

QSAR방법을 이용한 CAHs와 Chlorophenol 유도체에 대한 EC₅₀값 예측

이홍주 · 유승오 · 이정건¹ · 김병용 · 전익한*

경희대학교 생명자원과학부 식품가공학과, ¹LG산전(주)연구소

Prediction of EC₅₀ of *Photobacterium phosphoreum* for CAHs and Chlorophenol Derivatives Using QSAR. Lee, Hong-Joo, Seung-O Yoo, Jeong-Gun Lee¹, Byung-Yong Kim, and Uck-Han Chun*. Department of Food Technology and Science, Institute of Life and Resource Science, Kyung Hee University, Suwon, Kyungki 449-701, Korea, ¹R&D Center, LG Industrial Systems Co., Ltd., Anyang, Kyungki 431-080, Korea - Measurement of inhibition of bioluminescence in *Photobacterium phosphoreum* has been proposed as a sensitive and rapid procedure to monitor toxic substances. However, at first, EC₅₀ which shows degree of toxicity to each toxic substances must be calculated. QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) model can be used to estimate EC₅₀ to save time and endeavor. Moderately high correlation coefficients ($r^2 \geq 0.97$) were calculated from the linear correlation between EC₅₀ and molecular connectivity indices of CAHs (chlorinated aliphatic hydrocarbons) such as ⁰X, ⁰X^v, ¹X, ²X and ³X_c and quadratic correlation between EC₅₀ and ⁰X, ⁰X^v, ²X^v, ³X_c, ³X_c and P. It shows that the molecular connection indices in carbon structure is contributed to biological characters with linear relation and that in the other one with quadratic relation. The EC₅₀ of chlorophenol derivatives had quadratic relation with the value of octanol/water partition coefficients ($r^2=0.99$) and linear and quadratic relation with the number of chlorine compound ($r^2 \geq 0.94$). This confirms the already known trend of increasing toxicity with increasing ability of a compound to diffuse through cell membrane and number of chlorine substitution.

Key words: *Photobacterium phosphoreum*, immobilization, QSAR, EC₅₀, molecular connection indices, octanol/water partition coefficients

물은 인간활동과 삶에서 일반적으로 사용되는 가장 중요한 천연자원이지만 또한 제한적인 자원이기도 하다 [3]. 따라서 수질 중의 독성물질의 유입은 막대한 피해를 가져오는데 그 대표적인 물질들로서 지방족 염화탄화수소(chlorinated aliphatic hydrocarbons: CAHs)와 chlorophenol 유도체 등을 들 수 있다. 이러한 물질들은 오염된 지하수와 토양, 폐기물처리시설에서 발견되고 있으며 수질 오염의 기준이 되는 물질로서 오염 정도를 판단하는데 이용된다[12]. 이러한 독성물질에 의한 피해를 막기 위하여 우선 수질 중의 독성물질을 monitoring 할 수 있어야 한다. 오염된 지하수나 수질의 독성물질 monitoring을 위하여 분석 화학적인 방법, 불고기나 물벼룩을 이용한 생물학적인 방법 등이 이용되고 있으며 최근에는 *Photobacterium phosphoreum*과 같은 발광미생물을 이용한 생물학적 monitoring 방법이 주목받고 있다[1, 7, 9]. 즉 luminescent bacteria를 이용하여 bioluminescence 감소 정도로 metabolic activity를 측정하는 방법인데 이러한 반응은 짧은 시간 내에 민감하게 일어난다

는 장점이 있다[8]. Luminescent bacteria를 이용한 독성물질 monitoring에서는 일정 시간 내에 bioluminescence intensity를 50%로 줄이기 위해 필요한 독성물질의 농도를 나타내는 값인 EC₅₀로 독성 정도를 나타낸다 [2]. 따라서 luminescent bacteria를 이용한 monitoring 방법은 각 독성물질에 대한 독성도 검사가 선행되어야 하며 이러한 과정은 막대한 비용과 시간을 요구한다.

Quantitative structure activity relationship(QSAR) 모델은 화학적 구조와 생물학적 활성 사이의 양적 상관관계를 조사하는 방법으로 Randic에 의하여 처음 소개된 이후 물리화학적, 생물학적 특성을 예측하는데 이용되어 왔다[10]. 최근 20년간 QSAR모델은 화학 분야에서 유기화합물의 화학 물리적 특성인 Henry상수, 용해도, 등은 흡착선 예측에 적용되었고[6], 그 이외에도 의약품, 제초제, 살충제 등과 같은 생물학적 활성 화합물에도 적용되었다[4]. Tabak과 Govind은 탄화수소의 구조-활동도 관계를 이용한 contribution모델에 의해 56개 독성화합물의 일차반응상수와 Monod 반응상수를 예측하였고 [11] Yuan 등은 luminescent bacteria와 river bacteria를 이용한 nitrobenzene의 독성연구에 QSAR 모델을 적용하였다[13]. 또한, Sun 등은 QSAR 모델을 기초로 하여 9개

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

의 CAHs가 포함된 50개의 유기화합물에 대한 활성슬러지의 미생물의 호흡 방해 정도를 추정하였고 Mortimer 등은 bioluminescence를 이용한 polymer의 용해도 측정과 예측에 QSAR을 이용하였다[5]. 생물학분야에서는 특히 탄화수소의 생물학적 특성과 탄화수소의 구조간의 관계에 대한 관심이 증가되고 있으며, 생물학적 특성은 탄화수소의 contribution 함수, α 로 표현될 수 있다[6].

$$\log k \approx f(\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n)$$

여기서 α 는 각각의 탄화수소의 구조의 contribution이다. 본 연구에서는 CAHs의 contribution으로서 QSAR 모델에 적용할 수 있는 분자연결지수를 사용하였다. 분자연결지수는 어떤 화합물이 가지고 있는 화학적 구조를 고유의 값으로 나타내는 것으로 이 지수는 화합물의 물리화학적, 생물학적 특성을 나타내는데 이용되고 있다[6].

