

## CMC 고정화 *Photobacterium phosphoreum*의 생체발광량을 이용한 독성농도(EC<sub>50</sub>)의 QSAR 모델

이용제·허문석·이우창·전억한  
경희대학교 생명과학부 식품가공학과, <sup>1</sup>LG산전(주)연구소  
(접수 : 2000. 6. 9., 게재승인 : 2000. 6. 20.)

## QSAR Modeling of Toxicant Concentrations(EC<sub>50</sub>) on the Use of Bioluminescence Intensity of CMC Immobilized *Photobacterium phosphoreum*

Yong-Je Lee, Mun-Seok Her, Woo-Chang Lee<sup>1</sup>, and Uck-Han Chunt

Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea

<sup>1</sup>R&D Center, LG Industrial Systems Co., Ltd., Anyang, Kyungido 431-080, Korea

(Received : 2000. 6. 9., Accepted : 2000. 6. 20.)

Concern for the effects of toxic chemicals on the environment leads the search for better bioassay test organisms and test procedures. *Photobacterium phosphoreum* was used successfully as a test organism, and the luminometer detection technique was an effective and simple method for determining the concentration of toxic chemicals. With EC<sub>50</sub> a total of 14 chlorine substituted phenols, benzenes and ethanes were used for the experiments. The test results showed that the toxicity to *P. phosphoreum* increased in the order of phenol > benzene > ethane and the toxicity also increased with the number of chlorine substitution. Quantitative structure activity relationship (QSAR) model can be used to predict EC<sub>50</sub> to save time and endeavor. Correlation was well established with the QSAR parameters, such as log P, log S and solvatochromic parameter(Vi/100,  $\pi^*$ ,  $\beta$  m and  $\alpha$  m). The QSAR modeling was used with multi-regression analysis and mono-regression analysis. These analyses resulted in the following QSAR : log EC<sub>50</sub> = 2.48 + 0.914 log S (n=9, R<sup>2</sup>=85.5%, RE = 0.378), log EC<sub>50</sub> = 0.35 - 4.48 Vi/100 + 2.84  $\pi^*$  + 9.46  $\beta$  m - 4.48  $\alpha$  m ( n = 14, R<sup>2</sup> = 98.2%, RE = 0.102 ), log EC<sub>50</sub> = 2.64 - 1.66 log P ( n = 5, R<sup>2</sup> = 98.8%, RE = 0.16), log EC<sub>50</sub> = 3.44 - 1.09 log P ( n = 9, R<sup>2</sup> = 80.8%, RE =0.207).

**Key Words :** *Photobacterium phosphorium*, EC<sub>50</sub>, Quantitative Structure Activity Relationship(QSAR) bioluminescence

### 서론

과거의 산업폐수처리는 산소를 소비하는 오염물질의 감소에 관심을 기울여 왔으나, 최근에는 화학물질이 수계에 미치는 독성정도가 얼마나 큰지에 관련된 것이 첨가되었고, 특히 산업폐수에 함유되어있는 화학물질에 관한 독성을 이해한다는 것은 수질정화의 중요한 정보가 될 수 있다. 효과적으로 화학독성을 처리하고 조절하기 위해서는 화학물질이 함유되어있는 독성강도를

아는 것이 선행되어야 하고 독성물질의 양을 탐지하는 방법은 수중환경을 보존하기 위해선 필수적이다. 미국의 Worldwatch Institute에서 추정하기로는 매일 70,000가지의 합성화학물질들이 매일 사용되어지고 있으며, 500~1000가지의 새로운 화학물질들이 매년마다 증가되고 있다고 한다. 그러나 대략 79%의 상용화하고 있는 화학물질들의 독성영향에 대한 정보가 데이터화 되어 있지 않은 실정이다(1).

수계의 환경보호를 위해 폭넓고 다양한 유독물질의 영향에 대한 독성시험이 필요하고 이러한 독성의 생물학적 정량(bioassay)이 필요하다. 독성시험에는 여러 가지 방법이 있으며 기존 동물과 어류를 이용하여 실험한 LD<sub>50</sub> (Lethal dose), LC<sub>50</sub> (Lethal concentration), IC<sub>50</sub> (Inhibition concentration)등이 대표적인 것들이다(2). 또한 독성강도를 정확히 알기 위한 방법으로 발광미생물 (luminescent bacteria)인 *Photobacterium phosphoreum*을 이용

\*Corresponding Author : Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

Tel : 0331-201-2626, Fax : 0331-204-8116

E-mail: uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

하여 독성이 없는 공시료와 독성노출시료를 비교하였을 때 50%의 생체발광이 저하되는 농도인  $EC_{50}$  (estimated chemical concentration)을 구하는 테스트가 진행중이다(3). *P. phosphoreum*을 이용한 독성시험에서 세포고정화는 정해진 공간 안으로 미생물의 이동을 제한하는 것으로 높은 생체발광의 안정성을 유지할 수 있으며, 미생물의 재사용이 가능하여 독성시험에 적합하다(4). 세포 고정화물질 중 Carboxymethylcellulose (CMC)는 cellulose의 유도체로서 세포용화에 적합하고, 세포방출을 조절하는데 잘 이용되어지며, 생리학적으로 비활성인 polysaccharide로 보고되어지고있으므로(5) *P. phosphoreum*의 생체발광을 유지하기 위한 고정화에 적합하다.

독성정량에 있어 많은 수의 독성화합물의  $EC_{50}$ 값을 산출해 내기 위해서는 많은 시간이 소비되며 이같은 문제점을 해결하기 위한 도구들이 필요로 하게 되는데 이러한 방법 중의 하나가 Quantitative structure activity relationship (QSAR) 모델링이다(6). QSAR은 독성화합물들이 갖는 parameter의 변화에 동반되는 독성의 변화를 예측할 수 있으며, QSAR 모델 방법은 물리화학적 구조의 생물학적 활성사이의 통계상의 관계로 시도된다(7). Zhao(8)등은 organic acid와 base에 대한 독성강도를 물벼룩 (*Daphnia magna*), 새우(Carp), *Photobacterium phosphorum*을 이용하여  $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$  값을 분자연결지수('X')와 octanol/water 분할계수와의 관계식을 QSAR방법으로 예측하였고, Sun(9)등은 활성슬러지법을 이용하여 유기화합물의 독성강도를  $IC_{50}$ 값으로 예측하였다. 또한 Cronin (10)등은 *Tetrahymena pyriformis*를 이용하여 Nitrobenzene의 독성강도를 예측하는데 QSAR 모델을 사용하는 등 독성물질의 생물학적 정량을 위한 QSAR 모델링 연구가 진행되어지고 있으나 국내에서는 소수의 연구가 진행중이다.

