한국생물공학회지 제 15권 제 1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 1, 49-54(2000)

*Photobacterium phosphoreum*을 고정화하기 위한 Carboxymethylcellulose Sodium Salt (CMC) 담체의 이용성 연구

이 용 제 · 정 성 제 · 허 문 석 · †전 억 한
경희대학교 생명과학부 식품가공학과
(접수 : 2000. 1. 11., 게재승인 : 2000. 2. 21.)

Studies on the Use of Carboxymethylcellulose Sodium Salt Matrix for the Immobilization of *Photobacterium phosphoreum*

Yong-Je Lee, Seong-Je Jung, Mun-Suk Her and Uck-Han Chun†
Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon 440-701, Korea
(Received : 2000. 1. 11., Accepted : 2000. 2. 21.)

Bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* has been used for the detection of pollutants in the environment. Immobilization method was used to maintain the stability of bioluminescence of *P. phosphoreum*. The carboxymethylcellulose was investigated to find out whether it was suitable for the immobilization of *P. phosphoreum* as a matrix without disturbing the bioluminescence emission. A maintenance of bioluminescence was determined from the *P. phosphoreum* immobilized on the various concentrations of carboxymethylcellulose. A relatively high bioluminescence intensity was shown with immobilized cells on 1%(w/v) carboxymethylcellulose. The effect of carboxymethylcellulose concentrations on the sensitivity of Cr-compounds including Na_2CrO_4, K_2CrO_4, CrO_3, $CrK(SO_4)_2$ and $CrCl_3$ to the bioluminescence intensity. The calculated EC_{50} showed that the linear relations between such substances and bioluminesence intensity were established.

Key Words : bioluminescence, immobilization, carboxymethylcellulose matrix, EC_{50}

서 론

여러 가지 곰팡이, 해양 미생물, 해파리, 갑각류, 개똥벌레는 생체발광(bioluminescence) 능력을 가지고 있으며, 이러한 발광능력은 ATP를 사용하는 효소반응에서 luciferin을 활성화시켜 산소와 luciferase에 의해 발광하게 된다(1-3). 발광하는 색은 각각의 종마다 틀리며 이는 luciferase의 구조상 차이가 있기 때문이다. 연한 청록색을 발광하는 *Photobacterium phosphoreum* 은 심해물고기의 장내에 서식하는 미생물로서 수계의 독성 모니터링에 사용할 수 있다(4). 발광미생물(luminescent bacteria)을 이용한 독성 모니터링은 독성물질에 의해 bioluminescence가 민감하게 반응함으로 정확하고 신속하게 독성물질 측정을 할 수 있으며 재대 배양을 통해 경제적으로 저렴하게 재생산 할 수 있는 장점이 있다(5). 이러한 독성 모니터링을 하기 위해선 bioluminescence의 안정성을 높이는 것이 선행되어야 한다. 고정화는 정해진 공간 안으로 미생물의 이동을 제한하는 것으로 높은 bioluminescence를 유지할 수 있으며 미생물의 재사용이 가능함으로 독성 모니터에 적합하다(6). 고정화 담체의 선정은 중요하며 미생물의 생리활성에 영향을 주지 않는 담체로 하여야 한다. 다공성 담체안에 세포를 물리적으로 포획시키는 방법은 가장 많이 사용하는 방법으로서 고정화 담체로는 해조류에서 추출한 물질인 alginate와 전분 물질들(starch-based matrices)이 주로 사용되어진다 본 실험에서는 고정화 담체로 Carboxymethylcellulose(CMC)를 선정하였으며, cellulose의 유도체인 CMC 담체는 세포 융화에 적합하고, 세포방출을 조절하는데 잘 이용되어지며 생리학적으로 비활성인 polysaccharide이고 음이온의 전해물질로서 이온적 가교결합력을 가지므로 알루미늄이온, 구리이온 및 철이온과 결합된 aluminum-CMC, cupric-CMC 및 ferric-CMC가 *Bacillus, Methylosmus*의 고정화에 사용되어져 왔다(7,8). 또한 CMC 담체는 물에 잘 녹고 농도가 높아질 수록 점도가 크다. 이러한 점도는 cellulose 분자 중의 sodium glycolate group과 치환 될 수록 점도가 증가한다(9). *P. phosphoreum*의 발광기작에서 산소의 공급에 따라 bioluminescence의 intensity가 달라질 수 있다. 따라서 luminometer tube에 free cell의 상태에서는 시료의 유동이 생겨 시료에 산소가 불규칙적으로 공급되므로 일정한 bioluminescence를 측정하기 어려우므로 점도는 독성 물질을 모니터링하는데 있어 시료의 유

† Corresponding Author . Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon 440-701, Korea
Tel . 0331-201-2626, Fax : 0331-204-8116
E-mail : uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

동을 줄이는 중요한 역할을 한다.