위에서 기술한 바와 같이 화학물질의 생물학적인 성질은 그 구조적 성질과 직접적인 관련이 있는데 이것은 화학물질의 물리화학적 성질이 분자의 크기나 기능기, 대칭 평면 등과 관계 있는 것과 마찬가지로이다. 화학물질의 독성은 단지 생물체가 가지고 있는 모든 생화학적 작용 중 특수한 한가지 경우이며 세포 내로 독성물질이 침투하기 위하여 화학물질은 우선 세포의 지질막을 통해 확산되어야 한다. 독성물질이 세포막을 통하여 확산되는 능력은 지질상의 막과 세포 외부의 친수성상사이의 용해비(solubility ratio)로 표현된다. n-octanol/water 시스템은 화학물질이 용해되어있는 수상(aquatic phase)에 의해 둘러싸여 있는 지질막과 유사한 소수성의 octanol 상으로 이와 같은 생화학적 전달체계의 장애를 잘 modeling하고 있다. 따라서 octanol/water partition coefficient의 log값(log P 혹은 log K_{ow})은 여러 종류의 화학물질의 여러 다른 형태의 생물학적 반응을 연관시키고 예상하는데 자주 사용된다[4]. 따라서 본 연구에서는 chlorophenol 유도체의 contribution으로서 QSAR 모델에 적용할 수 있는 octanol/water partition coefficient의 log값을 사용하였다.

본 연구의 목적은 CAHs와 chlorophenol 유도체의 EC₅₀를 예측하기 위해서 QSAR 모델을 적용하는 것이다. 본 연구를 통해서 비용이나 시간이 소요되는 실험을 행하지 않고 다른 종류의 CAHs와 chlorophenol 유도체의 EC₅₀를 예측하는데 유용한 방법이 될 수 있을 것이다. 이를 위하여 분자연결지수(molecular connectivity index) 혹은 octanol/water partition coefficient의 log값과 EC₅₀의 연관성을 다중회귀분석으로 검토하였다.

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 4.3 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℃, 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 matrix로서 strontium alginate를 사용하였다. 접종한 후 12~14시간 동안 배양한 세포를 2.5%(w/v)의 식염수에 10²으로 희석한 후 세포 희석액과 2.4%(w/v)의 sodium alginate(Hayashi Co. Ltd., Japan)를 1:8의 비율로 섞고 혼합액에 sodium alginate와 동량의 0.31 M의 strontium chloride(Sigma Co., U.S.A.) 용액을 첨가 후 밀봉하여 4℃에서 저장하였다. 고정화 세포의 부피는 0.2 mL로 하였다.

Bioluminescence의 측정

10²로 희석한 세포를 0.2 mL의 반구형으로 고정화하여 luminometer(Berthold Lumat LB 9507, Germany)로 측정하였다. Luminometer는 Berthold사(Germany)로부터 Lumat LB 9507를, Tube는 Sarstedt사(Germany)로부터 Röhren-Tubes No. 55.476(5 mL, 75×12 mm)를 구입하여 사용하였다. 모든 시료는 상온에서 측정 시간은 0.1초로 하여 측정하였다. Bioluminescence의 단위는 RLU(Relative Light Units)로 일정시간동안 1.0 mL의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다.

독성 물질에 대한 반응

각 CAHs와 chloride phenol유도체가 bioluminescence에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CAHs 가운데 chloroform, dichloromethane, 1,2-dichloroethane, 그리고 trichloroethylene을 chlorophenol 유도체 가운데에는 phenol, chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 그리고 2,4,5-trichlorophenol을 선택하여 20분 동안 발광의 변화를 측정하였다. Phenol은 Tedia Co. Inc.에서 dichlorome-

thane은 Aldrich Co. Inc.(U.S.A)에서 그리고 chloroform은 D.S.P Co. Inc.(Korea)에서 구입하였고 그 외의 독성물질은 Sigma Co. Inc.(U.S.A.)에서 구입하였다. Chlorophenol 유도체는 1%의 ethanol 용액에 용해시킨 stock 용액을 4°C에 저장하였다가 실험하기 직전에 농도 별로 희석하여 사용하였다. Strontium alginate에 총 부피 0.2 ml로 고정화하여 4°C에 저장해 둔 *Photobacterium phosphoreum*에 여러 농도의 독성물질을 첨가하여 bioluminescence intensity의 변화를 luminometer를 이용하여 측정하였으며 bioluminescence 측정은 모두 실온에서 행하였다.

