

## Styrene Oxide에서 2-Phenylethanol(PEA)를 생성하는 *Pseudomonas putida* Strain 2150-2의 분리 및 동정

양인영 · 황순옥\*

유공(주) 대덕기술원 화학연구소 생물공학연구실

**Isolation and Identification of *Pseudomonas putida* Strain 2150-2 Producing 2-Phenylethanol from Styrene Oxide.** In-Young Yang and Soon-Ook Hwang\*. *Biotechnology Laboratory, Taedok Institute of Technology, Yukong Limited, Taedok Science Town, Taejeon 305-370, Korea* – The strain which produces 2-phenylethanol (PEA) from styrene oxide was isolated from soil samples near Ulsan PO/SM plant. The isolated strain was identified as *Pseudomonas putida* through its morphological, physiological characteristics, and DNA G+C contents. Its metabolic pathway from styrene oxide to 2-phenylethanol was studied and it was found that styrene oxide was transformed to phenylacetaldehyde, to 2-phenylethanol (PEA), and then to phenylacetic acid by this strain.

스티렌(styrene)은 불포화 side chain을 갖고 있는 벤젠 유도체로서 스티렌-부타디엔고무와 폴리스티렌의 생산원료로, 또한 고분자 제조공정에서 용매로서 사용되고 있어 현대 산업사회에서 널리 사용되는 화학물질이다. 이러한 스티렌은 독성을 갖고 있어 인체는 물론 포유류에 생물학적 해를 입히는 것으로 알려져 왔다(1). 따라서 이 물질을 사용하는 주변의 환경오염이 심각한 문제가 되어 왔다. 포유류에서의 스티렌 대사는 스티렌의 대사중에 일어나는 체내의 독성 때문에 광범위하게 연구되어 왔으나(2-4), 미생물에서의 대사 연구는 드문 편이다. 1970년대 후반부터 스티렌을 분해하여 다른 물질로 전환시키는 능력을 갖고 있는 미생물을 이용한 스티렌의 대사에 대한 연구가 시작되었다(5-10).

1979년에 Shirai와 Hisatsuka(6)가 *Pseudomonas* sp.에 의해 스티렌이나 스티렌 옥사이드(styrene oxide)에서 2-phenylethanol이 생성되는 것을 발견하였고, 스티렌 옥사이드 환원효소에 의해 스티렌 옥사이드에서 2-phenylethanol이 생성된다고 제안하였다. 최근에 *Xanthobacter* sp.(8)나 *Pseudomonas putida*(10)에 의해 스티렌 옥사이드가 페닐아세트알데하이드로, 다음에 페닐초산으로 전환됨이 알려졌는데, 특히 Hartmans등(8)은 Shirai와 Hisatsuka가 제안한 스티렌 옥사이드에서 2-phenylethanol의 생성에 대해 스티렌 옥사이드 이소머라제에 의해 스티렌 옥사이드가 페닐아세트알데하이드로 되고, 다음에 페닐에탄올 디하이드로지나제에 의해 2-phenylethanol로 된다고 제안한 바 있다. 현재 2-phenylethanol은 식품 또는 향장향료로 사용되며, 벤젠과 산화에틸렌의 반응(Friedl-Crafts 반응)에 의해서나 주로 스티렌 제조 공정중에 부산물로서 추출법에 의해 생산

되고 있다. 본 연구에서는 생물전환 기술에 의해 스티렌계 유도체로부터 2-phenylethanol을 생성할 목적으로, 스티렌을 생산하는 유공 옥시케미칼(주)의 PO/SM 공장 주변의 토양에서 스티렌을 단일 탄소원과 에너지원으로 사용하는 균주의 분리 및 동정을 하고 이 균주에 의한 스티렌과 스티렌 옥사이드의 대사에 관한 연구를 하였다.

### 재료 및 방법

#### 스티렌 자화 균주 분리

본 실험에 사용된 균주는 울산의 PO/SM 공장 주변의 토양으로부터 채취한 샘플을 멸균 생리 식염수 10 ml에 0.1 g씩 넣어 30°C에서 24시간 진탕시킨 후 0.1%의 스티렌을 첨가한 minimal medium에 100 µl씩 접종하고 30°C에서 배양하여 형성된 콜로니중 성장율이 좋은 균주를 선별하였다. 분리한 균주는 분리배지에 계대하여 보존하였다.