외부독성에 민감하게 반응하는 *P. phosphoreum*에 고정화 담체를 이용한 독성 물질을 모니터링하기 위해선 bioluminescence에 최소영향을 주는 CMC담체의 %(w/v)농도와 독성물질에 민감한 CMC 담체의 %(w/v)농도를 결정하는 것이 선행되어야 한다. 본 실험에서는 CMC담체가 점도를 유지하며, 앞으로 진행될 0.1 M 이하농도 양이온(알루미늄이온, 구리이온 및 철이온)과의 이온가 교결합을 할 수 있는 농도인 1% (w/v)CMC 담체를 최소농도로 하였으며(10), 점도가 증가할 수록 *P. phosphoreum*을 분산시키기 어렵기 때문에 3%(w/v)이하 CMC담체농도에 *P phosphoreum*을 고정하여 가장 높은 bioluminescence를 유지하고, 독성 화합물인 Cr계통 화합물에 노출시켜 EC_{50} 값을 비교하였을 때 가장 독성물질에 민감하게 반응하는 최적 CMC 담체 농도를 결정하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 발광미생물(luminescent bacteria)은 *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852이며 대전 생명공학 연구소에서 분양 받아 NaCl 배지에 계대 배양하여 사용하였다. NaCl배지조성은 nutrient broth No. 2(meat peptone 4.3 g/L, casein peptone 4.3 g/L, sodium chloride 6.4 g/L) 12.5 g/L, sodium chloride 25.0 g/L, yeast nitrogen base (without amine acid) 5.0 g/L 및 glycerol 3.0 mL/L이며 0.2 M potassium phosphate buffer를 이용하여 pH 7.0으로 조절하였다. 보정한 후 삼각플라스크에 10 mL씩 분주하여 고압멸균(121℃, 15분)하여 사용하였다.

측정용 *P. phosphoreum*의 배양

고체 NaCl배지에 *P. phosphoreum*을 접종(streaking)한 후 4일 동안 배양시켜 얻은 자를 1 mm의 colony를 액체 NaCl배지에 접종하여 교반배양기(20℃, 100 rpm)에서 12시간 배양시킨 균주를 NaCl배지에 10%(v/v) 계대 배양하여 12시간 후(O.D660 = 1.70~1.95) 2.5%(w/v) NaCl 용액으로 10^{-2}배 희석시켜 100 μL를 취하고 bioluminescence를 측정하였다. Bioluminescence값을 측정하기 위하여 luminometer(Berthold Lumat LB 9507, Germany)와 luminometer tube(12×75 mm pyrex tube, Canada)를 사용하였다. Bioluminescence의 단위는 RLU(Relative Light Unit)이고 10초당 1.0 mL의 시료에서 나오는 광량을 mV로 나타낸 것으로 연구에 사용된 luminometer의 측정 범위는 0.0~4.0×10^5 RLU이며 측정시간을 0.1초로 하였을 때 3.5×10^5(RLU) 수치를 나타낸 것을 측정용 *P. phosphoreum*의 균 농도로 하였다

CMC 담체 고정화

세포를 고정화하기 위한 담체로는 Carboxymethylcellulose sodium salt(Wako Pure Chemical Industries, Japan)을 사용하였으며, CMC담체의 농도범위를 1.0%(w/v), 1.5%(w/v), 2.0%(w/v), 2.5%(w/v) 및 3.0%(w/v)로 하여 증류수로 녹인 다음 고압 멸균(121℃, 15분)을 하였다. 12시간 배양한 측정용 *P. phosphoreum* (O.D660 = 1.70~1.95)을 2.5%(w/v) NaCl에 10^{-1}배 희석하고 농도별 CMC 담체와 1:9의 비율로 혼합하여 luminometer tube에 100 μL를 취하여 bioluminescence의 변화량을 측정하였다.