결과 분석

CAHs와 chloride phenol 유도체에 대한 반응 결과 bioluminescence의 intensity가 감소하며 각 독성물질마다 감소하는 정도에 따라 EC₅₀값을 구하였다[3]. EC₅₀는 일정 시간 내에 발광량을 50%로 줄이기 위해 필요한 독성 물질의 농도를 나타내는 값으로 bioluminescence의 감소를 측정하는 한 방법인 Gamma(γ) value로부터 구한다. Gamma(γ) value는 잔류하는 bioluminescence에 대하여 감소한 bioluminescence의 비로서 다음 식에 의하여 계산할 수 있다.

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

γ(t)는 t시간동안의 Gamma value이고 R(t)은 t시간 동안 blank의 bioluminescence의 비로 t시간 후의 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 t시간 후의 bioluminescence, 즉 독성물질에 t시간 동안 노출된 후의 bioluminescence intensity이다. 각 농도에서의 γ값을 구하여 독성물질의 농도와 γ값을 log-log graph에 나타내면 직선으로 나타나고 γ=1이 되는 독성물질의 농도가 t 시간 동안의 EC₅₀(t) 값이다.

QSAR방법에 의한 EC₅₀ 값의 예측

CAHs와 chlorophenol 유도체의 EC₅₀ 값을 예측하기 위해서 QSAR모형을 적용하였다. CAHs의 QSAR모형에서 분자연결지수(molecular connectivity index)[10]와 EC₅₀의 연관성은 다중회귀분석으로 검토하였다. 분자연결지수와 극성도를 각각의 독립 변수로 선정하고 각 독성물질의 EC₅₀값을 종속 변수 y로 선정하여 Design Expert 프로그램(Stat-Easy Co., Mineapolis)을 이용하여 다중회귀 분석하고 반응 변수에 대한 모델을 추정하여 이를 다항회귀 모형식으로 변환하였다. Chlorophenol 유

도체의 QSAR 모델에서는 octanol/water partition coefficient의 log값과 (log P)² 값[12]을 각각의 독립 변수로 하여 다중회귀분석하였다. Design Expert 프로그램을 이용하여 분석하였고 반응변수에 대한 모델을 추정하여 다항회귀 모형식으로 변환하였다.

결과 및 고찰

독성물질 검사를 위한 적정 고정화 세포의 부피

Strontium alginate로 세포를 고정화하는데 사전 실험 결과를 토대로 하여 bioluminescence에 영향을 미치지 않는 즉, 가장 bioluminescence 유지도가 좋은 2.4%의 sodium alginate와 0.31 M의 strontium chloride를 이용하였다. 그 결과 높은 bioluminescence 유지도와 함께 높은 경도를 보였으나 독성물질 검사 시 고정화 matrix 내부로 독성물질 침투가 용이하지 않다는 문제점이 제기되었다. 따라서 독성물질이 침투할 수 있는 고정화 세포의 형태와 부피가 중요하다. 본 연구에서는 반구형으로 고정화 세포를 제작하였고 독성물질이 접촉하는 면은 지름 0.90 cm의 원형으로 하였다. Fig. 1은 고정화하지 않은 세포의 bioluminescence를 20분 이내에 10RLU 이하로 감소시킬 수 있는 chloroform의 농도(ppm)에 의한 고정화 세포의 반응을 나타낸 것이다. 이 때 고정화 세포의 부피는 0.5 mL이며 20분 이내에는 초기 bioluminescence intensity의 55.89%만이 감소함을 알 수 있다. 이는 독성물질이 고정화 matrix에 침투하지 못하여 내부에 존재하는 세포에는 영향을 미치지 못하기 때문이다. 즉 접촉면이 0.2 cm²일 때 고정화 matrix 총 부피의 55.89%까지 독성물질이 영향을 미칠 수 있으므로 접촉면이 0.2 cm²인 경우 총 부피를 0.2 mL 이하로 해야한다는 결론을 얻었다. 따라서 이후의 모든 실험은 0.2 mL 이하로

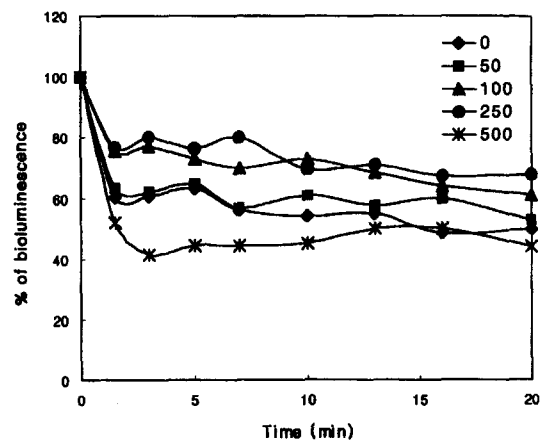


Fig. 1. The response of luminescent bacteria for various chloroform concentrations. The concentration unit of chloroform is ppm.

