

*Pseudomonas fluorescens*에 대한 furfural의 독성효과에 관하여

金泰鎔 · 河永七 · 洪淳佑

(서울대학교 自然科學大學 微生物學科)

Toxic effects of furfural on *Pseudomonas fluorescens*

KIM, Tae Young, Young Chil HAH, and Soon Woo HONG

(Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences Seoul, National University)

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens, which had been known to be unable to degrade furfural, could utilize 0.03% of furfural as a sole carbon source in a culture with forced aeration.

Lag period of this strain was lengthened by low concentration of furfural and growth yield reduced.

High concentration of furfural over 0.1% showed killing effect on this strain.

Cells of higher metabolic activity and of earlier growth stage were affected more seriously.

The fact that even 0.05% of furfural showed no inhibition on respiration of this strain was confirmed with the data on respiration rate in Warburg manometer.

From these results, it was suggested that furfural show no inhibitory effect on external respiration activities of *P. fluorescens*.

緒 論

furfural의 독성에 관한 연구는 주로 포유동물과 효모균을 대상으로 이루어져 왔다. furfural이 동물에 대해 성장을 지연시키며 (Feron, 1979), 특정 효소의 활성을 감소시키고 (Kaminska, 1977, 1978, Jonek, 1975), hormone의 변화를 유발하는 (Brzezinski, 1978) 등의 독성효과를 나타낸다고 보고되었다. 효모균에 대해서는 해당과정을 억제하고 (Banerjee, 1981), cytochrome 계통을 억제하여 호흡을 감소시킨다 (Soboleva, 1973)는 보고가 있다. 이외에도 생합성의 영향을 준다는 보고도 있어서 여러 측면에서 독

성을 나타낸다고 볼 수 있다. 세균에 대한 효과에 관해서는 lysine 발효에 이용되는 균주의 성장을 억제하며, 돌연변이 유발물질로 작용한다 (Zdzienicka, 1978)는 보고등이 있다.

본 논문에서는 *P. fluorescens*가 furfural을 산화시켜 furoic acid를 거쳐 이용할 수 있음을 밝히고 이 균주가 furfural에 의해 어떻게 영향을 받는가를 살펴 보았다.

材料 및 方法

1. 균주와 배양

본 실험에서는 Han (1982)과 Lee (1982)에 의해 동정된 *Pseudomonas testosteroni*와 *Pseudom-*

onas fluorescens 균주를 사용하였다.

이들 균주의 배양에 사용된 기초배지의 조성은 다음과 같다.

KH_2PO_4 ; 1.0g, K_2HPO_4 ; 2.0g, KNO_3 ; 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.2g, NaCl ; 0.2g, CaCl_2 ; 0.02g, D.W.; 1l.

상기 균의 배양은 실험의 목적에 따라 진탕배양(rpm, 180)하거나 기포발생기를 사용하여 통기배양하였다.

배양시의 pH는 7.0, 온도는 30°C였다.

접종은 영양사면배지에서 2일간 배양한 균체를 흡광도 0.1이 되게 멸균증류수에 현탁하여 배지 100ml당 2ml의 비율로 사용하였다.

2. Furfural의 성장억제효과

① furoic acid, glucose, succinate, glutamate, 및 yeast extract를 영양원으로 하여 첨가된 furfural의 효과에 대해 조사하였다.

② glucose를 영양원으로 하여 배양하며 균체의 각 성장시기에 따라 furfural을 첨가하여 그 효과를 조사하였다.

③ 최고성장농도의 glucose를 영양원으로 하여 배양하였을 때 첨가된 furfural과 균체 수율과의 관계를 조사하였다.

④ 균체량은 흡광광도계(CE 272 Linear Readout UV spectrophotometer)로 610nm에서 측정하였다.