#### 배지 조성 및 배양 조건

균주 분리용 배지는 증류수 1l에 Bacto agar 15 g, peptone 1 g, ammonium nitrate 1 g, sodium phosphate dibasic( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 5 g, potassium phosphate monobasic( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2.5 g, magnesium sulfate 0.2 g, calcium chloride 10 mg, ferric sulfate 1 mg, yeast extract 0.1 g, corn steep liquor 0.1 g과 0.1%의 스티렌을 첨가하여 만들었다. 2-phenylethanol 생성능을 조사하기 위한 액체 배지로는 1/10로 희석한 LB 배지를 사용하였다.

2-phenylethanol 생성을 위해서 5 ml의 LB 배지에 분리한 균주를 접종하여 18시간 동안 30°C에서 전배양하였다. 전배양한 균주 1 ml을 1/10로 희석한 LB 배지액 500 ml을 함유한 1l 플라스크에 접종하고 30°C에서 진

\*Corresponding author.

Key words: *Pseudomonas putida*, styrene oxide, 2-phenylethanol, phenylacetaldehyde

탕 배양하였다. 이때 2시간 간격으로 0.01~0.02%의 스티렌을 첨가하여 첨가된 스티렌의 총농도가 0.2%가 되도록 하였다.

## 2-Phenylethanol 생성 반응

접종한 균주를 48시간 배양한 후 균체의 O.D. 값을 UV-visible spectrophotometer(UV-160A, Shimadzu)로 600 nm에서 측정하였다. 배양한 균체를 7000 rpm에서 원심분리한 후 반응용액(ammonium nitrate 1 g, sodium phosphate dibasic( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 5 g, potassium phosphate monobasic( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2.5 g, magnesium sulfate 0.2 g, calcium chloride 10 mg, ferric sulfate 1 mg per liter)에 O.D 값이 2가 되도록 현탁하여 준비하였다. 균체를 포함한 5 ml 반응용액에 0.03% 또는 그 이상의 스티렌 또는 스티렌 옥사이드나 페닐아세트알데하이드를 첨가하여 30°C에서 반응시켰다. 반응을 완료한 후 고속저온 원심분리기(MRX-150, Tomy)로 4°C, 12000 rpm에서 반응액을 원심분리하고 그 상등액을 취해 Gas Chromatography(HP5890, Hewlett Packard)를 이용해 분석을 수행하였다. 분석조건으로는 HP-1 커필러리 컬럼(내경 0.2 mm, 길이 25 m)을 100°C에서 1분간 가열하고 분당 10°C 씩 250°C까지 증가시킨 후 250°C에서 1분간 정지시켰다. 캐리어 개스로는 헬륨을 분당 2 ml의 속도로 흘렸다. 페닐아세트알데하이드(phenylacetaldehyde)는 5.3분, 스티렌 옥사이드는 5.7분, 2-phenylethanol은 6.3분, 페닐초산은 8.1분에서 검출되었고, GC-MSD(GC ; HP5890 II, MSD ; HP5972, Hewlett Packard)로 각각의 불질을 확인하였다. GC-MSD에 사용된 GC 컬럼은 HP-5MS(내경 0.25 mm, 길이 30 m)로서 분석 조건은 위의 GC 분석조건과 같았다.

## 균주의 형태 및 생리학적 특성

분리 균주의 형태학적 특성은 Gram's stain을 실시하여 광학 현미경(Jenaval-II, Zeiss)으로 조사하였고 사진은 칼라 비데오 프린터(VY-15A, Hitachi)를 써서 인쇄하였다. 운동성은 semi-solid medium(0.6~0.8% bacto agar 함유)을 이용하여 실험하였다. 생리·생화학 적 특성으로는 catalase, oxidase, hydrolysis of urea 그리고 arginine dehydrolase, lysin decarboxylation, ornithine decarboxylation, oxidation/fermentation test, nitrate 환원, gelatin 액화, starch hydrolysis 등을 실험하였으며, Palleroni(11)의 방법에 따라 carbon utilization test를 수행하였다. 또한 색소 형성능을 알아보기 위해 King A, B test도 수행하였다.