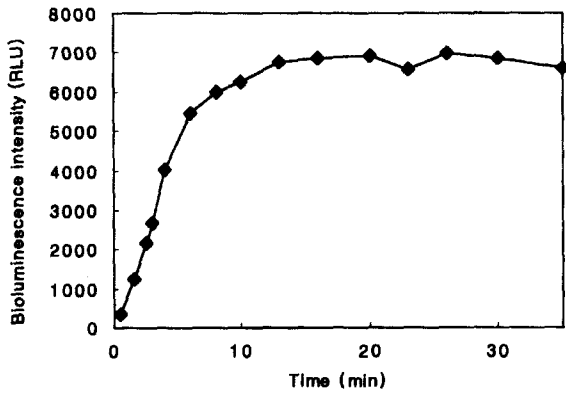


Fig. 2. The variation of bioluminescence after storage at 4°C. Bioluminescence had maximum value at about 10 min and was stabilized.

고정화한 세포를 사용하였다.

고정화 세포의 reactivation

고정화 한 *Photobacterium phosphoreum*은 bioluminescence를 장기간 유지하기 위하여 4°C에서 저장하였다. 따라서 저장해 두었던 고정화 세포를 독성물질 monitoring에 이용하기 위해서는 reactivation 과정이 필요하다.

세포가 동결되지는 않기 때문에 실온에서 일정시간을 두는 것으로 reactivation이 가능한데 Fig. 2는 4°C에서 보관해 두었던 고정화 세포를 꺼내는 순간부터 bioluminescence의 변화를 살펴본 것이다. 저온에 저장해 두면 bioluminescence가 급격히 낮았다가 실온에서 서서히 증가하는데 10~15분 정도 지나면 일정하게 유지된다. 따라서 저온에서 보관한 후 독성물질 monitoring에 이용하기 전 실온에 꺼내어 15분이 지난 이후에 사용하였다.

고정화 세포의 독성물질에 대한 반응

CAHs 중에서 chloroform, dichloromethane, 1,2-dichloroethane 및 trichloroethylene을, chlorophenol 유도체 중에서는 phenol, chlorophenol, 2,4-dichlorophenol 및 2,4,5-trichlorophenol을 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 intensity 감소 정도는 커졌으며 감소하는 정도는 독성 물질마다 상이하였을 뿐 아니라 독성물질마다 bioluminescence intensity의 감소가 특이적으로 나타났다. CAHs의 경우에는 다른 독성물질

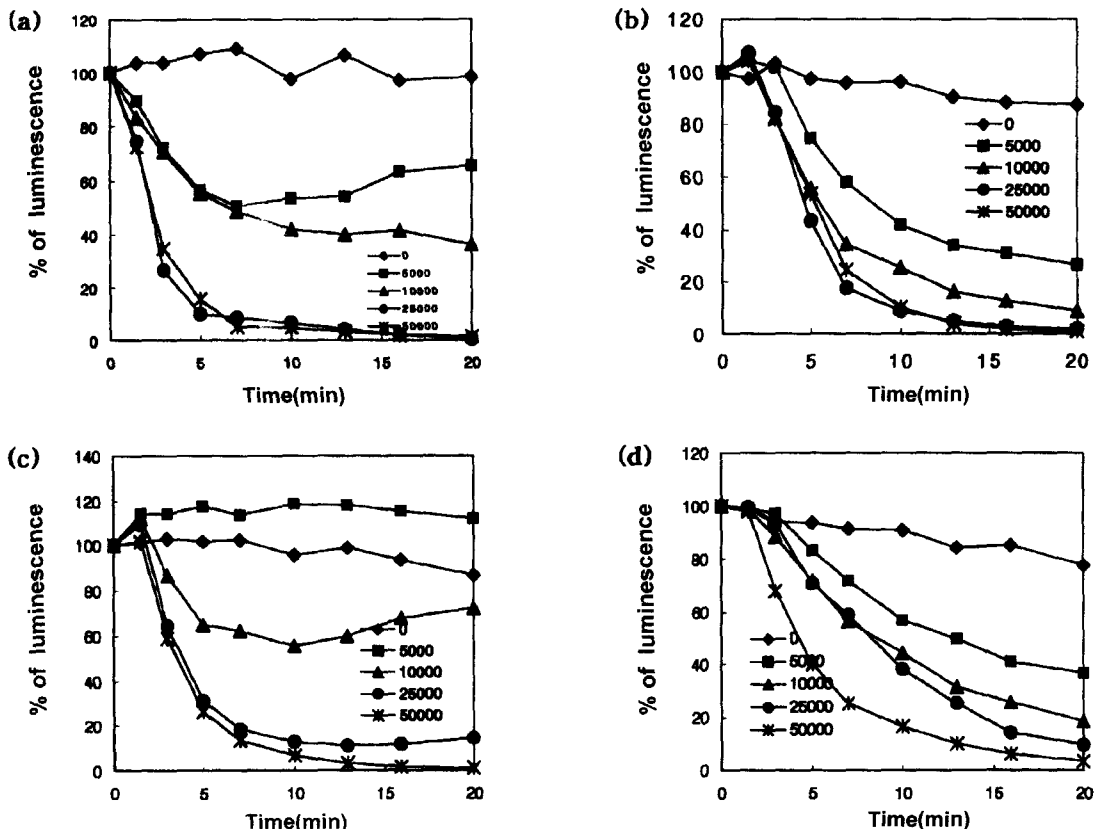


Fig. 3. The dynamic response of bioluminescence in various CAHs. The unit of toxic substances concentration is ppm. The effect of (a) chloroform, (b) 1,2-dichloroethane, (c) dichloromethane, and (d) trichloroethylene.