⑤ 배양액중의 furfural과 furoic acid의 양은 Hong 등 (1981)의 방법에 따라 배양액을 원심분리(8,000rpm, 15min)하고, 상등액을 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Waters Associates)로 정량하였다. 이때 HPLC의 운전조건은 다음과 같다.

solvent : 70% methanol (v/v) 1ml/min

column : μ -Bondapak C_{18}

detector : UV 254nm

⑥ 본 실험에 사용된 furfural은 증류하여 1% 용액을 만들어 사용하였다.

3. Furfural의 치사효과

기초배지에 furfural을 첨가하고 균체 현탁액을 접종한 후 시간별로 시료를 채취하여 기초배지에 0.05%의 furoic acid와 1.8%의 한천을 넣어 제조한 평판배지에 희석평판법으로 접종하고

30°C에서 4일간 배양하여 생성된 colony의 수를 측정하였다.

① 첨가된 furfural의 농도와 생존률과의 관계를 30°C에서 조사하였다.

② 0.3%의 furfural이 첨가된 경우, 각 온도별 생존량과 30°C에서 영양원에 따른 생존량을 측정하였다.

③ 균체의 각 성장시기별로 배양액을 원심분리(8,000rpm, 15min)하여 균체를 수확하여 0.3%의 furfural이 첨가된 배지에서의 시간별 생존량을 조사하였다.

4. 호흡률에 대한 furfural의 효과

Umbreit 등 (1951)의 방법에 따라 Yanaco respirometer를 이용하여 *Pseudomonas fluorescens*의 호흡률에 대한 furfural의 효과를 조사하였다.

Warburg flask 내의 조성은 다음과 같다.

주실 : 기질 (1.25% glucose) + furfural 2.0ml

부실 : 20% KOH 용액 0.4ml

측실 : 균체 현탁액 0.5ml

균체 현탁액은 대수기(흡광도 0.3)의 배양액을 원심분리하여 균체를 수확하고 인산염 완충용액(0.05M, pH7.0)으로 세척한 후 5배로 농축하여 사용하였다.

30°C 항온수조에서 10분간 진탕한 후 측실의 균체 현탁액을 주실에 섞어 넣고 일정시간 간격으로 산소소모량을 측정하였다. 산소소모량은 Brodie 액 높이의 변화로써 측정하였다.

thermobarometer는 균체현탁액과 기질대신 완충용액을 사용하였다.

結果 및 考察

1. Furfural의 성장억제효과

*P. fluorescens*는 Han(1979, 1982)의 보고에서 furfural을 유일한 탄소원으로 이용하여 자랄 수 없으나 furoic acid는 이용할 수 있다고 했다. 본 실험에서는 배양조건을 약간 바꾸어 0.03%의 furfural을 탄소원으로 하여 통기배양하였을 때 진탕배양한 결과와는 달리 약간의 생장이 일어났다(Fig. 1). 잠재기동안 대부분의 furfural이 분해되었고 약간의 furoic acid가 축적되었다가 대수기를 거치며 모두 소비되었다. 즉 furfural

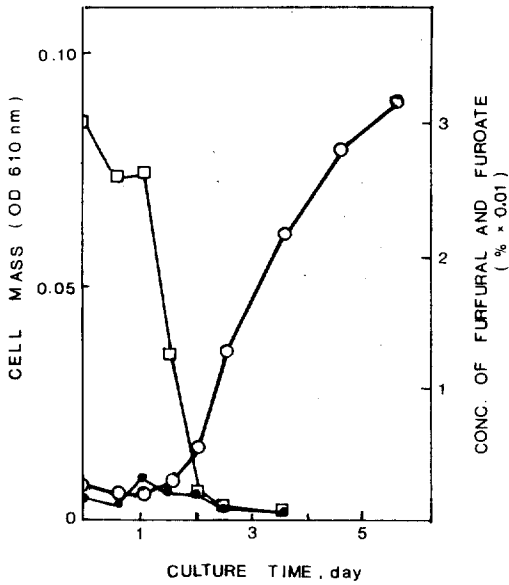


Fig. 1. Growth of *Pseudomonas fluorescens* in furfural basal medium.