QSAR 모델에 있어서 독성화합물의 독성강도와와의 관계는 독성화합물이 갖는 액상용해도(log S), octanol/water 분할계수 (log P 또는 log Kow), solvatochromic parameter ( $V_i/100$ ,  $\pi^*$ ,  $\beta_m$ ,  $\alpha_m$ )의 물리화학적 특성간의 상호관계를 이용한다(11). 세포내로 독성물질이 침투하기 위하여 화학물질은 우선 세포의 지질막을 통해 확산되어야 하고 독성물질이 세포막을 통하여 확산되는 능력은 지질상의 막과 세포 외부의 친수성상 사이의 용해비로 표현되며 octanol/water 분할계수 (log P)는 화학물질이 용해되어 있는 수계에 의해 둘러싸여 있는 지질막과 유사한 수소성의 octanol상을 액상으로 나눈 ratio 값으로서 여러종류의 화학물질이 다른 여러 형태의 생물학적 반응과의 연관성을 예상하는데 자주 사용된다(12). 또한 독성물질이 갖는 물리화학적 solvatochromic parameter중  $V_i$ 은 용질의 몰부피이며,  $\pi^*$ 는 용매의 polarity-polarizability,  $\beta_m$ 은 용매의 수소결합받게 염기도 (hydrogen bond acceptor basicity) 및  $\alpha_m$ 은 용매의 수소결합 주게 산도(hydrogen bond donor acidity)와의 다중회기분석에 의한 QSAR은 실험을 하지 않고 독성강도의 예측값을 제공함으로써 독성강도의 생물학적 정량에 사용되어질 수 있다(13).

본 연구에서는 독성물질의 생물학적 정량을 목적으로 유기화합물 중에 환경독성으로 지정된 aliphatic, benzoic 및 phenolic toxicant로 대표되는 ethane, benzene 및 phenol류에 chlorine이 치환된 총 14개 독성에 대한 생물학적 정량에 있어  $EC_{50}$ 값을 이용하였고, 각 그룹의 독성에 대한 독성강도( $EC_{50}$ 값)를 예측하기 위하여 독성이 갖는 물리화학적 특징인 log P, log S, solvatochromic parameter를 이용하여 QSAR 모델링을 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 실험에 사용된 발광미생물 (luminescent bacteria)은 *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852이며 대전 생명공학연구소 유전자 은행으로부터 분양 받아 NaCl 배지에 계대배양하여 사용하였다. NaCl 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 (Duksan Co. Ltd., Korea) 25.0 g/L, yeast nitrogen base (without amino acid) (Sigma Co. U.S.A) 5.0 g/L 및 glycerol (Difco Co. U.S.A) 3.0 ml/L이며 0.2 M potassium phosphate buffer를 이용하여 pH 7.0 로 보정한 후 삼각플라스크에 10 mL씩 분주하여 고압멸균(121°C, 15분)하여 사용하였다.

### 세포의 농도와 생체발광량 측정

고체 NaCl 배지에 접종한 *P. phosphoreum*을 4일 동안 20°C 진탕배양기 (Hanbaek Scientific Co., Korea)에서 배양시켜 얻은 지름 1mm colony를 액체 NaCl 배지에 접종하여 12시간 배양시킨 균주를 10ml의 액체 NaCl 배지에 10%(v/v) 접종하였고, 무점종 NaCl 배지를 기준시료로 하여 시간 당 균의 성장을 10%(v/v)접종된 배지의  $10^2$ 배 희석시킨 시료 1ml를 일회용 cuvette (Stockwell Co. 2400, U.S.A)에 취한 후 UV/VIS-Spectrophotometer (Shimadzu UV-1201, Japan)를 이용하여 660 nm의 흡광도에서 균의 성장을 관찰하였다. 균의 성장에 따른 생체발광량을 luminometer tube (5 mL, 12×75 mm pyrex tube, Canada)를 이용하여 luminometer (Berthold lumet LB 9507, Germany)로 측정하였으며 발광량의 단위는 RLU (Relative Light Unit)로 나타내었다.

### 세포의 고정화

세포를 고정화하기 위한 담체로는 이등(3)이 연구한 1.0% Carboxymethylcellulose sodium salt (CMC) (Wako pure Chemical Industries, Japan)를 사용하였으며, 이를 증류수로 녹인 다음 고압멸균 (121°C, 15분)하여 사용하였다. 1.0% CMC 담체에 물리적 흡착법에 의한 고정화 방법을 사용하였으며, 측정용 luminometer tube에 상대점도 22.06을 가지는 졸(sol) 상태로 하여 CMC 담체 8 : *P. phosphoreum* 세포 1 의 비율로 90  $\mu$ L를 고정화 후 초기 적응기를 거친 3시간 후에  $38 \times 10^4$ (RLU)의 생체 발광량을 유지하는 것을 사용하였다.

### 독성물질 선정

독성물질의 선정은 서로 연관성이 있는 것을 선택하여야 한다. 본 실험에서는 환경공해물질로 지정된 aliphatic toxicant인 ethane, benzoic toxicant인 benzene 및 phenolic toxicant에 0~6개의 chlorine이 치환된 화합물을 선정하였으며 이는 QSAR 모델식을 산출해 내기 위함이다. 사용한 독성물질은 다음과 같다. 1,2-dichloroethane, 1,1,1-trichloroethane, 1,1,2,2-tetrachloroethane, hexachloroethane, benzene, chlorobenzene, 1,2-dichlorobenzene, 1,4-dichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, phenol, 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol 및 pentachlorophenol 로 총 14가지 독성물질을 Sigma Co. U.S.A에서 구입하여 사용하였다.

**용매농도결정**

Ethane, benzene 및 phenol은 물에 녹지 않으므로 용매로서 ethyl alcohol (Duksan Pure Chemical Co. LTD., Korea) 을 사용하였다. Ethyl alcohol 역시 생체발광을 저하시키는 영향을 미치므로 최소로 생체발광에 영향을 미치는 희석농도를 구하여야 한다. 10~60% (v/v) ethyl alcohol 용액을 90 μL의 1.0% (w/v) CMC 담체에 고정된 세포에 각 농도별 ethyl alcohol 수용액 10 μL을 혼합하여 결과적으로 10배 희석시킨 1.0~6.0% (v/v) ethyl alcohol이 24분 동안 생체발광량에 미치는 영향을 조사하였다.

**생체발광량 측정**

측정용 시료는 luminometer tube에 10 μL를 총 부피로 하였을 때 1.0% CMC고정화 세포 : 독성물질의 비를 9 : 1 로 하여 10분동안 생체발광량의 저하된 RLU값을 이용하여 측정하였으며 10분에 측정된 값을 EC<sub>50</sub> 산출에 이용하였다. 기준시료에는 독성물질의 용매인 1.0%(v/v) ethyl alcohol을 같은 부피로 하여 생체발광량을 측정하였다.