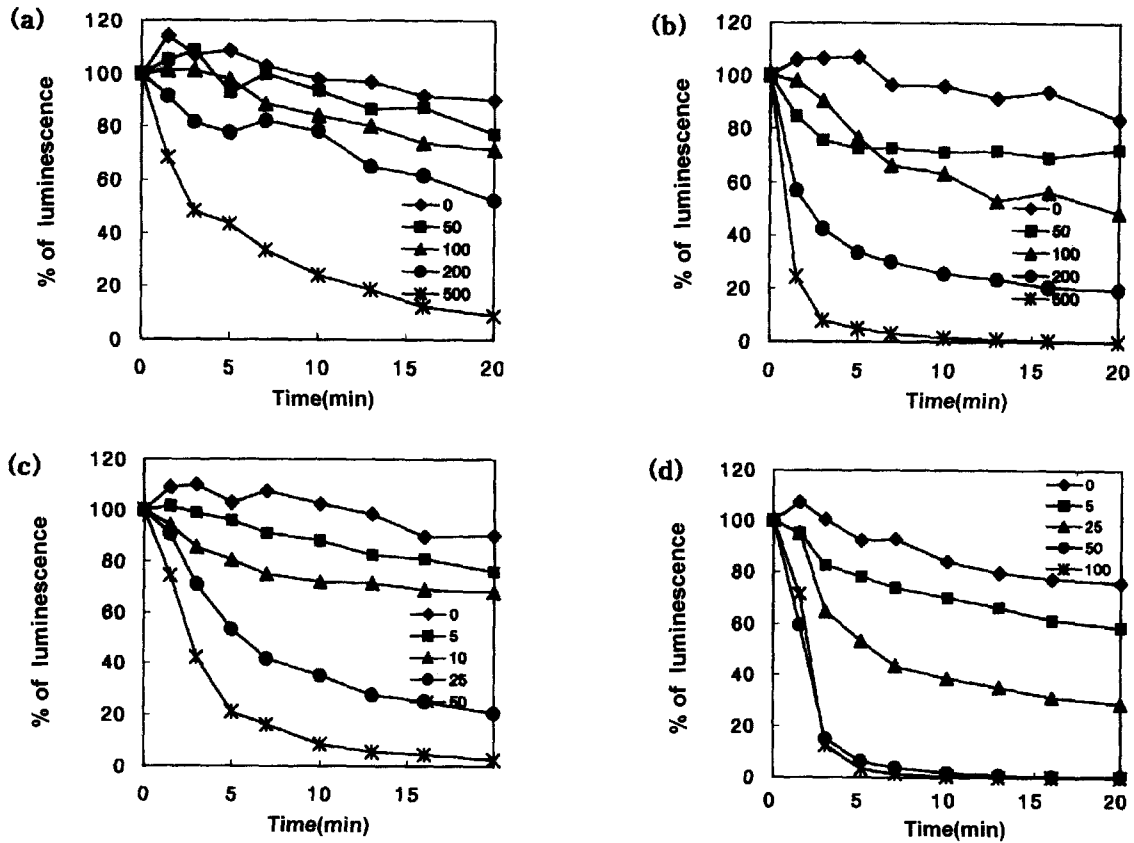


Fig. 4. The dynamic response of bioluminescence in various chlorophenol derivatives. The unit of toxic substances concentration is ppm. The effect of (a) phenol, (b) chlorophenol, (c) 2,4-dichlorophenol, (d) 2,4,5-trichlorophenol.

에 비하여 높은 농도에서 bioluminescence가 영향을 받았다. 따라서 luminescent bacteria 중 본 연구에 사용한 *Photobacterium phosphoreum*은 CAHs에는 그다지 민감하게 반응하지 않는 것으로 조사되었다. 그렇지만 bioluminescence intensity는 각 독성물질에 대하여 특이적으로 반응하며 이러한 특성은 각 독성물질의 농도 및 독성 정도를 측정하는데 있어 매우 중요할 뿐 아니라 독성물질의 real time assay sensor를 개발하기 위한 고정화 세포의 이용 가능성을 제시해 준다.

고정화 세포의 독성물질과의 상관 관계

독성물질에 대한 발광 현상의 감소는 Gamma value로 분석하였으며 농도에 대한 linear 그래프를 얻었다. Bioluminescence intensity의 감소를 측정하는 한 방법인 Gamma(γ) value로부터 EC_{50} 를 계산하였다. 각 농도에서의 γ 값을 구하여 독성물질의 농도와 γ 값을 log-log graph로 나타낸 결과 역시 직선의 관계식이 성립되었다 (Fig. 5). 이 그래프에서 $\gamma=1.0$ 이 되는 독성 물질의 농도가 t시간 동안의 $EC_{50}(t)$ 값이다. 독성 시험에 이용된 5가지의 CAHs와 5가지의 chlorophenol 유도체로부터