furfural concent; -□-
 furoate concent; -●-
 growth curve; -○-

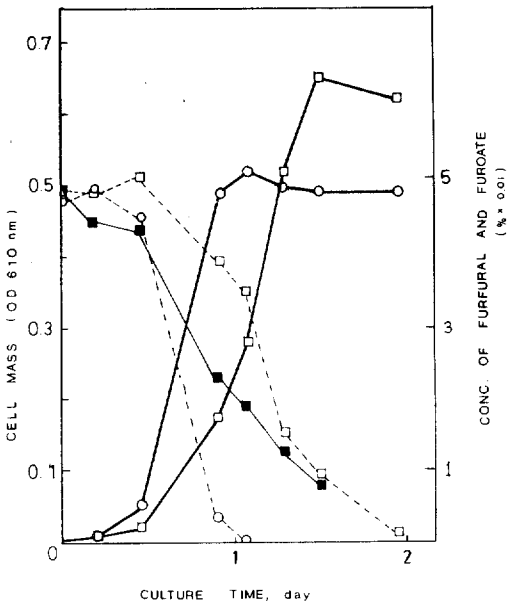


Fig. 2. Growth of *Pseudomonas testosteroni* on furoate basal medium and furfural-furoate basal medium.

growth curve on furoate; -○-
 growth curve on furfural-furoate; -□-
 furfural content; -■-
 furoate contents; dotted lines
 culture condition; shaking culture (rpm 180)

이 furoic acid를 거쳐 산화되었다고 추정된다. 이와같이 furfural을 분해할 수 없다고 알려졌던 균주가 호조진하에서는 furfural을 탄소원으로 이용할 수 있다는 것은 근본적으로는 이 균주가 furfural을 이용할 수 있으나, 동물 및 효모균에 대한 생장억제효과가 이 균주에 대해서도 동일하게 나타난 것이 아닌가 생각된다.

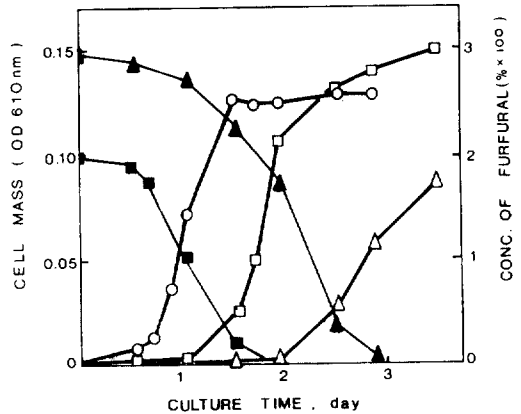


Fig. 3. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on furoate basal medium with various contents of furfural.

circle; no furfural, square; 0.02%, triangle; 0.03% open; growth curve, closed; furfural contents

이를 확인하기 위해 furoic acid를 영양원으로 하였을 때 furfural 첨가에 의한 생장의 억제효과를 살펴보았다. 그 결과 furfural을 유일한 탄소원으로 이용하는 *P. testosteroni*와 *P. fluorescens* 모두의 잠재기가 연장되었다(Fig. 2, Fig. 3). 특히 *P. testosteroni*가 0.05%의 furfural에 의해서 잠재기가 8시간 정도 길어진 것에 비해 *P. fluorescens*는 0.03%의 furfural에 의해 그일 정도 잠재기가 연장되었다. 이것은 *P. fluorescens*가 *P. testosteroni*에 비해 furfural에 대한 감수성이 더 큰 때문이라고 생각된다. 또한 이러한 감수성의 차이가 furfural 분해능의 차이로 나타날 수도 있다. 즉 고농도의 furfural에 의해서 생장이 지연되지 않는 *P. testosteroni*의 furfural 분해속도가 *P. fluorescens* 보다 빨라진다.