**결과분석**

EC<sub>50</sub>값은 일정시간 독성에 노출시켰을 때 생체발광량이 50% 감소되는 독성성분의 농도를 말하는 것으로 Gamma(γ) 값을 이용하여 구할 수 있다. γ값은 일정시간동안에 측정되는 생체발광량에 대한 감소한 생체발광량의 비율로 EC<sub>50</sub>값은 γ 값이 1.0 이 되었을 때의 값이다. 독성화합물의 각 농도에 대한 생체발광량의 감소값을 10분동안의 γ 값을 구하여 독성화합물의 log 농도와 log γ 값을 이용하여 log - log 그래프를 이용하여 EC<sub>50</sub>값을 산출하였다(14)

① EC<sub>50</sub> 값

EC<sub>50</sub>을 구하기 위하여 γ 값을 산출하였다. r 값이 1이 되었을 때가 EC<sub>50</sub>값이며 γ 값은 (1)식으로 구하였다.

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

$$= \frac{R(t)L(0)}{L(t)} - 1$$

γ(t)는 t 시간에 대한 γ 값을, R(t)는 t 시간에 대한 기준시료의 값으로, 기준시료의 최초 생체발광량에서 마지막 생체발광량을 을 나눈 값을, L(0)는 독성을 첨가하지 않았을 때의 생체발광량을, L(t)는 t 시간독성물질에 노출 후 생체발광량을 나타낸다.

② EC<sub>50 liq</sub> 값

Ethane, benzene 및 phenol은 휘발성물질이고 CMC에 고정화된 P. phosphoreum의 생체발광의 활성에 저해를 일으키는 것은 용매인 1.0% ethyl alcohol 상에 남아있는 독성물질로써 액상에서의 EC<sub>50</sub>값을 환산하여야 하며 (2)식으로 구하였다(13).

$$EC_{50 liq} = \left( \frac{1}{H \frac{V_g}{V_{liq}} + 1} \right) EC_{50} \quad (2)$$

EC<sub>50 liq</sub> 는 액상의 EC<sub>50</sub> (mg/L)를, H는 헨리상수를, V<sub>g</sub>는 gas

상의 부피(ml)를, V<sub>liq</sub>는 액상에서의 부피(ml)를 나타낸다.

③ 비이온화 EC<sub>50</sub> 값

독성의 이온화되지 않는 부분에 의한 EC<sub>50</sub>값의 산출은 (3)식으로 보정하였다.

$$\text{un-ionized EC}_{50} = \frac{10^{\text{pKa}-\text{pH}}}{(1 + 10^{\text{pKa}-\text{pH}})} EC_{50 liq} \quad (3)$$

pKa는 이온화 상수를, pH는 각 독성의 EC<sub>50</sub> 값에 해당하는 최종 pH값이다.

**QSAR 모델링**

QSAR은 computer를 이용한 1차회기분석과 다중회기분석을 반복하고 독성물질 전체와 개개분류별로 측정된 modified EC<sub>50</sub> 값 대 예상 EC<sub>50</sub>값을 비교해 봄으로써 서로의 상관관계를 유도할 수 있다.

QSAR상관관계 분석에서 독성의 휘발성과 이온화로 산출된 EC<sub>50</sub>값의 mg/L 단위를 분자나 기능 그룹을 비교하기 위해 mM/L 단위로 환산하여 사용하였고, P. phosphoreum을 이용한 14 가지 독성에 대한 EC<sub>50</sub>값과 각 독성의 octanol/water 분할계수 (log P), 액상 용해도(log S) 및 solvatochromic parameters ( Vi/100, π\*, βm, αm )에 대한 QSAR을 Minitab 13 Version (Minitab Inc., U.S.A) 프로그램을 이용하여 다중회기분석과 QSAR 회기식의 검증을 위한 ANOVA test를 하였다.

**결과 및 고찰**

**Phosphoreum의 성장률(O.D) 와 생체발광량의 관계**

Chlorine이 치환된 phenol, benzene 및 ethane의 독성 측정에 사용되는 P. phosphoreum의 성장상태와 생체발광(bioluminescence)의 관계를 실험하여 독성측정에 가장 밝고 안전한 생체발광을 할 때의 세포농도를 구하는 것이 선행되어야 하고 Fig. 1에 도시하였다. 균의 성장은 12시간 경과되었을 때 O.D<sub>660</sub>값이 1.917로 안정기 (stationary phase)에 접어 들었고, 생체발광량은 9 시간 경과되었을 때 가장 높은 391972 (RLU)발광량이 측정되었다. 10시간에서 14시간사이 생체발광량이 385136~332584 (RLU)로 점차 감소하였다. 균성장에 따른 생체발광의 저하는 균체수의 증가에 따른 발광의 흡수 및 한정된 영양상태에서 영양소 감소로 인한 발광에 필요한 ATP가 부족하기 때문이다(15). 독성측정을 위한 균체농도로서 생체발광이 가장 높고, 감소량이 적은 O.D<sub>660</sub> 1.70~ 1.90 사이 균체농도값을 갖는 8~10 시간 배양한 균을 독성물질 측정에 사용하였다.

**Ethyl alcohol %(v/v)농도결정**

측정하고자 하는 ethan, benzene 및 phenol은 물에 녹지 않으므로 용매로서 ethyl alcohol을 사용하였지만 2.5% NaCl 수용액에서 가장 안전한 생체발광을 하는 P. phosphoreum에 영향을 미치지 않는 용매농도의 결정은 우선되어야 한다. 생체발광량에 미치는 영향을 두 번 실험하여 조사한 평균값의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 희석 ethyl alcohol에 사용된 증류수를 동량 넣은 기준시료가 24분 후 14.3%의 발광량이 감소한 반면 1.0%(v/v)

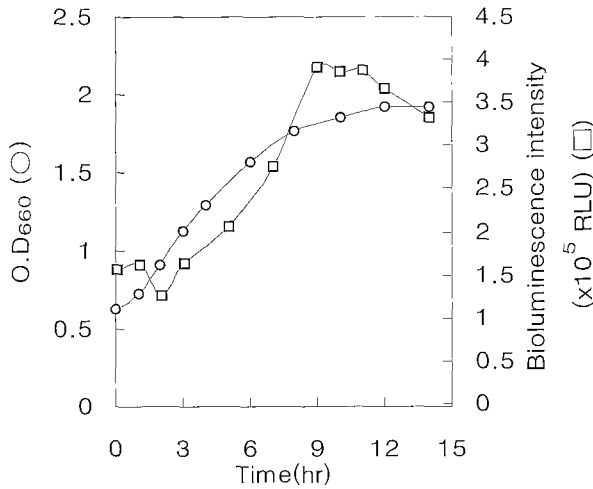


Figure 1. The relationship of growth curve of *P. phosphoreum* and bioluminescence intensity

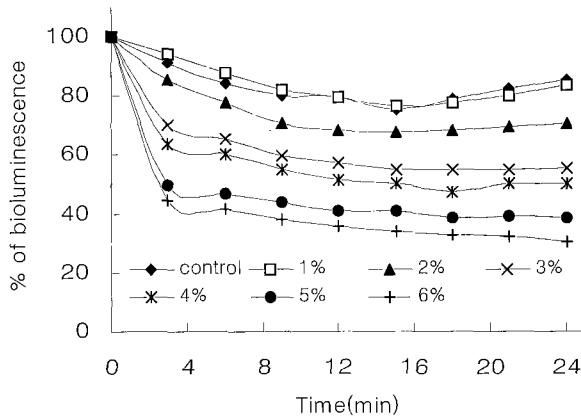


Figure 2. The stability of solvent concentrations to bioluminescence intensity (average of duplication tests)

ethyl alcohol은 16.2% 감소하였다. 이에 반해 2.0~6.0%(v/v) ethyl alcohol의 경우 29.4~69.5%의 감소량 볼 수 있었다. 그러므로 1.0% (v/v) ethyl alcohol을 본 실험의 용매의 농도로 사용하였다.

