strontium alginate로 고정화하기 위해 0.31M $SrCl_2$ 를 사용하였다[8]. 세포와 고정화 물질은 1:8의 비율로 고정화하였다.

Free cell인 경우 20분 동안 benzene, ethylbenzene, styrene, xylene, 그리고 toluene을 각각 free cell에 노출시킨 후 bioluminescence의 변화를 측정하였다. Fig. 2는 free cell에 대한 독성 반응 결과이다. 독성물질을 첨가한 후 bioluminescence가 급격히 감소하기 시작하였는데 각각의 독성 물질 농도가 클수록 감소하는 bioluminescence의 양도 커졌다. 그러나 시간이 지나면서 bioluminescence가 어느 정도 증가하였는데 이는 본 실험에 사용한 독성물질들이 휘발성이 매우 강하고 세포의 희석용액으로 사용한 2.5% NaCl 용액과 섞이지 않으므로 측정 시간동안 독성물질이 휘발하여 bioluminescence생성 체계가 회복된 것으로

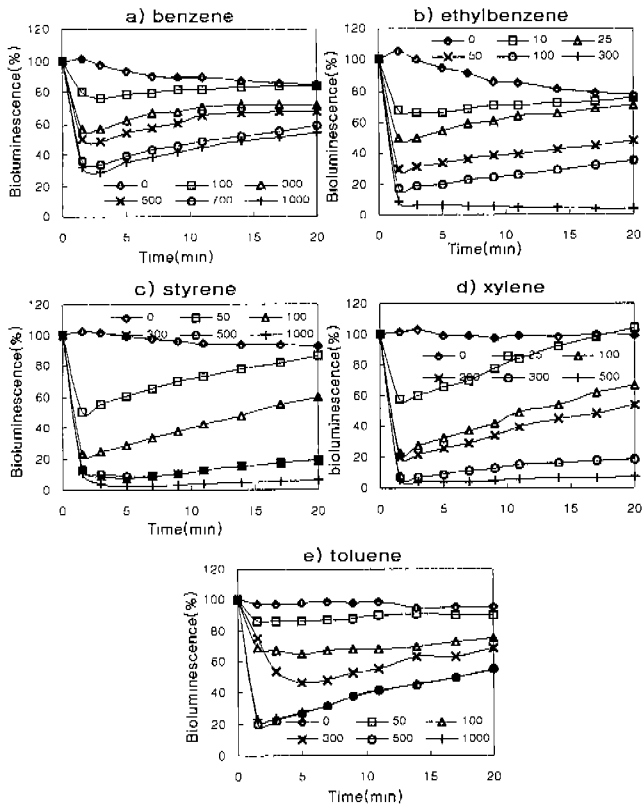


Fig. 2. The change in bioluminescence of free cells with various toxic substances ; a) benzene, b) ethylbenzene, c) styrene, d) xylene, e) toluene. The concentration unit of toxic substances is ppm.

로 사료된다.

*P. phosphoreum*을 sodium alginate와 strontium alginate로 고정화하여 benzene, ethylbenzene, styrene, xylene, toluene에 대한 반응성에 대한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 일반적으로 독성물질들의 휘발성에 따른 bioluminescence의 재생성은 free cell에 비해서 현저히 감소하였다. 따라서 free cell보다도 농도에 따른 bioluminescence 반응성이 개선되었으며 특히, sodium alginate보다는 strontium alginate에 고정화한 세포에서의 휘발성은 나타나지 않았다.

이들 물질들의 독성정도를 보면 free cell인 경우 ethylbenzene이 5 가지 물질 중 독성이 가장 강하고 다음으로 xylene, styrene, toluene, benzene순으로 독성정도가 나타났다(Fig. 2). 이 독성정도는 측정 시간이 지나면서 독성물질들의 휘발성으로 인하여 bioluminescence의 intensity가 다시 복원되므로 초기 bioluminescence intensity를 비교하였다. 이 결과는 sodium alginate와 strontium alginate 고정화 세포에 대한 독성 정도와 비교하여 같은 양상을 보였다(Fig. 3). 그러나, free cell의 경우 고정화 세포보다 민감성은 우수하지만 이와 같이 독성물질이 휘발성을 가진 경우 bioluminescence가 불안정하며 4°C에 저장할 경우 고정