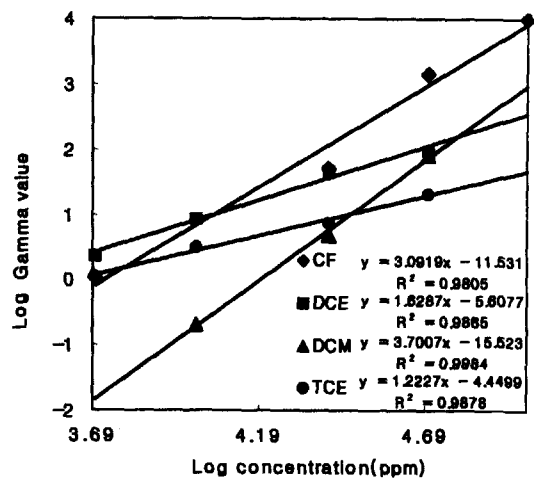


Fig. 5. The relationship between log concentration of toxic substances and the log gamma value for each CAHs. ◆, the gamma values for chloroform; ■, for 1,2-dichloroethane; ▲, for dichloromethane; ●, for trichloroethylene.

Gamma(γ) value를 구하고 이 값으로부터 $EC_{50}(3 \text{ min})$, $EC_{50}(10 \text{ min})$, $EC_{50}(20 \text{ min})$ 을 구하여 Table 1에 나타

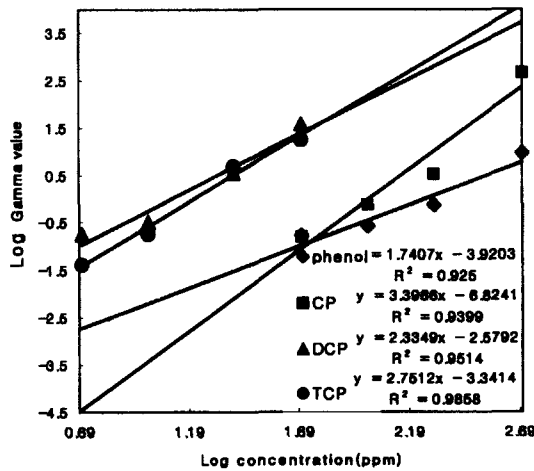


Fig. 6. The relationship between log concentration of toxic substances and the log gamma value for each chlorophenol derivatives.

◆, the gamma values for phenol; ■, for chlorophenol; ▲, for 2,4-dichlorophenol; ●, for 2,4,5-trichlorophenol.

내었다. EC₅₀값이 작은 물질일수록 bioluminescence에 더 강한 독성 작용을 한다. 따라서 Table 1에서 보듯이 20분 동안의 EC₅₀로 볼 때 CAHs의 경우는 1,2-dichloroethane, trichloroethylene, chloroform 및 dichloromethane의 순서로 독성이 약하게 작용하였고 chlorophenol 유도체의 경우는 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dichlorophenol, chlorophenol 및 phenol의 순서로 독성이 약하게 작용하였다. 이것은 탄소 수가 같을 때 chlorine substitution이 많을수록 독성도 증가하는 경향이 있음을 의미한다. 또한 측정시간이 길어질수록 더 낮은 농도까지 독성물질을 monitoring 할 수 있었으므로 측정시간을 증가시킴으로서 민감도를 증가시킬 수 있다는 결론을 얻었다. 이와 같은 결과로부터 수질 중의 독성물질의 유무

를 알 수 있을 뿐 아니라 독성물질이 단일종일 경우 독성 정도와 농도 등을 monitoring 하는데 strontium alginate에 고정된 *P. phosphoreum*의 사용이 가능한 것으로 생각된다.

다중회귀분석에 따른 QSAR 모델

QSAR 모델을 이용하여 화학적 구조와 생물학적 활성 사이의 양적 상관관계를 조사하고 이를 다중회귀분석에 의하여 분석하면 실험을 하지 않고도 독성물질의 독성도를 나타내는 EC₅₀를 예측할 수 있다. 실험값으로 구한 4가지 CAHs의 EC₅₀과 분자연결지수를 회귀 분석하였다. 분자연결지수의 원리는 분자의 뼈대와 뼈대의 분할차수에 기초를 두고 있다. 예를 들어 유기 분자의 탄소나 헥테로원자와 같은 무수원자에 의해 계산된다. 이 때 'X'에서 'm'은 m차수의 분자연결지수를 의미하는 것으로 2차, 3차 또는 그 이상의 연결지수와 같은 고차 분자연결지수는 연속적인 이웃한 m개의 원자에 부여된 기수를 계산하여 계산할 수 있다. 또한, 탄소가 아닌 원자와 다중 결합된 원자를 구분하기 위하여, 윗첨자 v를 이용하여 원자가지수(valence index)를 계산한다. 즉 분자연결지수를 contribution 함수로 한 것은 탄화수소의 구조를 바탕으로 하여 생물학적 특성을 예측할 수 있다는 것이다. 본 연구에서는 각 CAHs에 대한 분자연결지수('X', 'X', 'X', 'X', 'X', 'X', 'X', 'X')와 극성도(P)를 김 등[10]이 계산한 값을 이용하였다(Table 3). 이 때 EC₅₀은 상관관계가 가장 좋은 20분 동안의 EC₅₀으로 계산하였으며 분자나 기능 그룹을 바탕으로 compound의 독성을 비교하기 위하여 mg/L 단위였던 것을 mmol/L로 전환하였다. 유의차 5%이내에서 ANOVA test한 결과 'X'와 'X'에 대한 회귀 계수는 1차 선형 효과 및 반응 표면이 곡면을 이루는 2차 모형의 곡선 효과 분석치와 상호작용이 있었으며