**CMC 고정화 세포의 독성물질에 대한 반응**

EC<sub>50</sub>값은 gamma (γ)값을 이용하였으며 산출된 γ 값이 1 이 되었을 때가 발광의 50%를 감소시키는 독성물질의 농도이고, 산출된 EC<sub>50</sub>값은 휘발성인 독성물질이 실지로 수중에 작용하는 독성농도인 EC<sub>50 liq</sub> 값을 Mackay등(16)이 산출한 헨리상수(H)를 이용하여 보정하였으며, phenol의 경우 *P. phosphoreum*의 활성에 작용하는 독성의 이온화되지 않는 부분에 대한 unionized EC<sub>50</sub> 값을 이온화상수 (pKa)와 최종 pH 를 이용하여 다시 보정하였다. 보정에 이용된 헨리상수(H)와 이온화상수(pKa)를 Table 1에 정리하였으며, pH는 각 독성의 EC<sub>50</sub> 값에 해당하는 최종 pH를 측정였다.

독성물질로 선정한 1,2-dichloroethane, 1,1,1-trichloroethane, 1,1,2,2-tetrachloroethane, hexa-chloroethane, benzene, chlorobenzene, 1,2-dichlorobenzene, 1,4-dichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, phenol,

Table 1. Henry's Law Constants (log H), Ionization Constants (pKa), and Molecular Weights(MW) of toxicants

| Toxicant                  | logH  | pKa  | MW  |
|---------------------------|-------|------|-----|
| 1,2-Dichloroethane        | -1.55 | -    | 99  |
| 1,1,1-Trichloroethane     | -1.09 | -    | 133 |
| 1,1,2,2-Tetrachloroethane | -1.41 | -    | 168 |
| Hexachloroethane          | -0.64 | -    | 237 |
| Benzene                   | -0.65 | -    | 78  |
| Chlorobenzene.            | -0.95 | -    | 112 |
| 1,2-Dichlorobenzene       | -1.14 | -    | 147 |
| 1,4-Dichlorobenzene       | -0.96 | -    | 147 |
| 1,2,4-Trichlorobenzene    | -1.61 | -    | 181 |
| Phenol                    | -4.27 | 9.99 | 94  |
| 2-Chlorophenol            | -3.41 | 8.52 | 128 |
| 2,4-Dichlorophenol        | -3.57 | 7.90 | 163 |
| 2,4,6-Trichlorophenol     | -5.27 | 5.99 | 197 |
| Pentachlorophenol         | -6.52 | 4.74 | 266 |

2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol 및 pentachlorophenol의 14개 독성에 대한 *P. phosphoreum*의 반응은 두 번 측정된 평균 %생체발광량이며, 대표적으로 hexa-chloroethane, 1,2,4-trichlorobenzene 및 penta-chlorophenol의 반응결과와 log (γ)값 - log (독성농도)와의 상관관계를 Fig. 3 에 나타내었고 전체 독성에 대한 보정된 EC<sub>50</sub>값을 Table 2에 나타내었다.

실험에 사용된 독성의 강도는 phenol > benzene > ethane 순으로 높게 측정되었고, ethane의 경우 1,2-dichloroethane의 산출된 EC<sub>50</sub>값이 9659.79 mg/L로 hexa-chloroethane의 90.37 mg/L보다 독성강도가 낮았으며, benzene의 경우도 1,2-dichlorobenzene의 EC<sub>50</sub> 값이 3516.14 mg/L로, 1,2,4-trichlorobenzene의 45.73 mg/L보다 독성강도가 낮았다. Phenol의 경우에서도 2-chlorophenol의 34.26 mg/L로, penta-chlorobenzene의 0.37 mg/L보다 독성강도가 낮게 산출된 결과로 chlorine이 치환된 수가 많을수록 독성강도가 크다는 것을 알 수 있었다.

산출된 EC<sub>50</sub>값을 헨리상수에 의해 각 독성마다 농도가 낮게 보정되었는데 이는 수계에서의 독성을 측정할 목적에 부합되는 보정값으로 밀봉된 5 mL luminometer tube에 0.1 mL의 측정시료와 4.9 mL의 공기상에서 휘발성인 독성이 휘발되면서 측정되지 못하는 독성 값이다. 1,1,1-trichloroethane의 경우처럼 산출된 EC<sub>50</sub>값은 7582.65 mg/L에서 보정에 의한 산출된 값은 1521.74 mg/L로 독성강도가 높아진 것을 알 수 있었고 Phenolic 독성의 경우는 보정값이 그리 변하지 않았으며 이는 독성강도가 높고, 헨리상수의 log 값이 -4.27~-6.52로 휘발하는 정도가 ethane 및 benzene보다 낮기 때문이었다.

이온화 상수가 존재하는 phenolic 독성물질은 EC<sub>50 liq</sub>을 다시 비이온화 EC<sub>50</sub>값으로 보정하였다. Zhao(17)등의 연구에 의하면 phenolic 독성은 본래의 pH에서 이온화되고 약산으로 작용하며, 이온화되지 않은 부분은 어떠한 방해도 없이 세포로 들어가 세포활성에 독성으로 작용한다고 하였다. 그러므로 phenolic 독성에 chlorine 치환기의 수에 변화를 준 독성물질의 비이온화 EC<sub>50</sub> 값은 2,4-dichlorophenol의 경우 3.67 mg/L에서 1.36 mg/L로 2,4,6-trichlorophenol은 2.23 mg/L에서 0.033 mg/L로 전체 phenolic 독성물질의 독성강도가 크게 보정되었다.