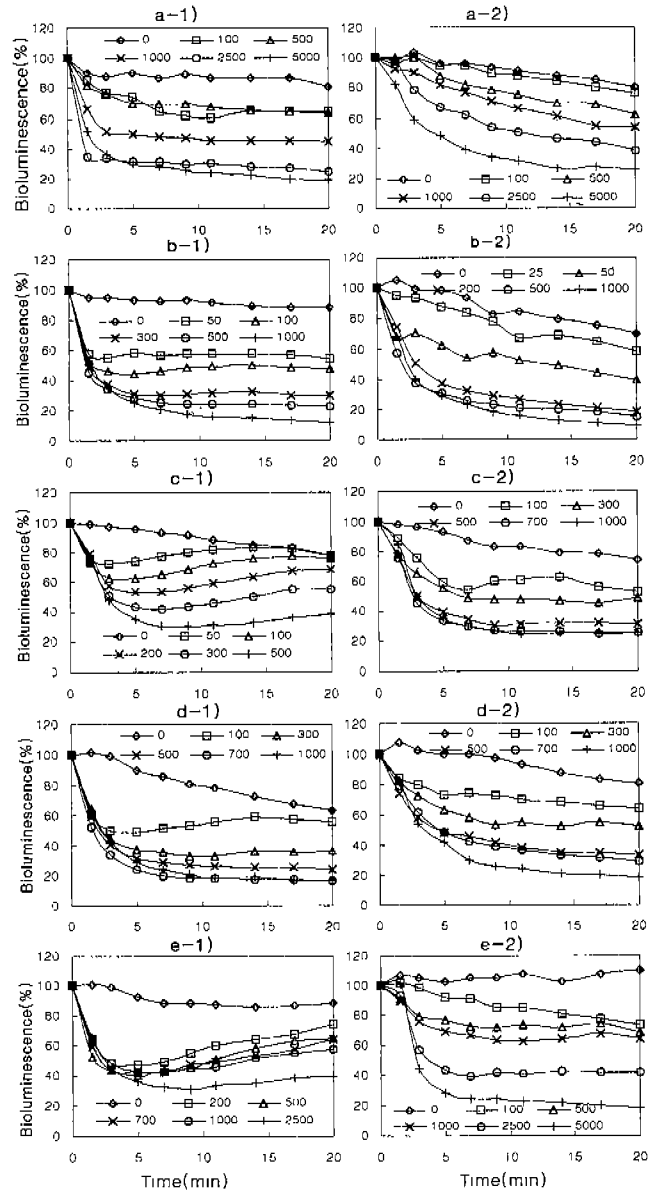


Fig. 3. The change in bioluminescence of immobilized cells on both 1) sodium alginate and 2) strontium alginate with various toxic substances ; a) benzene, b) ethylbenzene, c) styrene, d) xylene, e) toluene. The concentration unit of toxic substances is ppm.

The concentration unit of toxic substances is ppm.

화 세포보다 저장기간이 짧기 때문에 고정화 세포의 이용이 적합하다.

Bioluminescence와 독성물질과의 상관관계

독성물질에 대한 bioluminescence의 변화를 분석하기 위하여 specific rate(μ), bioluminescence intensity ratio (I_0/I), 그리고 γ value를 이용하였다. 일정 시간 동안의 bioluminescence의 감소를 나타내는 specific rate는 독성물질 농도가 증가함에 따라 비례하여 linearity를