독성물질(Cr) 농도범위 결정 및 준비

Cr계통 시약은 Na_2CrO_4, K_2CrO_4, CrO_3, $CrK(SO_4)_2$ 및 $CrCl_3$을 선정하여 실험하였다. 독성물질로 Cr을 선정하게 된 것은 산업폐수에 많이 용해되어 있는 중금속으로 Cr 화합물을 손쉽게 구할 수 있기 때문이다. 본 실험은 독성에 민감하고 고정화하기에도 적당한 CMC 담체의 농도를 결정하기 위한 실험으로 1×10^2, 1×10^3, 1×10^4 및 1×10^5 mg/L으로 Cr화합물의 농도를 차이가 크게 결정하였으며, 농도의 준비는 먼저 1×10^6 mg/L의 stock 용액을 만든 다음 희석하는 방법으로 각각의 농도를 준비하였다.

결과분석을 위한 EC_{50}값 산출

측정용 시료는 luminometer tube에 100 μL를 총 부피로 하였을 때 CMC, 세포:독성물질의 비를 8:1:1로 하여 측정하였으며, 기준시료에는 독성물질 대신에 독성물질의 용매인 증류수를 같은 부피로 하여 bioluminescence intensity의 변화량을 측정하였다.

EC_{50} 값은 일정시간 독성에 노출시켰을 때 bioluminescence의 50% 감소되는 독성성분의 농도를 말하는 것으로 Gamma(γ)값을 이용하여 구할 수 있다. γ 값은 일정시간동안에 측정되는 bioluminescence intensity에 대한 감소한 bioluminescence intensity의 비율로 EC_{50}값은 γ 값이 1.0이 되었을 때의 값이다. Cr 화합물의 각 농도에 대한 bioluminescence intensity의 감소 값을 20분 동안의 γ 값을 구하여 Cr 화합물의 log농도와 logγ 값을 이용해 log-log 그래프를 얻을 수 있다(11). γ 값을 구하기 위한 식은 다음과 같다

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

여기서 $\gamma(t)$는 t시간에 대한 γ 값을, R(t)는 t시간에 대한 기준시료의 값으로, 기준시료의 최초 bioluminescence intensity에서 마지막 bioluminescence intensity을 뺀 값을, L(0)는 독성을 첨가하지 않았을 때의 bioluminescence intensity를, L(t)는 t시간독성물질에 노출 후 bioluminescence intensity를 나타낸다.

결과 및 고찰

CMC 담체 농도에 따른 bioluminescence

CMC 담체의 최적 %(w/v)농도를 구하기 위해서 CMC 담체에 *P. phosphoreum*을 고정시켰을 때의 bioluminescence 유지도를 조사하였다 1.0%(w/v), 1.5%(w/v), 2.0%(w/v), 2.5%(w/v) 및 3.0%(w/v)의 CMC 담체 농도에 10^{-1}배 희석한 *P. phosphoreum* (O.D660 = 0.70~0.95)을 접종한 후 24℃에서 3시간 동안의 발광 유지도를 측정하였다. 배양에 최적온도인 20℃에서 배양한 세포를 24℃에서 측정한 것은 CMC 담체에 고정된 *P. phosphoreum*에 대한 독성물질의 측정을 실온에서 하기 때문이었다. Figure 1에서 보는 것처럼 초기 30분까지 bioluminescence intensity가 감소함을 볼 수 있었다 이것은 김현숙 외(12)가 연구한 발광미생물의 고정화에 주로 사용되어지고 있는 2.4%(w/v) sodium-alginate의 경우도 실온에서 비슷한 감소율을 보였다. Bioluminescence intensity의 감소율은 1%(w/v) CMC 담체에 고정한 경우 323952(RLU)에서 30분 후 219502(RLU)로 가장 적은