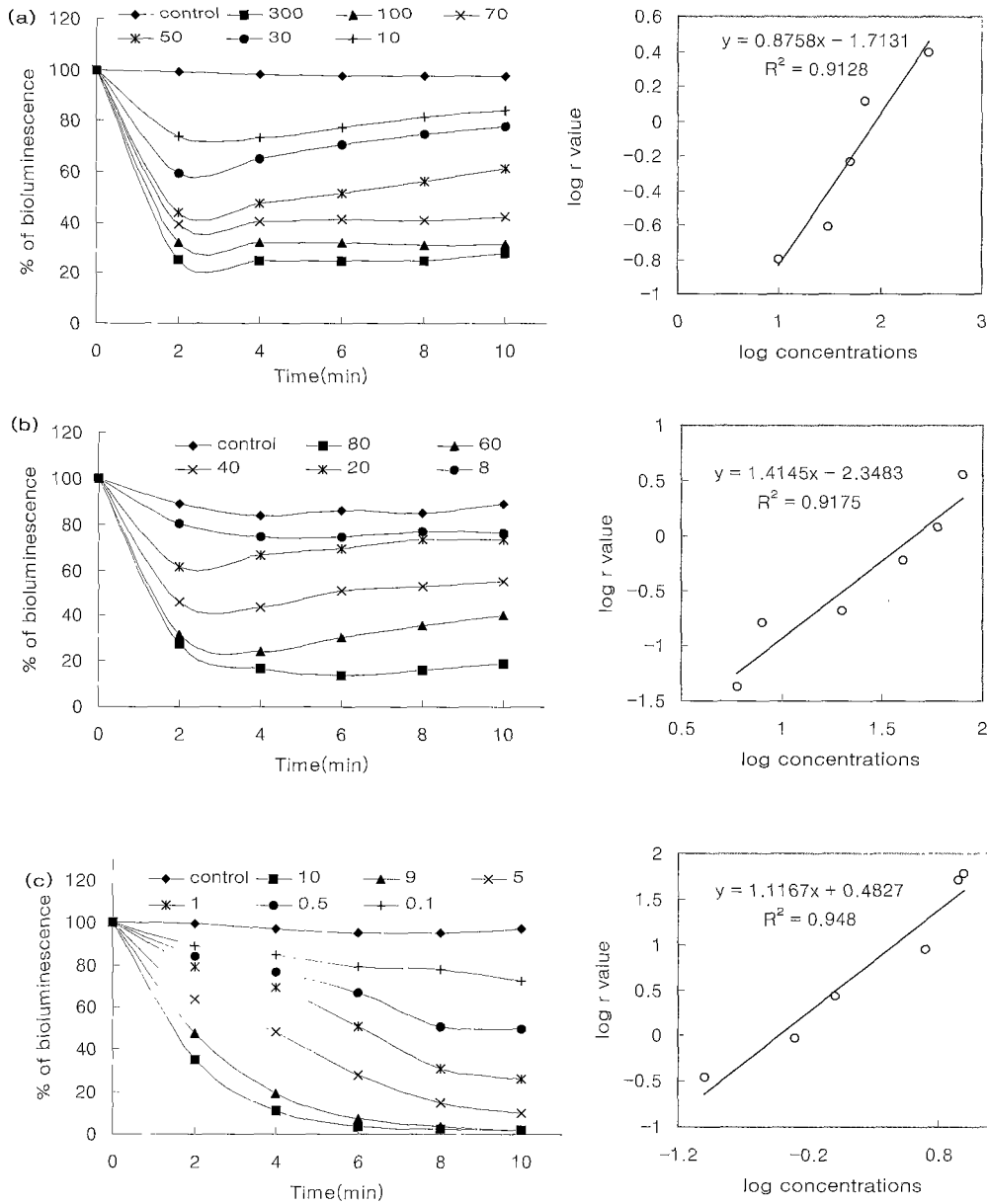


Figure 3. The response of bioluminescence in various concentrations of each toxicants and the relationship between log concentrations of each toxicant and the log gamma value. The unit of toxic substances concentration is ppm. The effect of (a) hexa-chloroethane, (b) 1,2,4-trichlororbenzene, (c) penta-chlorophenol.

전체 14개의 독성물질의 보정된 EC<sub>50</sub>값은 각 독성물질의 QSAR 모델링의 기초 자료로 사용하였다.

**QSAR 모델링**

QSAR모델은 각 독성이 갖는 매개변수인 octanol-water partition coefficient (log P), solubility (log S) 및 solvatochromic parameters에 대한 EC<sub>50</sub>값과의 관계를 다중회기분석한 것으로 14개 독성물질에 대한 log P, log S값을 Howard(18)가 연구한 handbook에서 인용하였으며, solvatochromic parameters는 Tang (13)에 의해 구해진 것을 Table 3에 도표화 하였고, phenolic toxicants의 log S 값은 너무 낮아 이용할 수 없었다.

QSAR모델링은 산출된 회기식의 검증이 필요하며, 이는 먼저 14개 독성에 대한 log P, log S 및 solvatochromic parameters 와

log EC<sub>50</sub>값과의 다중회기식을 산출한 후, 다시 독성물질의 data point 20%를 무작위로 없앤 후 다시 새로운 1차 회기식 또는 다중회기식을 구하여 독성물질의 예측 log EC<sub>50</sub>값을 구한다. 처음 구한 회기식에 의해 예측된 log EC<sub>50</sub>값과 20% data point를 뺀 새로운 회기식에 의한 예측된 log EC<sub>50</sub>값을 비교하여 ANOVA test하였을 때 그 값이 95%신뢰도 안에 들면 처음 구한 회기식은 올바르게 된 것이다. 그 결과 실험하지 않은 ethane (aliphatic toxicant), benzene(benzoic toxicant) 및 phenol (phenolic toxicant)의 log EC<sub>50</sub>값을 예측할 수 있는 것이다.

(1) Log P QSAR.

14개 chlorinated toxicant 전체독성의 각각에 대한 octanol/water partition coefficient (log P)와 EC<sub>50</sub>과의 회기식을 확인한 결과  $\log EC_{50} = 3.71 - 1.49 \log P$  ( n = 14, R<sup>2</sup> = 56.6%, RE