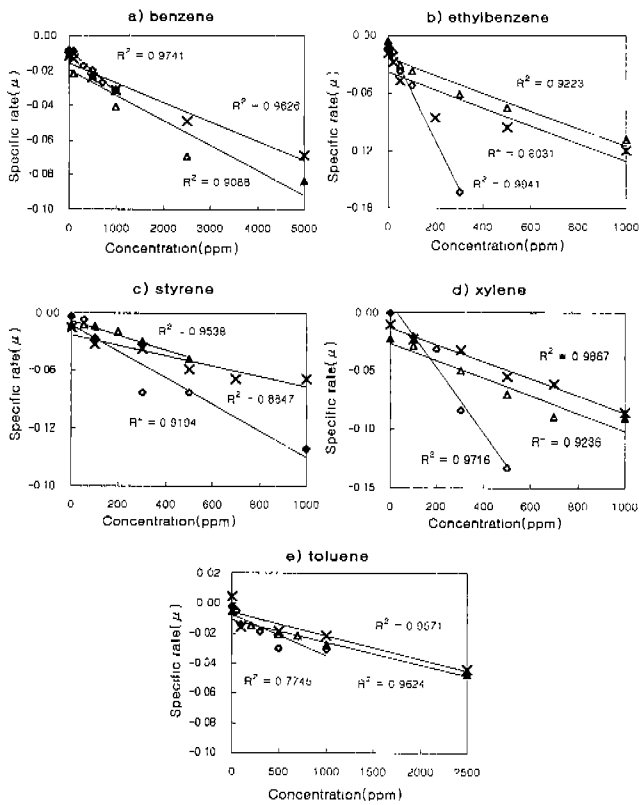


Fig. 4. The specific rate(μ) of various toxic substances ; a) benzene, b) ethylbenzene, c) styrene, d) xylene, e) toluene. The relationship between concentration of toxic substances and specific rate shows linearity. (\diamond), free cells; (\triangle), immobilized cells with sodium alginate; (\times), immobilized cells with strontium alginate.

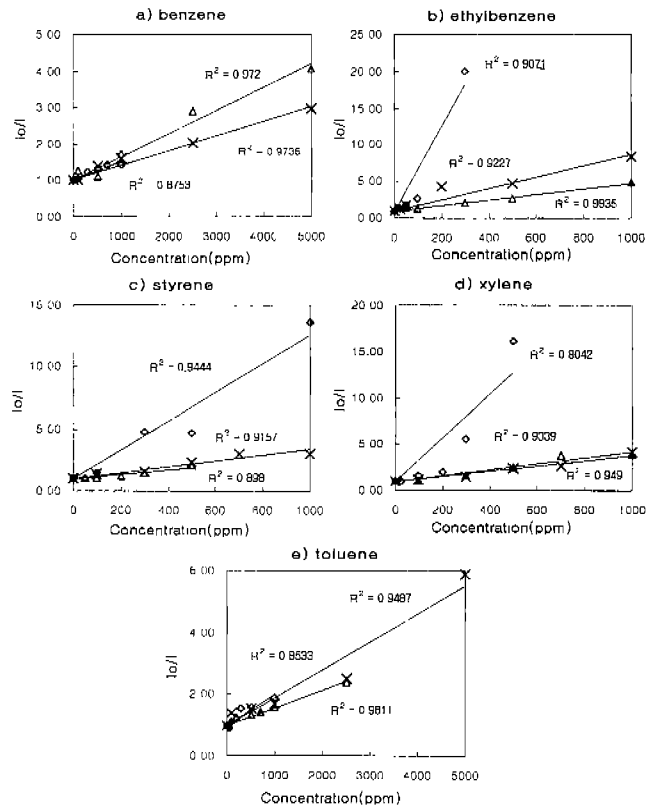


Fig. 5. The ratio of bioluminescence intensity (I_o/I) in various toxic substances ; a) benzene, b) ethylbenzene, c) styrene, d) xylene, e) toluene. The ratio of bioluminescence intensity (I_o/I) is proportional to concentration of toxic substances. (\diamond), free cells; (\triangle), immobilized cells with sodium alginate; (\times), immobilized cells with strontium alginate.

Table 1. EC_{50} of each toxic substance of free cells, and immobilized cells with sodium alginate and strontium alginate at 5 min, 11 min, and 20 min

Toxic substances	EC_{50}								
	Free cells			Immobilized cells with sodium alginate			Immobilized cells with strontium alginate		
	5 min	11 min	20 min	5 min	11 min	20 min	5 min	11 min	20 min
Benzene	607.95	1025.16	1117.94	1520.92	1153.07	1147.94	5389.62	2752.82	2167.07
Ethyl-benzene	27.08	43.09	76.38	101.92	114.52	107.85	183.59	109.34	98.06
Styrene	58.65	100.13	182.41	244.01	317.17	471.98	334.17	323.88	385.32
Xylene	51.23	95.16	159.83	138.60	239.31	389.07	577.60	364.31	386.49
Toluene	269.04	454.55	975.87	210.86	1055.15	2165.57	1757.32	1076.64	752.85