## 염색체 DNA G+C 함량 조사

분리균주의 염색체 DNA 분리는 Saito와 Miura의 방법(12)을 변형하여 사용하였다.

염색체 DNA G+C 함량(mol%)측정은 Tamaoka와

Komagata의 방법(13)을 사용하여 실시하였다. 잘 정제된 DNA 용액을 100°C에서 10분간 가열하여 변성시킨 후 nuclease P1 용액(0.1 mg/ml in 40 mM sodium acetate, 2 mM  $\text{ZnSO}_4$  buffer)을 첨가한 다음 50°C에서 한시간 반응시켰다. 이 용액에 bacterial alkaline phosphatase를 첨가하고 37°C에서 한시간동안 반응시킨 후 그 반응물을 high performance liquid chromatography (1050 series, Hewlett Packard)으로 분석하였다. Nucleotide는 0.2M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 과 acetonitrile의 혼합물(20 : 1, v/v)로 실온에서 1 ml/min의 유속으로 흘러 HPLC의 UV 흡광도는 260 nm로 하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리균주의 동정

울산의 유공 옥시케미칼 (주) PO/SM 공장 주변의 토양 샘플에서 분리한 스티렌 옥사이드로부터 2-phenylethanol을 생성하는 균주 2150-2의 형태학적 특징을 광학 현미경으로 관찰한 결과 끝이 둥근 straight rod 임을 알 수 있었고 편모에 의한 운동성을 갖고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

분리균주 2150-2의 생리·생화학적 특성을 실험한 결과 Table 1에 나타낸 것과 같이 Gram 음성 균주이며 운동성을 갖는 호기성 균이고 diffusable 형광색소를 생성하여 *Pseudomonas* 속임을 알 수 있었다. gelatine 액화에 음성이었고, carbohydrate utilization test들 중 trehalose와 inositol에 대해 음성 반응을 보여 *Pseudomonas putida*로 동정하였다.

한편 분리 균주의 DNA 염기 조성을 분석한 결과 63 mol%의 함량을 나타내었는데 이는 *Pseudomonas putida* Type 균주의 DNA G+C 함량인 62.5 mol%의 범위에 근접한 값이었다. 따라서 분리된 균주를 재차 *Pseudomonas putida*로 동정하였다.