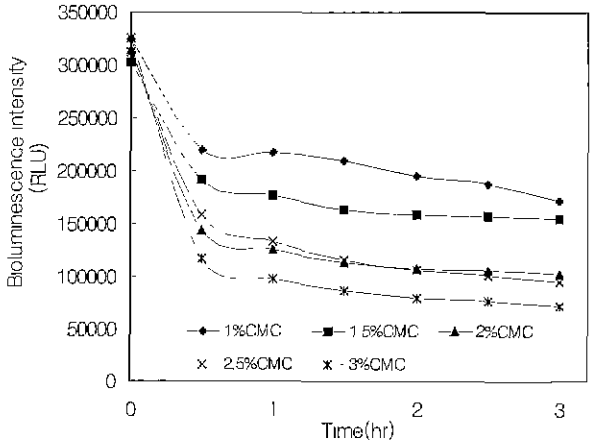

Figure 1. Decay of Bioluminescence at different CMC concentrations

Table 1. pH values of CMC at various concentrations

	CMC concentration(w/v)				
	1%	1.5%	2%	2.5%	3%
pH	6.92	6.65	6.48	6.25	6.02

감소를 볼 수 있었으며, 3%(w/v) 경우 325602(RLU)에서 30분 후 116581(RLU)로 감소하여 CMC의 농도가 증가할수록 bioluminescence intensity가 많이 감소되었다. 이는 첫째, *P. phosphoreum*의 pH의 영향 때문으로 사료되며, Lee. H. J(13)에 의하면 *P. phosphoreum*은 pH 4.0~10.0 범위에 20분 노출되었을 때 pH 7.0에서 최적이었으며, pH 6.0과 pH 8.0에서는 bioluminescence intensity가 50% 감소되는 특성을 가지고 있었다. 그러므로 Table 1에서 볼 수 있는 것처럼 1%(w/v) CMC는 pH 6.92이고 3%(w/v) CMC는 pH 6.02로 CMC농도가 증가할수록 CMC 담체가 pH 6.0에 근접했기 때문에 bioluminescence intensity가 감소하였다. 둘째, CMC농도가 증가할수록 점도가 증가했다. 이는 *P. phosphoreum*은 발광기작에서 활성화된 luciferin이 산소와 luciferase에 의해 발광하게 되는데 필요한 산소전달이 높은 점도에 의해 원활하지 못하기 때문이다(1). 30분 후의 bioluminescence의 안정성은 1~3%의 CMC 담체에서 비슷한 감소율을 보였다. 그러므로 독성모니터링을 하기 위한 일정한 bioluminescence의 유지는 1~3%에서 비슷했지만 초기 감소값이 1% CMC 담체에 *P. phosphoreum*을 고정화했을 때 bioluminescence intensity가 가장 적은 감소량을 보였다.

EC_{50}

*P. phosphoreum*이 고정된 각각의 1.0%(w/v), 1.5%(w/v), 2.0%(w/v), 2.5%(w/v) 및 3.0%(w/v)의 CMC 담체에 Cr 화합물을 1×10^2, 1×10^3, 1×10^4, 1×10^5 mg/L의 농도에 20분 노출시켜 bioluminescence의 intensity가 50% 감소되는 독성농도인 EC_{50}값을 산출하였다. 각 CMC 담체에서의 EC_{50}값을 구하기 위해서는 log (Cr-독성농도) 와 log r값에 의한 직선 추세선의 기울기를 먼저 산출하여야 하며, 산출된 추세선의 기울기에 따른 log (Cr-독성농도)와 log r값의 상관계수(R^2)를 비교할 수 있었다. 각 Cr-독성농도와 r값의 log-log 그래프에서 bioluminescence intensity가 감소할수록 γ 값이 증가하였다. 본 실험에서는 독성의 범위를 1×10^2~1×10^5 mg/L로 하여 일정하게 노출시킨 CMC 담체의 민감도를 결정하는 단순비교를 목적으로 하기 때문에 산출된 $-\gamma$ 값을 버리고 $+\gamma$ 값에 의한 log-log 그래프로 나타냈다. $-\gamma$ 값의 산출은 독성농도에서 20분 동안 bioluminescence의 감소율이 독성에 의해 50%감소되지 않았음을 의미한다. 독성농도와 γ 값과의 log-log 그래프에서 1×10^2~1×10^5 mg/L독성에 대한 γ 값을 점으로 도시한 추세선 그래프의 상관계수가 1.0이면 도시한 점들과 γ 값의 증가추세선이 일치하는 것으로써 독성농도의 증가에 따른 bioluminescence intensity가 일치한다고 해석할 수 있으므로 상관계수 값이 1.0에 가까울수록 γ 값이 추세선에 가깝다고 볼 수 있다 이를 통하여 각 CMC 담체농도와 독성과의 관계를 비교하였고, EC_{50}값의 비교를 통해서 각 독성물질에 민감하게 반응하는 CMC 담체의 농도를 결정하였다. 각 Cr-화합물에 대한 EC_{50}값과 상관계수(R^2)와 기울기는 Table 2에 나타내었고, log(Cr-독성농도)-log r의 그래프는 Figure 2에 나타내었다.