또한 glucose, glutamate, succinate와 yeast extract를 영양원으로 한 경우도 비슷한 현상이 나타났다. 즉 영양원의 성분과 furfural의 억제

효과와의 사이에는 별다른 관계가 없는 것으로 생각된다.

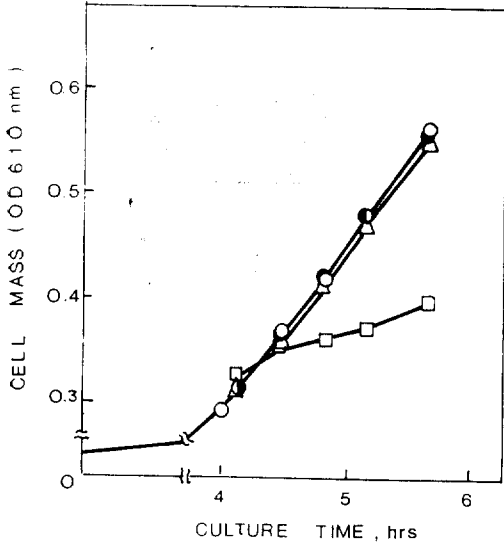


Fig. 4. Growth inhibitory effect of furfural on *Pseudomonas fluorescens* at exponential phase.
 concentration of furfural
 0%: ○, 0.01%: □, 0.02%: ●, 0.03%: △

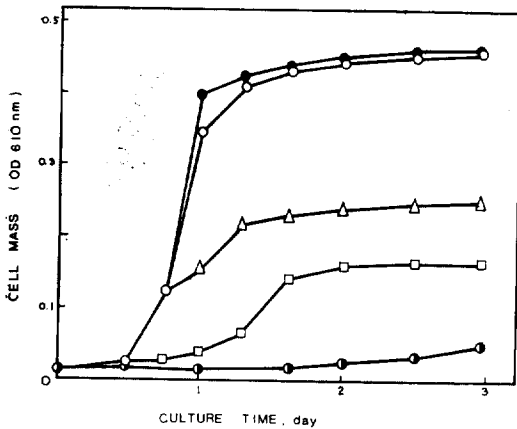


Fig. 5. Effect of furfural added at different growth phases of *Pseudomonas fluorescens*.
 added at initial phase; ○-○-
 lag phase; □-□-
 exponential phase; △-△-
 stationary phase; ●-●-
 not added; ●-●-

일반적으로 독성물질은 왕성히 성장하는 세포에 대해 그 독성효과를 강력히 나타낸다고 알려져 있다. 그러나 *P. fluorescens*의 성장초기에 강력한 효과를 나타내는 0.02%의 furfural이 대수기에서는 별로 성장지연효과를 나타내지 않았다 (Fig. 4). 한편 균체의 각 성장시기에 첨가된 furfural의 영향을 살펴보면 Fig. 5에서와 같이, 배양초기와 잠재기에는 상당한 성장 지연효과를 나타내는데 비해 대수기에서는 지연기간이 길지 않았다. 이것은 낮은 농도의 furfural이 첨가되었을시 균체량과 적응에 의한 분해능 등과 관계가 있는 것이며, 균체량이 많은 경우 furfural이 빨리 분해되어 그 영향이 경감되는 것이라고 생각된다. 또한 furfural이 첨가된 시기에 따라 최종 균체량도 크게 차이가 나타났다. 잠재기가 길어질수록 균체 수율은 감소하는 것으로 나타났고 첨가된 furfural 양이 증가할수록 잠재기가 연장되며 최종 균체수율은 반비례적으로 감소하였다 (Table 1).

이상의 결과를 보면, 균체의 성장시기에 따른 생리적인 상태의 차이에 따라 furfural의 억제효과 차이가 나타난다고 볼 수 있다. furfural이 성장초기의 균체에 대해 성장에 필요한 물질의 합성을 저해 혹은 지연시킴으로써 그 효과를 나타낸다고 생각된다.