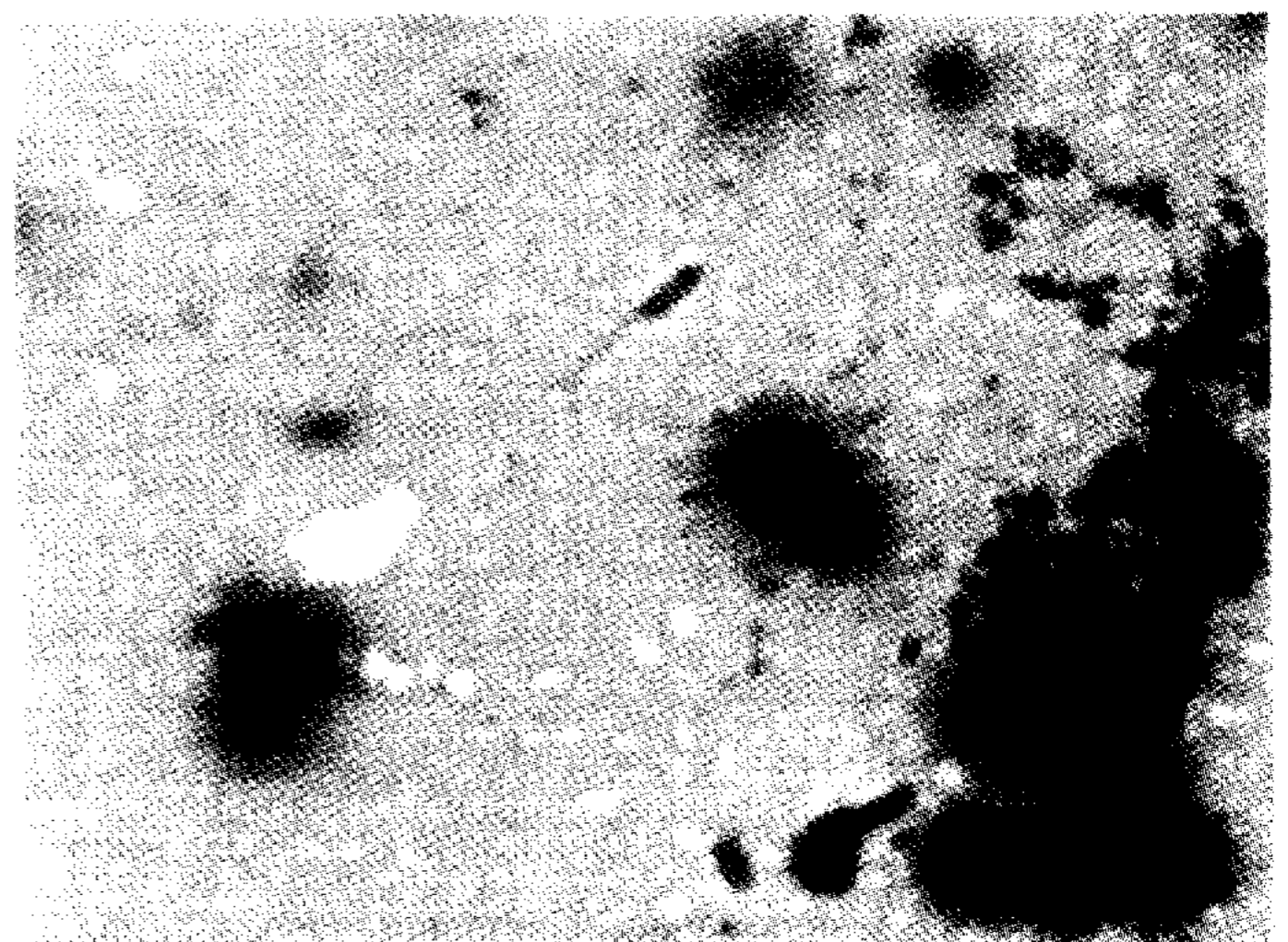


Fig. 1. Micrograph (X100) of *Pseudomonas putida* 2150-2.

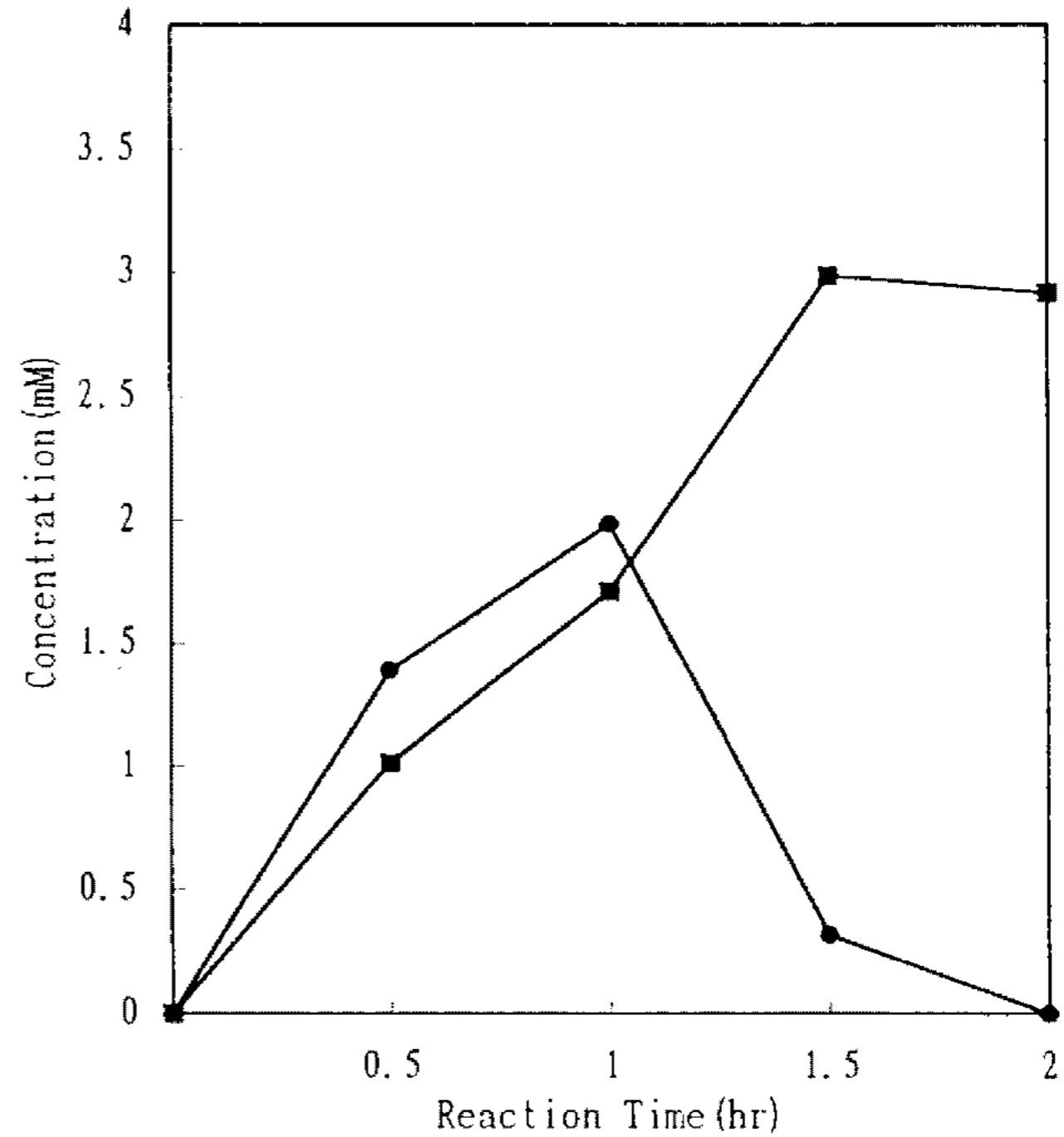
**Table 1. Comparison of physiological and biochemical characteristics of 2150-2 strains with *Pseudomonas putida* type strain.**