Table 1. EC₅₀ of each CAHs at 3 min, 10 min and 20 min

Toxic substances	3 min		10 min		20 min	
	EC ₅₀ (× 10 ⁴ ppm)	R ²	EC ₅₀ (× 10 ⁴ ppm)	R ²	EC ₅₀ (× 10 ⁴ ppm)	R ²
Chloroform	0.8450	0.98	0.3677	0.96	0.5363	0.98
Dichloromethane	5.8302	0.92	1.1040	0.95	1.5654	0.99
Dichloroethane	10.7847	0.58	0.3164	0.88	0.2774	0.99
Trichloroethylene	46.5707	0.16	0.9077	0.94	0.4359	0.99

Table 2. EC₅₀ of each chlorophenol derivatives at 3 min, 10 min and 20 min

Toxic substances	3 min		10 min		20 min	
	EC ₅₀ (× 10 ² ppm)	R ²	EC ₅₀ (× 10 ² ppm)	R ²	EC ₅₀ (× 10 ² ppm)	R ²
Phenol	4.2417	0.97	3.1328	0.94	1.7871	0.93
Chlorophenol	1.4274	0.78	1.0344	0.93	1.0212	0.94
Dichlorophenol	0.3562	0.98	0.1503	0.98	0.1272	0.95
Trichlorophenol	0.2062	0.87	0.1266	0.91	0.0777	0.99

Table 3. The connectivity indices and polarizability of CAHs

Hydrocarbon	⁰ X	⁰ X ^v	¹ X	¹ X ^v	² X	² X ^v	³ X _c ^v	³ v	P
Dichloromethane	2.71	2.97	1.41	1.60	0.71	0.91	0.00	0.00	-0.037
Chloroform	3.58	3.98	1.73	1.96	1.73	2.23	0.58	0.84	-0.104
1,2-Dichloroethane	3.41	3.68	1.91	2.10	1.73	1.13	0.00	0.00	0.300
Trichloroethylene	4.28	4.48	2.27	2.08	3.00	1.62	0.41	0.37	-0.386

Table 4. QSAR for molecular connection indices and EC₅₀ of CAHs to *P. phosphoreum*

Equation	p{EC ₅₀ (20 min)}=	n	r ²
1	3.994 - 1.817 ⁰ X + 0.337(⁰ X) ²	4	0.99
2	6.717 - 3.257 ⁰ X ^v + 0.511(⁰ X ^v) ²	4	0.99
3	1.594 + 5.651 ³ X _c ^v - 9.058(³ X _c ^v) ²	4	0.97
4	1.594 + 3.621 ³ X _c ^v - 3.984(³ X _c ^v) ²	4	0.97

Table 5. Octanol/water partition coefficients (log P) of chlorophenol derivatives

Chlorophenol derivatives		Log P
Substituent position (s)	Number of chloride	
	0	1.48
2	1	2.17
2, 4	2	3.08
2, 4, 6	3	3.69

¹X와 ²X에 대한 회귀 계수는 1차 선형 효과와 그리고 ²X^v, ³X_c, ³X_c^v, P에 대한 회귀 계수는 2차 모형의 곡선 효과 분석치와 상호작용이 있었다. Table 4는 5% 유의차 이내에서 상관관계를 보인 변수들 가운데 r² 값이 0.95 이상인 상관관계식을 나타낸 것이다. 본 연구에서는 ⁰X, ⁰X^v, ¹X, ²X와 ³X_c^v는 luminescent bacteria의 EC₅₀와 1차 상관관계를 ⁰X, ⁰X^v, ²X^v, ³X_c, ³X_c^v와 P는 2차 상관관계를 나타내었다. 이것은 탄소원자가 아닌 원자나 다중 결합된 원자는 2차 모형의 곡선 효과로 단일의 탄소결합은 1차 선형효과로 생물학적 특성의 예측에 기여하는 것을 의미한다. 실험값으로 구한 4가지 chlorophenol 유도체는 contribution 함수로서 각 chlorophenol 유도체가 세포의 지질막을 통해 확산되는 정도를 나타내는 octanol/water partition coefficients(log P)를 선택하여 회귀분석 하였다. 이 때 EC₅₀는 20분 동안의 값으로 하였으며 분자나 기능 그룹을 바탕으로 compound의 독성을 비교하기 위하여 mg/L 단위였던 것을 mmol/L로 전환하였다. 각 chlorophenol 유도체의 octanol/water partition coefficients는 Govers 등[11]이 구한 값을 이용하였다 (Table 5). Chlorophenol 유도체의 EC₅₀는 유의차 5% 이내에서 ANOVA test한 결과 log P 대하여 2차 모형의 곡선효과 분석치와 상호작용을 보였다. 또한 EC₅₀값으로 비교해 보았을 때 chlorine substitution과 독성 정도 역

Table 6. QSAR for EC₅₀ and the octanol/water partition coefficient (log P) and N of chlorophenol derivatives to *P. phosphoreum*

Equation	p{EC ₅₀ (20 min)}=	n	r ²
1	2.761 + 0.969(log P) - 0.402(log P) ²	4	0.99
2	3.505 - 0.806N	4	0.94
3	3.338 - 0.230N - 0.202N ²	4	0.99
4	5.037 - 1.036(log P) - 4.177 × 10 ⁻² N	4	0.95

*N is the number of chlorine compound.