2. Furfural의 치사효과

Table 2.는 *P. fluorescens*에 대한 furfural의 치사효과를 나타낸 것으로서 0.3% 이상의 농도에서는 상당한 치사효과가 나타났다. 또한 furfural의 치사효과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 온도에 따라 크게 차이가 나는데 *P. fluorescens*

Table 1. Lag period and growth yield of *Pseudomonas fluorescens* on glucose (2%) basal medium with various contents on furfural.

Conc. of furfural (%)	Lag period (day)	% Growth yield
0	0.5	100
0.01	0.5	100
0.03	2	84.5
0.05	4	65.5
0.07	5.5	18.2
0.10	10	3

Table 2. Bacteriocidal effect of furfural on *Pseudomonas fluorescens*.

Conc. of furfural(%)	Contact period (min)				
	0	30	60	90	120
0	100	102.7	108.1	83.2	94.7
0.1	100	72.6	70.0	60.2	34.9
0.3	100	55.0	43.0	17.7	3.7
0.5	100	24.9	4.1	0.1	0.0
0.7	100	14.2	0.2	0.0	0.0
1.0	100	2.7	0.0	0.0	0.0

Survival ratio (%)

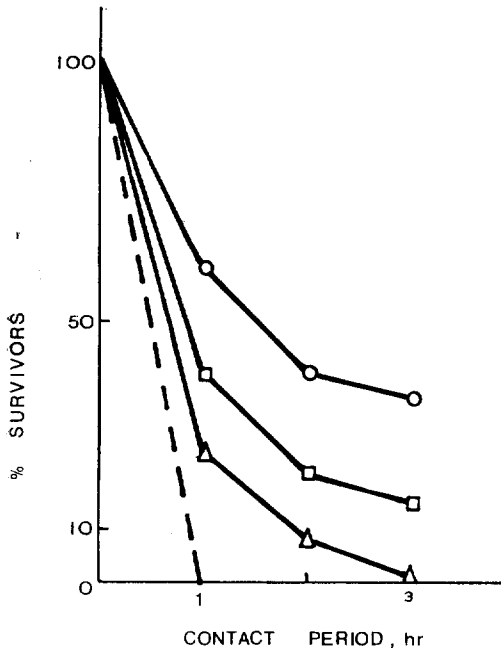


Fig. 6. Bacteriocidal effect of furfural (0.5%) on *Pseudomonas fluorescens* at various temperatures.

4°C; -○-, 20°C; -□-, 30°C; -△- dotted line; 30°C, glucose added

Table 3. Bacteriocidal effect of furfural with some organic nutrients on *Pseudomonas fluorescens*.

Nutrient added	Contact period(hr)			
	0	1	2	3
No	100	56.2	27.7	23.6
Furoic acid	100	41.1	37.3	21.9
Glutamate	100	50.4	35.6	31.7
Glucose	100	24.8	4.7	0.9

survival ratio in %

의 최적생장온도인 30°C에서 가장 치사율이 높았고 대사활성도가 낮은 4°C에서 가장 낮았다. 30°C의 경우 glucose가 첨가된 경우는 더욱 치사율이 높았다. 이것은 확실하게는 알 수 없으나 glucose가 이용되어 대사활성도가 높아진 결과에서 유래된 것이 아닌가 생각된다. 한편 영양원의 종류에 따른 치사효과는 Table 3에서 보는 바와 같이 glucose가 첨가된 경우 가장 치사율이 높았다.