① Na_2CrO_4 Na_2CrO_4농도에 대한 CMC 담체농도의 상관계수, EC_{50}값의 변화량과 기울기값을 보면 1.0~2.0% CMC 담체의 상관계수는 1.0에 근접한 0.987~0.992이며, 2.5%와 3.0% CMC는 $-\gamma$ 값인 1×10^2 mg/L의 Na_2CrO_4농도값을 제외하고 1×10^3~1×10^5 mg/L의 Na_2CrO_4농도에 의한 값인 0.994와 0.808이었다. 농도별 Na_2CrO_4에 노출 후 20분의 EC_{50}값을 비교했을 때 1.0~2.0% CMC 담체에서 EC_{50} 값이 5.4~7.5 g/L로 비슷한 농도로 산출되었으나 1.0% CMC 담체가 가장 낮은 5.4 g/L로 산출되었고, 1.0% CMC담체가 1.5%, 2.0% CMC 담체보다 적은 농도의 Na_2CrO_4에서 민감하게 반응하여 Na_2CrO_4의 1×10^2 mg/L의 log γ 값이 증가하였기 때문에 기울기도 0.471로 가장 작게 산출되었다. 2.5%와 3.0% CMC 담체에서는 2.5% CMC 담체의 EC_{50}값이 17.9 g/L로 민감하였고, 1×10^2 mg/L의 Na_2CrO_4농도에서 log γ 값이 작게 산출되어 기울기값이 0.857로 크게 산출되었으며, 1.0%와 2.5% CMC 담체에서는 1.0% CMC 담체가 EC_{50}값이 작게 산출되었고, 1.0% CMC 담체에 대한 Na_2CrO_4의 1×10^2 mg/L의 log γ 값이 높게 산출됐기 때문에 기울기는 2.5% CMC 담체가 높게 산출되었다. 그러므로 Na_2CrO_4에서는 EC_{50}값이 가

Table 2. EC_{50} of Na_2CrO_4, K_2CrO_4, CrO_3, $CrK(SO_4)_2$ and $CrCl_3$ of immobilized *P. phosphoreum* with different CMC concentrations at 20 min

CMC (%w/v)	Na_2CrO_4			K_2CrO_4			CrO_3			$CrK(SO_4)_2$			$CrCl_3$		
	EC_{50} (g/L)	R^2	Slope	EC_{50} (g/L)	R^2	Slope	EC_{50} (g/L)	R^2	Slope	EC_{50} (g/L)	R^2	Slope	EC_{50} (g/L)	R^2	Slope
1.0	5.4	0.992	0.471	13.8	0.911	0.391	0.4	0.990	1.760	16.3	0.914	0.717	5.5	0.931	1.164
1.5	6.2	0.989	0.587	14.8	0.990	0.523	0.5	0.909	1.679	36.0	1.000	0.199	20.1	1.000	1.112
2.0	7.5	0.987	0.660	35.9	0.952	0.576	0.9	0.989	1.532	45.0	1.000	1.663	37.6	1.000	0.542
2.5	17.9	0.994	0.857	36.9	0.901	0.627	0.8	0.986	1.680	79.2	0.999	1.150	44.8	1.000	1.276
3.0	555.9	0.808	0.564	39.2	0.938	0.821	1.4	0.950	1.377	172.1	0.878	0.656	64.8	1.000	2.181