**Table 2.** The modified EC<sub>50</sub> of each toxicants

| Toxicant                  | Measured EC <sub>50</sub> mg/L | Final pH | Corrected for H EC <sub>50</sub> mg/L | Corrected for H & pKa EC <sub>50</sub> mg/L | Modified EC <sub>50</sub> log mM/L |
|---------------------------|--------------------------------|----------|---------------------------------------|---|------------------------------------|
| 1,2-Dichloroethane        | 9659.79                        | 8.41     | 4057.01                               | 4057.01                                     | 1.61                               |
| 1,1,1-Trichloroethane     | 7582.65                        | 8.15     | 1521.74                               | 1521.74                                     | 1.06                               |
| 1,1,2,2-Tetrachloroethane | 1413.30                        | 8.01     | 486.28                                | 468.28                                      | 0.45                               |
| Hexachloroethane          | 90.37                          | 7.96     | 7.39                                  | 7.39  | -1.51                              |
| Benzene                   | 7312.85                        | 9.27     | 610.95                                | 610.95                                      | 0.90                               |
| Chlorobenzene             | 3516.14                        | 8.56     | 541.12                                | 293.75                                      | 0.42                               |
| 1,2-Dichlorobenzene       | 861.11                         | 8.12     | 189.27                                | 189.27                                      | 0.11                               |
| 1,4-Dichlorobenzene       | 682.20                         | 8.11     | 107.05                                | 107.05                                      | -0.14                              |
| 1,2,4-Trichlorobenzene    | 45.73                          | 7.98     | 20.76                                 | 20.76                                       | -0.94                              |
| Phenol                    | 203.15                         | 7.84     | 202.62                                | 202.20                                      | 0.33                               |
| 2-chlorophenol            | 34.26                          | 8.06     | 33.62                                 | 24.96                                       | -0.71                              |
| 2,4-Dichlorophenol        | 3.71                           | 8.13     | 3.67                                  | 1.36  | -2.08                              |
| 2,4,6-Trichlorophenol     | 2.23                           | 7.82     | 2.23                                  | 0.033                                       | -3.78                              |
| Pentachlorophenol         | 0.37                           | 7.51     | 0.37                                  | 0.0006                                      | -5.65                              |

**Table 3.** Octanol-Water Partition Coefficient (Log P), Solubility (Log S) values and Solvatochromic Parameters(V<sub>i</sub>/100, π\*, β<sub>m</sub>, α<sub>m</sub>) of toxicants

| Toxicant                  | Log P | Log S | V <sub>i</sub> /100 | π*   | β <sub>m</sub> | α <sub>m</sub> |
|---------------------------|-------|-------|---------------------|------|----------------|----------------|
| 1,2-Dichloroethane        | 1.48  | -1.32 | 0.44                | 0.81 | 0.10           | 0.00           |
| 1,1,1-Trichloroethane     | 2.49  | -1.48 | 0.50                | 0.81 | 0.10           | 0.00           |
| 1,1,2,2-Tetrachloroethane | 3.01  | -1.75 | 0.62                | 0.95 | 0.10           | 0.20           |
| Hexachloroethane          | 3.63  | -3.68 | 0.79                | 0.27 | 0.10           | 0.00           |
| Benzene                   | 2.13  | -1.64 | 0.49                | 0.59 | 0.10           | 0.00           |
| Chlorobenzene.            | 2.84  | -2.23 | 0.57                | 0.71 | 0.10           | 0.00           |
| 1,2-Dichlorobenzene       | 3.38  | -3.20 | 0.67                | 0.80 | 0.03           | 0.00           |
| 1,4-Dichlorobenzene       | 3.52  | -3.22 | 0.67                | 0.70 | 0.03           | 0.00           |
| 1,2,4-Trichlorobenzene    | 4.02  | -3.78 | 0.76                | 0.75 | 0.00           | 0.00           |
| Phenol                    | 1.46  | -     | 0.54                | 0.72 | 0.33           | 0.61           |
| 2-Chlorophenol            | 2.15  | -     | 0.63                | 0.82 | 0.28           | 0.69           |
| 2,4-Dichlorophenol        | 2.67  | -     | 0.72                | 0.77 | 0.18           | 0.78           |
| 2,4,6-Trichlorophenol     | 3.69  | -     | 0.81                | 0.82 | 0.08           | 0.87           |
| Pentachlorophenol         | 5.12  | -     | 0.90                | 0.82 | 0.04           | 0.92           |

V<sub>i</sub> : Molar volume, π\* : Polarity - polarizability, β<sub>m</sub> : Hydrogen bond acceptor basicity, α<sub>m</sub> :Hydrogen bond donor acidity

(regression error) = 1.889 ) 이었으며 이 회귀식에 의하여 예측 값을 산출하여 Fig. 4에 보정 EC<sub>50</sub>값 대 예측 EC<sub>50</sub>값과의 관계를 나타내었다. 전체 독성에 대한 R<sup>2</sup> 값이 56.6%로 산출되었으며 이는 phenolic toxicant와 aliphatic, benzoic toxicant 간의 독성 강도의 차이가 있기 때문이다. 그러므로 phenolic 과 nonphenolic toxicant로 나눠 회귀식을 구하였을 때 phenolic toxicant에 대한 log EC<sub>50</sub>값과 log P값과의 회귀식은 log EC<sub>50</sub> = 2.64 - 1.66 log P ( n = 5, R<sup>2</sup> = 98.8%, RE = 0.106) 이었으며, 이 회귀식을 이용하여 예측EC<sub>50</sub>값을 산출하여 Fig. 5에 보정 EC<sub>50</sub>값 대 예측 EC<sub>50</sub>값과의 관계를 나타내었다. Nonphenolic toxicant에 대한 log E<sub>50</sub>값과 log P값과의 회귀식은 log EC<sub>50</sub> = 3.44 - 1.09 log P ( n = 9, R<sup>2</sup> = 80.8%, RE = 0.207) 이었으며, 회귀식에 의한 예측 EC<sub>50</sub>값을 산출하여 Fig. 6에 보정 log EC<sub>50</sub>값 대 예측 log EC<sub>50</sub>값과의 관계를 나타내었다. 각각의 분류된 회귀식에서 R<sup>2</sup>값이 98.8%와 80.8%로 높은 상관계수를 얻을 수 있었고, log EC<sub>50</sub> 대 log P 와의 식에서 log P 값이 증가할수록 log EC<sub>50</sub>값은 감소함을 알 수 있었으며 이는 독성물질의 octanol/water

partition coefficient 값이 증가할수록 독성강도가 증가한다는 것을 알 수 있다.

Phenolic toxicant중 2,4-dichlorophenol을 제외시킨 log P QSAR 검증식은 log EC<sub>50</sub> = 2.76 - 1.68 log P ( n = 4, R<sup>2</sup> = 99.2%, RE = 0.087)이었으며 ANOVA test 결과 T = 0.039, P = 0.969로서 95%신뢰도 안에 있었고, nonphenolic toxicant중 1,1,1-trichloroethane 과 chlorobenzen을 제외시킨 log P QSAR 검증식은 log EC<sub>50</sub> = 3.25 - 1.05 log P ( n = 7, R<sup>2</sup> = 80.6%, RE = 0.262)였으며 ANOVA test 결과 T = -0.178 P = 0.861로서 95% 신뢰도 안에 있으므로 phenolic 및 nonphenolic toxicant의 처음 구한 log P QSAR 회귀식은 log EC<sub>50</sub>값 예측에 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

(2) Log S QSAR

Phenolic toxicant의 경우 용해도 (log S)의 값이 매우 낮아 제외하고 9개 nonphenolic toxicants 와 log S 의 회귀식은 log EC<sub>50</sub> = 2.48 + 0.914 log S ( n = 14, R<sup>2</sup> = 85.5%, RE = 0.378) 이었으며, 산출된 회귀식에 의하여 예측 EC<sub>50</sub>값을 산출하여 Fig. 7에 보