한편 생장시기에 따른 furfural의 치사효과를 살펴보면 Fig. 7에서와 같이 잠재기와 이른 대수기에서의 균체가 치사율이 높았다. 잠재기의

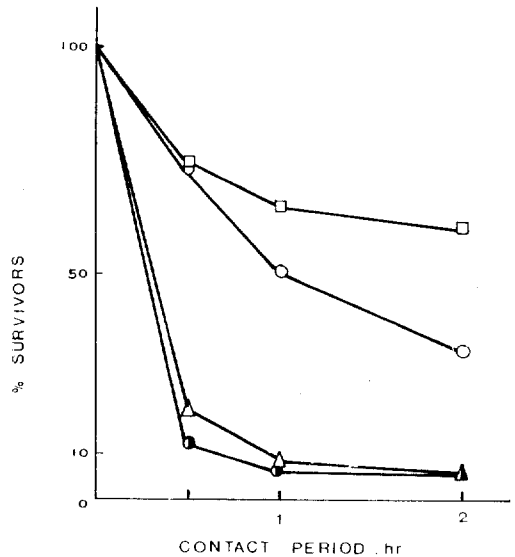


Fig. 7. Bacteriocidal effect of furfural (0.3%) on *Pseudomonas fluorescens* at various growth phases.

lag phase; -●-, midlog phase; -○- early log phase; -△-, stationary phase; -□-

균체가 대수기의 균체보다 감수성이 크다는 것은 대사활성도 이외의 다른 원인이 있다고 사료되며 아마도 균체의 생장에 필요한 물질의 합성에 미치는 영향때문인 것으로 생각된다.

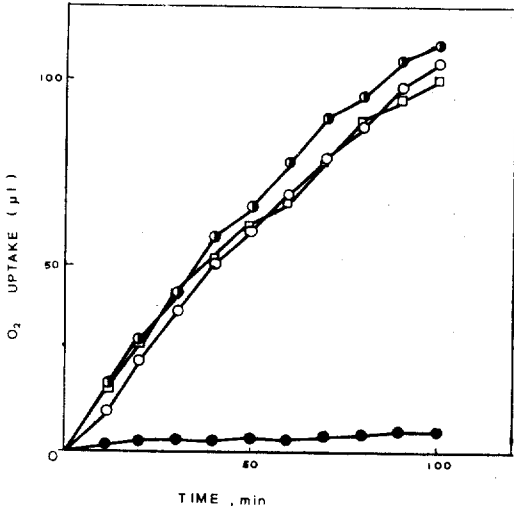


Fig. 8. Respiration rate of *Pseudomonas fluorescens* on glucose with various contents of furfural. no furfural; -○-, 0.03%; -□- 0.05%; -●-, endogeneous respiration; -●-

3. 호흡률에 대한 furfural의 효과

Fig. 8에서 보는 바와 같이 0.05%의 furfural

이 첨가된 경우에도 *P. fluorescens*는 glucose를 이용하여 정상적인 호흡을 나타냈으며 이러한 결과는 앞서 furfural의 치사효과에서 추정한 사실, 영양원의 이용에는 furfural이 영향을 주지 않는다는 것과 부응하는 결과이다. 또한 furoic acid를 기질로 사용한 경우에도 furfural은 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과로부터 furfural의 독성효과는 의 호흡에는 영향을 미치지 않는 것이라 생각된다.

이상의 결과를 보면 *P. fluorescens*에 대한 furfural의 독성효과는 기질의 이용을 억제하여 나타나는 것이 아니라 다른 원인에 있다고 생각된다. 한편 furfural과 분자구조의 유사성

(=C-CHO)을 지니는 crotonaldehyde의 *Candida utilis*에 대한 독성효과에 관한 연구(Rychtera, 1981)를 보면 이 aldehyde도 잠재기를 연장시키며 균체수율을 저하시켰다. 이때의 농도는 0.02~0.05% 정도였고 이 이상의 농도에서는 치사효과가 나타났다. 또한 연장된 잠재기동안 crotonaldehyde는 균체에 의해 transformation되어 감소하였다. 이러한 결과는 본 실험에서 나타난 결과와 매우 유사한 것으로써 aldehyde 기를 갖는 물질의 공통적인 작용기작이 나타난 것으로도 볼 수 있다.

摘 要

Furfural을 유일한 탄소원으로 이용하지 못하는 것으로 알려졌던 *Pseudomonas fluorescens*가 호조조건하에서 저농도의 furfural은 이용가능함을 밝혔다. 이 균주가 고농도의 furfural은 잘 이용하지 못하는 것은 furfural이 균주에 대해 다음과 같은 독성효과를 나타내기 때문이다.