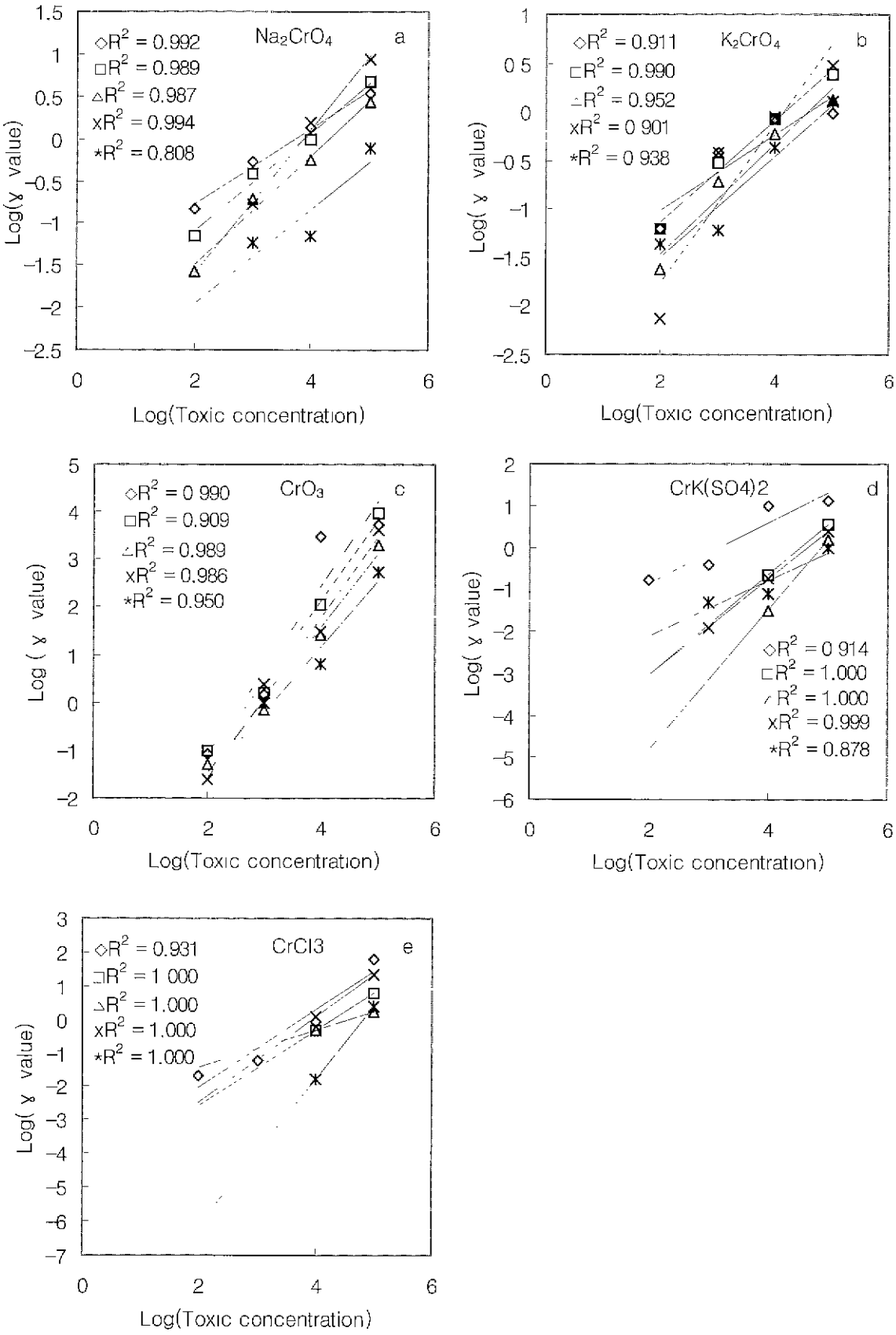

Figure 2. The log(γ value) and log(toxic concentration) graph of Na_2CrO_4, K_2CrO_4, CrO_3, $CrK(SO_4)_2$, and $CrCl_3$ on immobilized *P.phosphoreum* with different CMC concentrations. (◇) : 1% CMC, (□) 1.5% CMC, (△) · 2% CMC, (×) : 2.5% CMC, (·) 3% CMC

장 낮고 Na_2CrO_4의 가장 낮은 농도인 1×10^2 mg/L에서 log r 값이 높게 산출되고 낮은 기울기를 갖는 1.0% CMC 담체에서 가장 민감하였다(Figure 3 a).

② K_2CrO_4 : K_2CrO_4 농도에 대한 CMC 담체농도의 EC_{50}값의 변화량, 상관계수와 기울기를 볼 때 *1.0~3.0%의 CMC* 담체의 상관계수는 1.0에 근접했으며, 농도별 K_2CrO_4에 노출 후 20분의 EC_{50}값을 비교했을 때 1.0~3.0% CMC담체의 EC_{50}값은 1.0% CMC가 13.8 g/L이고 3.0% CMC는 39.2 g/L로 1.0% CMC가 낮게 산출되어 3.0% CMC 담체보다 1.0%의 CMC 담체가 K_2CrO_4 농도에서 민감하게 반응하였고, 1.0% CMC에서 1×10^2 mg/L의 K_2CrO_4농도에서 log r값이 높게 산출되었기 때문에 기울기는 1.0%CMC가 0.391로 3.0% CMC의 0.821보다 낮게 산출되었으므로 K_2CrO_4에서는 *1% CMC* 담체가 가장 민감하였다(Figure 3. b).