시 1차와 2차의 상관관계에서 유의차가 5% 이내였으므로 log P와 chlorine substitution을 contribution 함수로 하여 QSAR 모델을 조사하였다. Table 6는 p(EC₅₀)를 종속변수 y로 하여 ANOVA test한 결과 유의차 5%이내에서 octanol/water partition coefficients와의 상관관계를 Design Expert 프로그램을 사용하여 다중회귀분석하고 반응 변수에 대한 모델을 추정한 회귀식을 나타낸다.

요 약

*Photobacterium phosphoreum*의 bioluminescence 감소 정도를 이용하여 수계의 독성물질을 monitoring하는 방법은 반응이 민감하면서도 빠르다는 장점을 가지고 있다. 그러나 각 독성물질의 독성 정도를 나타내는 EC₅₀을 구하는 과정이 선행되어야 한다. QSAR 모델을 이용하면 실험적인 방법을 사용하지 않고도 EC₅₀값의 예측이 가능하다. CAHs의 경우 분자연결지수를 contribution 함수로 하였을 때 유의차 5%이내에서 ⁰X, ⁰X^v, ¹X, ²X 및 ³X_c^v는 luminescent bacteria의 EC₅₀와 1차 상관관계를 ⁰X, ⁰X^v, ²X^v, ³X_c, ³X_c^v와 P는 2차 상관관계를 나타내었다. 즉, 탄소 원자가 아닌 원자나 다중 결합된 원자는 2차 모형의 곡선효과로 단일의 탄소결합은 1차 선형효과로 생물학적 특성의 예측에 기여하는 것을 의미한다. Chlorophenol 유도체는 octanol/water partition coefficient를 contribution 함수로 하여 유의차 5%이내에서 log P에 대하여 2차 모형의 곡선 효과 분석치와 상호작용을 보였으며, 역시 높은 상관관계(r²=0.99)를 얻을 수 있었고 chlorine compound의 개수와도 상관관계를 보였다(r²≥0.94). 이 결과는 세포막을 통해 독성물질이 확산하는 능력이 좋을수록 chlorine substitution이 많을수록 독성이 강하다는

경향을 잘 나타내고 있기도 하다.

감사의 글

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

REFERENCES

1. Chun, U. H., N. Simonov, Y. Chen, and M. L. Britz. 1996. Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Resources, Conservation and Recycling* **18**: 25-40.
2. DiCarlo, J. F. and F. W. Oehme. 1984. Drug and chemical toxicology, pp. 1-36. *Toxicity Screening Procedures Using Bacterial System*. Vol. 1.
3. Fernández, A., C. Tejedor, F. Cabrera, and A. Chordi. 1995. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using *Photobacterium phosphoreum*. *Wat. Res.* **29**(5): 1281-1286.
4. Govers, H., C. Ruepert, T. Stevens, and C. J. van Leeuwen. 1986. Experimental determination and prediction of partition coefficients of thioureas and their toxicity to *Photobacterium phosphoreum*. *Chemosphere* **15** (4): 383-393.
5. Kamlet, J. M., M. Doherty, G. D. Velth, R. W. Taft, and M. H. Abraham. 1986. Solubility properties in polymers and biological media. 7. An analysis of toxicant properties that influence inhibition of bioluminescence in *Photobacterium phosphoreum* (The Microtox test), *Environ. Sci. Technol.* **20**: 690-695.
6. Kim, J. and H. B. Moon. 1997. Prediction and comparison of of CAHs using QSAR methods. *Environ. Eng. Research.* **19**(3): 361-370.
7. Kudryasheva, N. S., V. A. Kratasyuk, and P. I. Bulobrov. 1994. Bioluminescent analysis. The action of toxicants: Physical-chemical regularities of the toxicants effects. *Anal. Lett.* **27**(15): 2931-2947.
8. Lee, J. H. and U.-H. Chun. 1996. Monitoring of environmental pollutants with *Photobacterium phosphoreum* immobilized on strontium alginate (I)(II). *The Kyung Hee J. Genet. Mol. Biol.* **8**: 48-55.
9. Paton, G. I., C. D. Campbell, L. Anne Glover, and K. Killham. 1995. Assessment of bioavailability of heavy metals using *lux* modification constructs of *Pseudomonas fluorescens*. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 52-56.
10. Randic, M. J. 1975. On characterization of molecular branching. *J. American Chem. Soc.* **97**: 6609-6615.
11. Tabak, H. and R. Govind. 1991. Determination and prediction of biodegradation kinetics using structure-activity relationship model. *Gas Oil Environ. Biotechnol.* **4**: 129-152.
12. Turner, P. J. 1989. Waster treatability of spent solvent other organic wastewater. *Environmental Progress* **8**(2): 113-119.
13. Yuan, X., G. Lu, and P. Lang. 1997. QSAR study of the toxicity of nitrobenzenes to river bacteria and *Photobacterium phosphoreum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**: 123-127.

(Received November 12, 1998)