1. 0.01% 정도의 furfural에 의해서 잠재기가 연장되었고 특히 성장초기의 균체에 더 큰 억제효과가 나타나 잠재기의 연장과 동시에 균체수율도 감소하였다.
2. 0.1% 이상의 furfural은 치사효과를 나타냈으며 대사활성도가 클수록 치사율이 높았고 생장시기별로 치사율에 차이가 나타나 성장초기의 균체가 더 큰 치사율을 나타냈다.
3. Furfural이 호흡률에 대해서는 별다른 영향을 나타내지 않았다.

引 用 文 獻

1. Banerjee, N., R. Bhatnagar, and L. Viswanathan, 1981. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 226~228.

2. Brzezinski, J., B. Wycosocka-paruszezewska, A. Osickakoprowska, and I. Gradowska-olszwska, 1979. Effect of furfural on the neurochemical balance and body adaption process *Bromatol. Chem. Toksykol.* **12**, 239~245.

3. Byun, K.H., H.E. Han, S.W. Hong, and Y.C. Hah, 1979. Bioconversion of furfural into 2-furoic acid

- by *Zoogloea* A8. *Kor. J. Microbiol.* **17**, 193~197.
5. Chae, K.S., 1982. M.S. Thesis, S. N. U., Seoul, Korea. Biodegradation of furfural via 2-furoic acid by *Pseudomonas* sp.,
 6. Feron, V.J., A. Kruijse, H.C. Dreef-Van der Meulen, 1979. Repeated exposure to furfural vapor: 13 week study in syrian golden hamsters. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd., Infektionskr. Hyg., Abt. 1*, **168**, 442~451.
 7. Han, H.E., 1982. Ph.D. Thesis, S.N. U., Seoul, Korea. Microbial interactions in degradation of furfural and its derivatives.
 8. Han, H.E., S.W. Hong, and Y.C. Hah, 1979. Symbiotic degradation of furfural by soil bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **17**(4), 198~202.
 9. Hong, S.W., H.E. Han, and K.S. Chae, 1981. Detection of furfural and 2-furoic acid in bacterial cultures by high pressure liquid chromatography. *J. Lip. Chromatography.* **4**(2), 285~292.
 10. Jonek, J.J., M. Kaminski, J. Jonecki, B. Gruszecka, and O. Kaminska, 1964. Histochemical changes in liver of animals chronically poisoned with furfural with the simultaneous administration of vitamin C. *Pr. Nauk. Univ. Slask. Katowicah.* **234**, 105~113.
 11. Kaminska, O., and B. Gruszecka, 1977. Dynamics of morphological and histochemical change in rat's liver in chronic furfural poisoning. *Med. Pr.* **28**(5), 377~391.
 12. Kaminska, O., B. Gruszecka, and M. Kaminski, 1978. Morphological and histoenzymic investigations of kidneys in chronic furfural poisoning. *Patol. Pol.* **29**(1), 41~50.
 13. Morimoto, S., T. Hirashima, and M. Ohashi, 1968. Studies on fermentation products from aldehyde by microorganisms, (II) the fermentative production of furfuryl alcohol from furfural by yeasts (part 2). *J. Ferment. Technol.* **46**(4), 276~287.
 14. Rychtera, M., V. Kren, and V. Gregr, 1981. Growth of yeast *Candida utilis* in crotonaldehyde containing media. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 39~44.
 15. Soboleva, G.A., V.I. Golubkov, and A. M. Vitrinskaya, 1973. Effect of furfural on the cytochrome system of yeasts. *Mikrobiologiya.* **42**(3), 441~444.
 16. Zdzienicka, M., B. Tidek, M. Ziellensk, and T. Szymczyk, 1978. Mutagenic activity of furfural in *Salmonella typhimurium* TA 100, *Mutation Research.* **58**, 205~209.