③ CrO_3 CrO_3 농도에 대한 CMC 담체농도의 EC_{50}값의 변화량, 상관계수와 기울기를 비교 해 볼 때 1.0~2.5% CMC 담체의 상관계수는 0.909~0.990으로 1.0에 근접했으나 3.0% CMC의 상관계수값은 0.950르 -γ 값인 1×10^2 mg/L의 CrO_3농도 값을 제외한 1×10^3~1×10^5 mg/L의 세 점에 의한 CrO_3농도값이었다 1.0 ~2.5% CMC 담체의 log-log 그래프에서 CrO_3농도 증가 대한 log r값의 기울기가 1.532~1.760으로 크게 산출되어 1×10^2~1×10^3 mg/L사이의 log r값의 범위가 -2~4로 큰 것으로 보아 CrO_3은 CMC 담체에 반응이 크다는 것을 알 수 있었으며, log- log 그래프에서 볼 수 있듯이 추세선의 기울기의 차이가 없으므로 1.0~3.0% CMC 담체에 10^2~1×10^3 mg/L의 CrO_3농도를 노출 후 20분의 EC_{50}값을 비교하였을 때 1.0% CMC 담체에서 0.4 g/L로 가장 낮게 산출되었다. 3.0%CMC 담체에서 1.4 g/L로 가장 높게 산출되었으므로 CrO_3에 대한 CMC의 민감도의 결정에 있어서 1.0% CMC 담체에서 가장 민감하였다(Figure 3. c).

④ $CrK(SO_4)_2$ $CrK(SO_4)_2$에서의 CMC 담체의 EC_{50}값의 변화량, 상관계수와 기울기를 비교해 보면, 농도별 CMC 담체의 $CrK(SO_4)_2$에 대한 상관계수는 1.5%와 2.0% CMC 담체에 노출된 1×10^2와 1×10^3 mg/L의 $CrK(SO_4)_2$ 농도가 -γ 값이 나왔기 때문에 1.0의 값이 산출되었고, 1.0~2.5% CMC 담체의 EC_{50}값은 *1.0% CMC* 담체가 16.3 *g/L*이었고, 2.5% CMC 담체가 79.2 g/L가 산출되어 1.0% CMC에서 가장 민감하게 산출되었다 1.0% CMC 담체가 1×10^2 mg/L의 $CrK(SO_4)_2$농도에 대한 log r 값이 -0.79로 높게 산출되어 0.717로 가장 작은 기울기값이 산출되었고, 3.0% CMC 담체는 EC_{50}값이 172.0 g/L로 가장 높게 산출되었으며, 1×10^2 mg/L의 $CrK(SO_4)_2$농도의 -r 값을 제외한 세 점에 의한 기울기가 0.878로 낮게 산출되어 1×10^2~1×10^5 mg/L농도의 $CrK(SO_4)_2$에서 둔감하게 반응하였으므로 $CrK(SO_4)_2$에서는 *1.0% CMC* 담체가 민감하게 반응하였다(*Figure 3. d*).

⑤ $CrCl_3$ 각 CMC 담체에 대한 $CrCl_3$의 EC_{50}값의 변화량, 상관계수와 기울기를 비교해 보면, 농도별 CMC 담체의 $CrCl_3$에 대한 상관계수는 1.0% CMC 담체를 제외한 1.5~3.0% CMC는 1×10^2, 1×10^3 mg/L의 농도에서 -γ이 산출되었으므로 두 농도의 γ 값은 버리고 1×10^4, 1×10^5 mg/L의 농도에 대한 상관계수 값인 1.0이었다. 1.5~3% 농도에서 상관계수가 1.0이므로 세점이상의 log r을 비교할 수 없으므로 EC_{50}값만으로 비교했을 때 *1.0% CMC* 담체의 EC_{50}값이 *5.5 g/L*로 가장 민감하게 반응하여 $CrCl_3$에서 민감하게 반응할 수 있는 CMC 담체의 농도는 1.0% 이었다(Figure 3. e).