보였으며(Fig. 4) bioluminescence intensity ratio(I_o / I) 역시 독성물질 농도에 따라 비례하였다(Fig. 5). 특히, EC_{50} 을 산출하기 위해 독성물질의 농도와 bioluminescence간의 관계를 gamma(γ) value를 이용하여 log-log graph로 나타내어 직선의 관계식을 구하였다(Fig. 6). 즉, γ value가 1일 때의 독성물질의 농도가 EC_{50} 이다. EC_{50} 은 일정 시간동안 bioluminescence가 50% 감소하는데 필요한 독성물질의 농도를 나타내는데 EC_{50} 이 클수록 독성물질의 독성 정도가

약하다는 것을 의미하며 Table 1에 정리하였듯이 ethylbenzene이 가장 독성이 강하고 다음이 styrene, xylene이고 toluene과 benzene이 독성이 가장 약한 물질로 free cell이나 고정화 세포 모두 같은 결과를 보였다. 이 결과는 Fig. 2와 Fig. 3의 dynamic response curve와도 일치하였다. 또한 5분, 11분, 20분 동안의 EC_{50} 을 각각의 독성물질에 대하여 산출하였으며 같은 종류의 독성물질에서는 EC_{50} (5 min) 값이 EC_{50} (20 min)보다 높아야 하지만 free

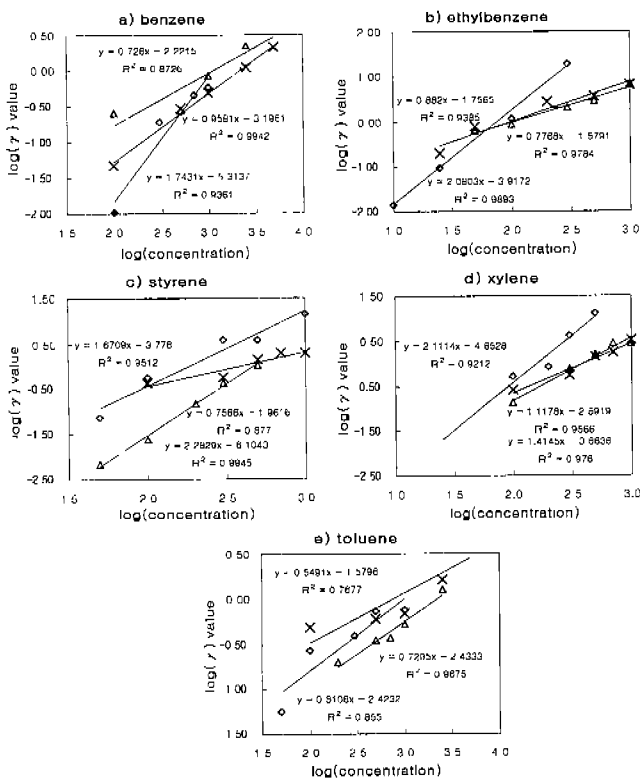


Fig. 6. The gamma(γ) value of various toxic substances ; a) benzene, b) ethylbenzene, c) styrene, d) xylene, e) toluene. The specific equation between log concentration of toxic substances and the log gamma value was established and calculated EC₅₀. (◇), free cells; (△), immobilized cells with sodium alginate; (×), immobilized cells with strontium alginate.

cells와 sodium alginate로 고정화 한 세포에서 그렇지 않은 이유는 사용한 benzene류의 독성물질이 휘발성이 강하므로 시간이 지남에 따라 휘발하여 독성 정도가 감소하였기 때문인 것으로 사료된다. 그러나, strontium alginate로 고정화 한 세포에서는 EC₅₀(5 min)값이 EC₅₀(20 min)값보다 높은 값이 측정되었으며 이는 strontium alginate에 침투한 휘발성 물질의 유실이 감소되었기 때문으로 사료된다. 따라서, sodium alginate보다 strontium alginate로 고정화하여 경도를 부여한 세포가 휘발성 독성물질에 대해 민감하게 반응하였다.