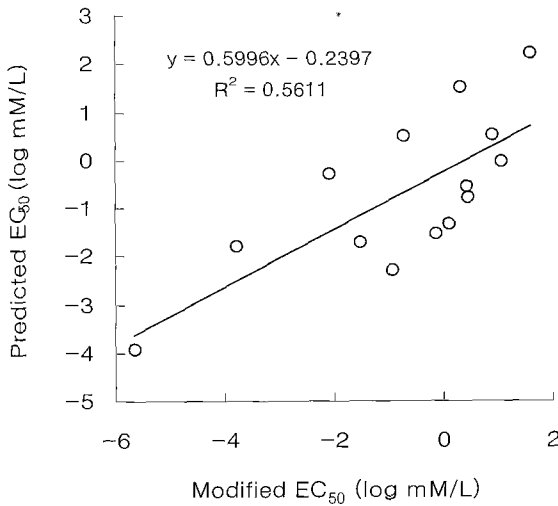


Figure 4. Log P QSAR for all toxicants ( $\log EC_{50} = 3.71 - 1.49 \log P$ )

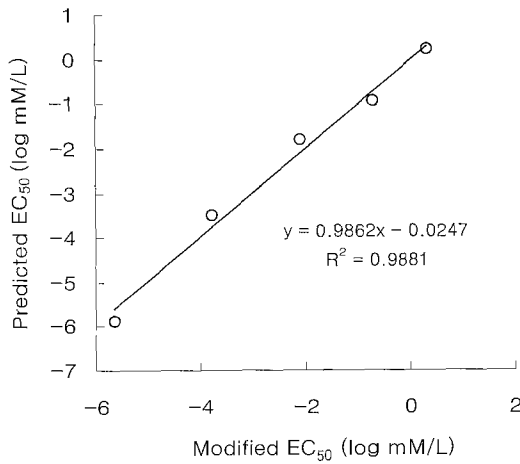


Figure 5. Log P QSAR for phenolic toxicants ( $\log EC_{50} = 2.64 - 1.66 \log P$ )

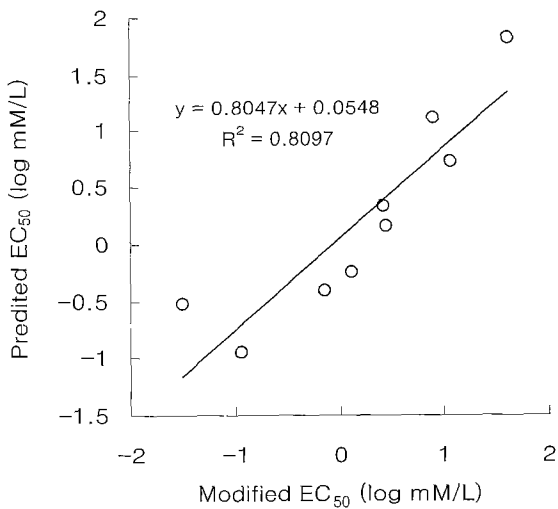


Figure 6. Log P QSAR for nonphenolic toxicants ( $\log EC_{50} = 3.44 - 1.09 \log P$ )

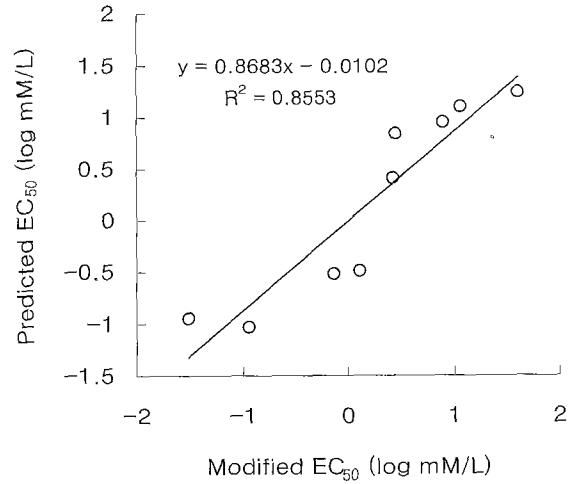


Figure 7. Log S QSAR for nonphenolic toxicants ( $\log EC_{50} = 2.48 + 0.929 \log S$ )

정 EC<sub>50</sub> 과의 그래프를 나타내었다. log S와 log EC<sub>50</sub>값의 관계에서 독성의 강도에 따른 R<sup>2</sup>값이 85.5%의 높은 상관관계를 얻을 수 있었으며, log EC<sub>50</sub> 대 log S와의 회귀식에서 log S 값이 감소할수록 log EC<sub>50</sub>값도 감소하였다. 즉 독성물질의 용해도 값이 작을수록 독성강도가 증가함을 알 수 있었다.

Nonphenolic toxicant중 1,1,1-trichloroethane 과 chlorobenzen을 제외시킨 log S QSAR 검증식은  $\log EC_{50} = 2.53 + 0.929 \log S$  ( $n = 7, R^2 = 83.6\%, RE = 0.184$ )였으며 ANOVA test 결과  $T = 0.029, P = 0.976$ 로서 95% 신뢰도 안에 있으므로 nonphenolic toxicants의 처음 구한 log S QSAR 회귀식은 log EC<sub>50</sub>값 예측에 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

### (3) Solvatochromic parameter QSAR

14개 독성에 대한 log EC<sub>50</sub>과 solvatochromic parameter 값과의 다중회귀식은  $\log EC_{50} = 0.35 - 4.48 V_i/100 + 2.84 \pi^* + 9.46 \beta m - 4.48 \alpha m$  ( $n = 14, R^2 = 98.2\%, RE = 0.102$ )였으며, solvatochromic parameter와 log EC<sub>50</sub>값과의 독성강도의 관계에서 98.2%의 아주 높은 상관관계를 알 수 있었다. 산출된 회귀식에

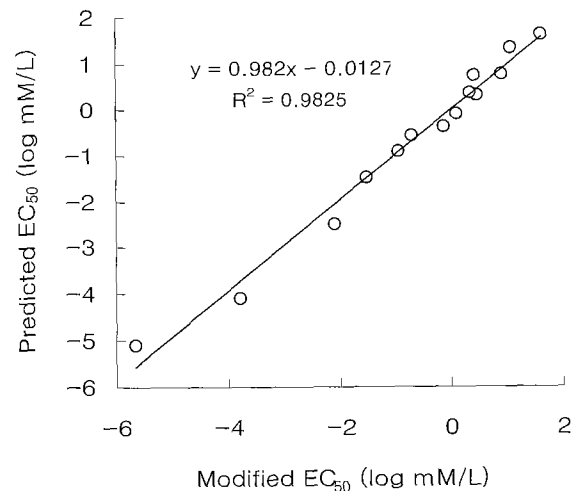


Figure 8. Solvatochromic parameter QSAR for all toxicants ( $\log EC_{50} = 0.35 - 4.48 V_i/100 + 2.84 \pi^* + 9.46 \beta m - 4.48 \alpha m$ )