요 약

1.0%(w/v)의 CMC 담체는 고정화를 유지할 수 있는 점도를 가지며 0.1 M 이하의 양이온과 이온가교결합을 할 수 있는 농도이다 *Luminometer tube*내의 시료에 유동을 최소화함으로써 산소의 공급을 일정하게 하여 *P. phosphoreum*을 고정화 30분 후 bioluminescence intensity가 안정되어 바로 측정할 수 있는 장점을 가지고 있었다. 1%(w/v) CMC담체는 pH 6.92로 최적조건인 pH 7.0에 근접했으며, 발광기작에 필요한 산소전달(oxygen transfer)이 1.5%(w/v)~3.0%(w/v) CMC담체보다 뛰어나 Bioluminescence intensity의 안정성을 부여하였다. Cr-화합물인 Na_2CrO_4 K_2CrO_4, CrO_3, $CrK(SO_4)_2$ 및 $CrCl_3$의 CMC담체에 대한 민감도는 γ 값을 이용해서 EC_{50}값으로 나타내었을 때 Na_2CrO_4, K_2CrO_4, $CrK(SO_4)_2$ 및 $CrCl_3$의 EC_{50}값이 1.0%(w/v)CMC에서는 5.4~16.3 g/L으로 1.5%(w/v)~3.0%(w/v) CMC에서는 6.2~555.9 g/L의 범위로 나타났다. 이것은 1.0%(w/v) CMC가 낮은 독성 농도에서 bioluminescence intensity가 50% 감소함을 알 수 있고, 상관계수(R^2)가 0.911~0.990으로 높게 산출되었다. 따라서 1%(w/v) CMC 담체가 *P phosphoreum*의 bioluminescence에 안정성을 주었으며, 독성물질에 가장 민감하다는 것을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Albert, L. L, D. L. Nelson and M. M. Cox (1996), Principles of Biochemistry, 2nd ed, p. 407.
2. Bronstein, I., J Fottin, P. E. Stanley, G. S A. B. Stewart and L. J Kricka (1994), Chemiluminescent and Bioluminescent : Reporter Gene Assays, *Anal. Biochem* **219**, 169-181.
3. Baker. J M, M. W. Griffiths. and K. L. Collins-Thompson (1992), Bacterial Bioluminescence . Applications in Food Microbiology, *J Food Prot.* **55**(1), 62-70.
4. Hasting, J. W., J. Mademsom and D. Paul (1987), Review, How are Growth and Luminescence Regulated Independently in Light Organ Symbionts?, *Symbiosis.* **4**. 3-24.
5. Chung, K. H, H. S. Kim, E. S. Lee, S. J. Jung, J. G Lee, E K Kim, and U. H. Chun (1999), Response of *Photobacterium phosphoreum* to Heavy Metal, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(3), 342-350
6. Michael, L S. and K Fiklet (1992), Bioprocess Engineering, pp 278-282, Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
7. Cumhur. C. and E Murat (1995), Stability and Controlled Release Properties of Carboxymethylcellulose-Encapsulated *Bacillus thuringiensis var. israelensis, pestic. sci.* **45**, 351-355
8. Prasad. M. P and M Kalyanasundaram (1995). Scanning Electron Microscopic Analysis and Swelling Behaviour of Ionotropically Crosslinked Carboxymethylcellulose and Carboxymethylcellulose-gelatin Matrices, *Carbohydrate Polymers.* **26**, 35-41.
9. Horner, S., J. Puls, B Saake, E. A. Klohn, and H. Thielking (1999), Enzyme-Aided Characterization of Carboxymethylcellulose, *Carbohydrate Polymers.* **40**, 1-7.
10. Elcin, Y. M., C. Cumhur and S C. Sacilik (1995), Aluminum Carboxymethylcellulose Encapsulation of *Bacillus sphaericus* 2362 for control of *Culex spp. Larvae, J. Economic Entomology.* **88**(4), 830-834.
11. 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,

In Toxicity screening procedures using bacterial systems (Dickson Liu, B. J. Dutka eds.), p. 65-76, Marcel Dekker Inc., New York.

12. Kim, H. S., S. J. Jung, K. H. Chung, and U. H. Chun (1999), The Effect of Storage Temperature on the Viability and Bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng*, **14**(1), 523-527
13. Lee, H. J. (1999), Studies on the Stability of Bioluminescence Produced from *Photobacterium phosphoreum* and Its Linear Relationship with Toxic Substances, M. S. Thesis, Dept. of Food science and Technology, Kyung Hee University, Suwon.