요 약

휘발성 독성 물질 측정용 *P. phosphoreum*의 고정화 물질 선택을 위하여 4 가지의 고정화 방법에 따라 각각 고정화 물질 한가지씩을 선택하여 *P. phosphoreum*을 고정화 하여 독성물질에 대한 반응성을 조사한 결과 sodium alginate에서 bioluminescence를 안정되게 유지하였다. Sodium alginate로 고정화한 세포의 독성물질과의 반응성

조사 결과 각각의 독성물질마다 특이한 linearity 관계식이 설정되었고 이를 이용하여 EC₅₀을 계산할 수 있었다. 따라서 휘발성 독성물질에 대해서 free cell보다는 고정화한 세포가 더 민감하게 반응하였고 sodium alginate 고정화 세포보다는 strontium alginate로 고정화한 세포가 민감한 반응을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1998년도 공업기술기반 연구비 (Project No. 971-327) ('97.11. 1)에 의하여 연구되었습니다.

REFERENCES

1. Baker, J. M., M. W. Griffiths, and D. L. Collins-Thompson. 1992. Bacterial bioluminescence : Applications in food microbiology. *J. Food Protect.* **55**(1): 62-70.
2. Britz, M. L., N. Simonov, and U.-H. Chun. 1997. Immobilized luminescent cell-based flow through monitoring of environmental pollutants. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**(4): 250-257.
3. Britz, M. L., N. Simonov, and U. -H. Chun. 1997. Stabilization of bioluminescence of immobilized *Photobacterium phosphoreum* and monitoring of environmental pollutants. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**(4): 242-249.
4. Brodelius, P. and K. Mosbach. 1982. Immobilized plant cells. *Adv. Appl. Microbiol.* **28**: 1-26.
5. Chibata, I., T. Tosa, T. Sato, and I. Takata. 1987. Immobilization of cell with carrageenan, pp. 189-198. In K. Mosbach (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 135. Academic press, Inc.
6. Griffiths, M. W. 1996. The role of ATP bioluminescence in the food industry : New light on old problems. *Food Tech.* **6**: 62-72.
7. Knorr, D., S. M. Miazga, and R. A. Teutonico. 1995. Immobilization and permeabilization of cultured plant cells. *Food Tech.* **10**: 135-142.
8. Lee, H. -J., H. -S. Kim, K. -H. Chung, E. -S. Lee, and U. -H. Chun. 1999. Optimization of the condition of immobilized *Photobacterium phosphoreum* with strontium alginate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**(2): 136-144.
9. Leenan, E. J. T. M., V. A. P. Dos Santos, K. C. F. grolle, J. Tramper, and R. H. Wijffels. 1996. Characteristics and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Wat. Res.* **30**(12): 2985-2996.
10. Mallak, F. P. and R. L. Brunker. 1984. Determination of the toxicity of selected metalworking fluid preservatives by use of the microtox system and an *in vitro* enzyme assay, pp. 65-76. In D. Liu and B. J. Dutka (eds), *Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems*. Marcel Dekker, Inc., New York.
11. Ramanathan, S., M. Ensor, and S. Daunert. 1997. Bacterial

- biosensors for monitoring toxic metals. *Trends Biotech.* **15**(12): 500–506.
12. Skryabin, G. K. and K. A. Koshcheenko. 1987. Immobilization of living microbial cells in polyacrylamide gel, pp. 198–216. In K. Mosbach (ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 135. Academic press, Inc.
 13. Smidsrød, O. and K. G. Skjåk-Br 1990. Alginate as immobilization matrix of cells. *Trends Biotech.* **8**(3): 71–78.
 14. Szajáni, B., Z. Buzás, K. Dallmann, I. Gimesi, J. Krisch, and M. Tóth. 1996. Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 122–125
 15. Tanaka, H., T. Shinji, K. Sawada, Y. Monji, S. Seto, M. Yajima, and O. Yagi. 1997. Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria. *Wat. Res.* **31**(8): 1913–1918.
 16. Tosa, T., T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida, and I. Chibata. 1979. Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotech. Bioeng.* **21**: 1697–1709.
 17. Vieth, W. R. 1994. *Bioprocess Engineering : Kinetics, Mass Transport, Reactors and Gene Expression*, pp. 52–60. John Willey and Sons, Inc.
 18. Yates, I. E. and J. K. Porter. 1982. Bacterial bioluminescence as a bioassay for mycotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1072–1075.

(Received October 4, 1999)