각 solvatochromic parameter을 대입하여 예측 log EC<sub>50</sub>값을 산출한 후 Fig. 8에 보정 EC<sub>50</sub>과의 관계를 나타내었다. Vi, αm값이 증가할수록 독성강도가 증가하나 βm값은 감소할수록 독성강도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

14개 독성물질 중 1,1,1-trichloroethane, 1,4-dichlorobenzene 및 2-chlorophenol을 제외한 solvatochromic parameter QSAR 검증식은  $\log EC_{50} = 0.25 - 4.56 Vi/100 + 3.01 \pi^* + 9.96 \beta m - 4.51 \alpha m$  (n = 14, R<sup>2</sup> = 98.5%, RE = 0.102)였으며 ANOVA test 결과 T = 0.025, P = 0.979로서 95% 신뢰도 안에 있으므로 모든 toxicant의 처음 구한 solvatochromic parameter QSAR 회귀식은 log EC<sub>50</sub>값 예측에 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

## 요 약

발광미생물 (luminescent bacteria)인 *P. phosphoreum*을 이용한 수계의 환경독성물질로 지정된 ethane, benzene, phenol류에 chlorine이 치환된 14개의 독성강도를 생체발광의 50%저하시키는 독성농도인 EC<sub>50</sub>값을 통한 생물학적 정량을 하였을 때 phenol > benzene > ethane 의 순서로 독성강도가 높게 산출되어졌으며, 특히 치환된 chlorine의 수가 증가할수록 독성강도가 강하다는 것을 알 수 있었다. 또한 산출된 EC<sub>50</sub>값을 이용하여 독성물질들의 물리화학적 parameter특성인 octanol/water 분할계수 (log P), 용해도 (log S) 및 solvatochromic parameter의 연관성을 QSAR 모델링하였으며 실험을 통하지 않고, 독성의 독성강도를 예측할 수 있는 회귀식을 다음과 같이 산출하였다.  $\log EC_{50} = 2.48 + 0.914 \log S$  (n=9, R<sup>2</sup>=85.5%, RE = 0.378),  $\log EC_{50} = 0.35 - 4.48 Vi/100 + 2.84 \pi^* + 9.46 \beta m - 4.48 \alpha m$  (n = 14, R<sup>2</sup> = 98.2%, RE = 0.102),  $\log EC_{50} = 2.64 - 1.66 \log P$  (n = 5, R<sup>2</sup> = 98.8%, RE = 0.16),  $\log EC_{50} = 3.44 - 1.09 \log P$  (n = 9, R<sup>2</sup> = 80.8%, RE = 0.207). QSAR 모델은 QSAR 검증식을 통하여 확인된 다중회귀식을 이용함으로 실험하지 않은 독성물질이 갖는 물리화학적인 특성을 대입하여 log EC<sub>50</sub>값을 예측할 수 있으므로 경제적, 시간적으로 이익을 얻을 수 있는 모델이다.

## 감 사

본 연구는 1999년도 공업기술기반 연구비 (Project No. 971-327) ('97. 11. 1)에 의하여 연구되었습니다.

## REFERENCES

- Blum, D. J. and R. E. Speece (1990), Determining Chemical Toxicity to Aquatic Species, *Environ. Sci. Technol.* **24**(3), 284-293
- Choi, J. T (1995), Toxicity Test of Organic Chemicals Using *Nitrobacter*, M.S. Thesis, Dept. of Environmental Engineering, National Fisheries University, Pusan
- Lee, Y. J., S. J. Jung, M. S. Her and U. H. Chun (2000), Studies on the Use of Carboxymethylcellulose Sodium Salt Matrix for the Immobilization of *Photobacterium phosphoreum*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**(1), 49-54
- Shuler, M. L. and F. Kargi (1992), *Bioprocess Engineering : basic concepts*, 1st ed., pp248-253 PTR Prentice-Hall press, New Jersey.
- Cumhur, C. and E. Murat (1995), Stability and Controlled Release Properties of Carboxymethylcellulose-Encapsulated *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, *pestic. sci.* **45**, 351-355
- Nirmalakhandan, N. and R. E. Speece (1988), Quantitative Techniques for Predicting the Behavior of Chemicals in the Ecosystem, *Environ. Sci. Technol.*, **22**(6), 606-615
- Jaworska, J. S., R. S. Hunter and T. W. Schultz (1995), Quantitative Structure-Toxicity Relationships and Volume Fraction Analyses for Selected Esters, *Environmental Contamination and Toxicology*. **29**(1), 86-93
- Zhao, Y. H., G. D. Ji, M. T. D. Cronin and J. C. Dearden (1998), QSAR Study of the Toxicity of Benzoic Acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and Carp, *The Science of the Total Environment*, **216**, 205-215
- Sun, B., N. Nirmalakhandan, E. Hall, X. H. Wang, J. Prakash and R. Maynes (1993), Estimating Toxicity of Organic Chemicals to Activated-Sludge Microorganisms, *Journal of Environmental Engineering*, **120**(6), 1459-1469
- Cronin, M. T. D., B. W. Gregory and T. W. Schultz (1998), Quantitative Structure Activity Analyses of Nitrobenzene Toxicity to *Tetrahymena pyriformis*, *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 902-908
- Kamlet, M. J., R. M. Doherty, G. D. Velth., R. W. Taft and M. H. Abraham (1986), An Analysis of Toxicant Properties That Influence Inhibition of Bioluminescence in *Photobacterium phosphoreum* (The Microtox Test), *Environ. Sci. Technol.* **20**, 690-695
- Govers, H., C. Ruepert, T. Stevens and C. J. V. Leeuwen (1986), Experimental Determination and Prediction of Partition Coefficients of Thioureas and Their Toxicity to *Photobacterium phosphoreum*, *Chemosphere* **15**(4), 383-393
- Tang, N. H., D. J. W. Blum, and R. E. Speece (1992), QSAR Parameters for Toxicity of Organic Chemicals to *Nitrobacter*, *Journal of Environmental Engineering* **118**, 17-37
- Mallak, F. P. and R. L. Bruner (1984), Determination of the Toxicity of Selected Metalworking Fluid Preservatives by Use of the Microtox System and an In Vitro Enzyme Assay, In *Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems* (Dickson Liu, B. J. Dutka eds.), pp.65-76, Marcel Dekker Inc., New York.
- 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
- Mackay, D. and W. Y. Shiu (1981), A Critical Review of Henry's Law Constants for Chemicals of Environmental Interest, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **10**(4), 1175-1199
- Zhao, Y. H., L. H. Yang and L. S. Wang (1996), Quantitative Structure-Activity Relationships of Organic Acids and Bases, *Environmental Contamination and Toxicology* **57**, 242-2498.
- Howard, P. H (1991) *Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. vol 1, 2, 4, Solvents.* Lewis. Boca Raton. Fla.