Characteristics	2150-2	<i>Pseudomonas putida</i> *
Gram stain	-	-
Morphology	straight rod	straight rod
Motility	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Arginine dehydrolase	+	+
Lysin decarboxylase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Urea hydrolysis	+	-
VP test	-	-
Methyl red test	-	-
Gelatin liquefaction	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Fluorescent, diffusible pigment	+	+
Nitrate reduction	+	+
Growth on		
12% NaCl	-	-
Glucose	+	+
Mannitol	-	-
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Rhamnose	-	-
Raffinose	-	-
Cellobiose	+	-
Arabinose	+	+
Maltose	+	-
Salicin	-	-
Fructose	+	+
Mannose	+	d
Adonitol	-	-
Trehalose	-	-
Galactose	-	-
Mol % of DNA G+C	63	62.5

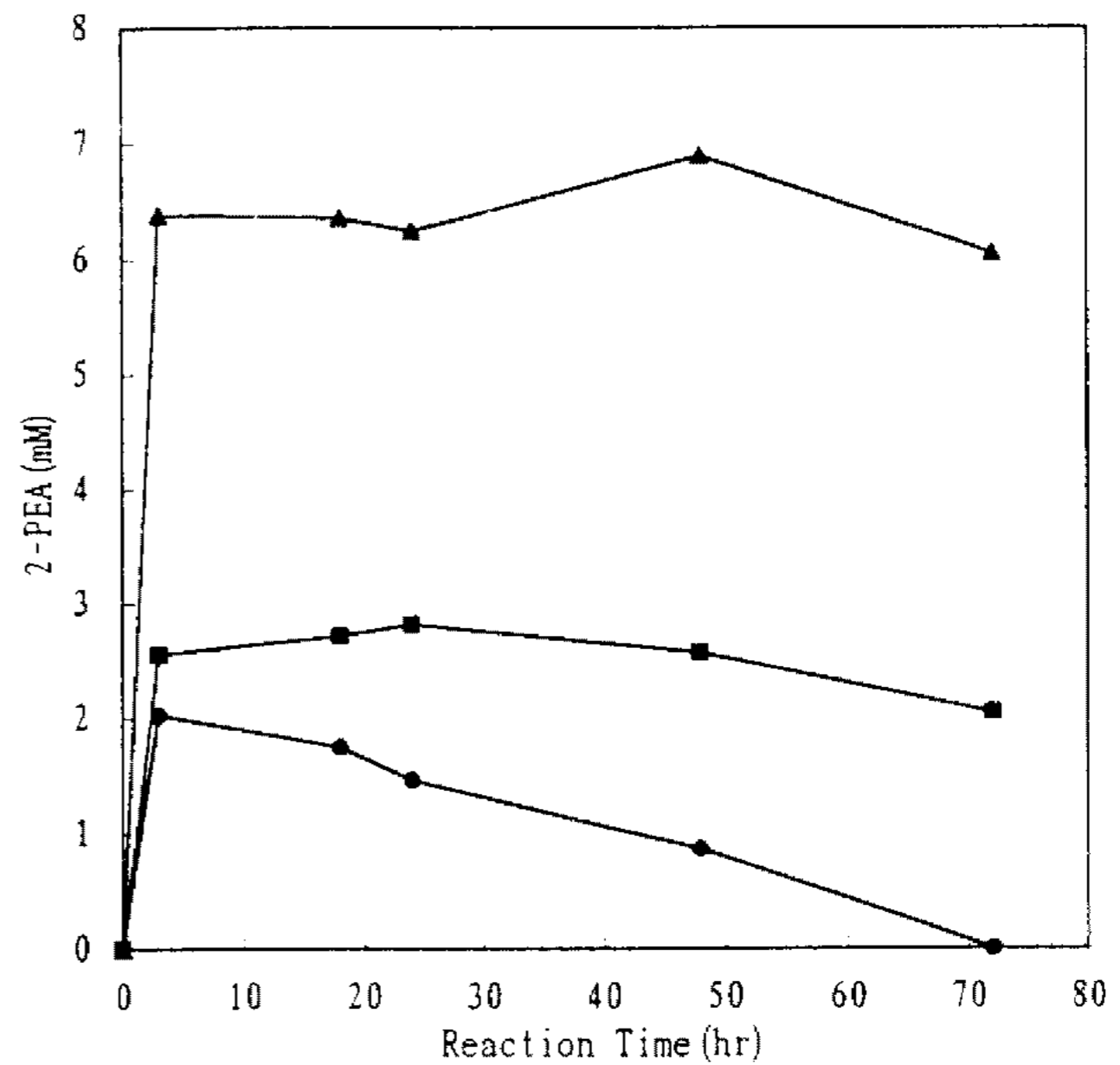
+; positive, -; negative, d; 11~89% of strains are positive, \*; from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (11)

**스티렌 옥사이드로부터 2-Phenylethanol의 생성**

0.03%의 스티렌을 기질로 사용한 경우에 24시간 이상 반응을 실시해야 2-phenylethanol이 검출되었고, 계속 되는 계대 배양후 얻어진 균체로 스티렌을 기질로 하여 반응하였을 경우 2-phenylethanol이 검출되지 않았다. 따라서 스티렌으로부터 2-phenylethanol 생성능을 잃어버린 것을 알 수 있었다. 반면 0.03%의 스티렌 옥사이드를 기질로 하여 반응을 실시한 경우에는 반응 2시간 이내에 최고치의 2-phenylethanol이 생성되었다



**Fig. 2. Concentration profiles of phenylacetaldehyde and 2-phenylethanol as functions of reaction time at 0.03% styrene oxide concentration: (●) phenylacetaldehyde; (■) 2-phenylethanol.**



**Fig. 3. Production of 2-phenylethanol at different styrene oxide concentration: (●) 0.03%; (■) 0.06%; (▲) 0.2%.**

(Fig. 2). 따라서 스티렌 옥사이드의 농도를 변화시켜 2-phenylethanol의 생성을 조사하였다(Fig. 3). 0.03% 스티렌 옥사이드를 넣은 경우는 2-phenylethanol이 2시간후 반응시간이 경과함에 따라 계속 감소하였는데 이는 2시간후부터 2-phenylethanol에서 페닐초산이 생성되었기 때문이다. 스티렌 옥사이드는 수용액에서의 용해도는 낮으나 0.03% 이상의 농도에서는 반응되어 없어지는 만큼 용해되므로 2-phenylethanol 생성반응이

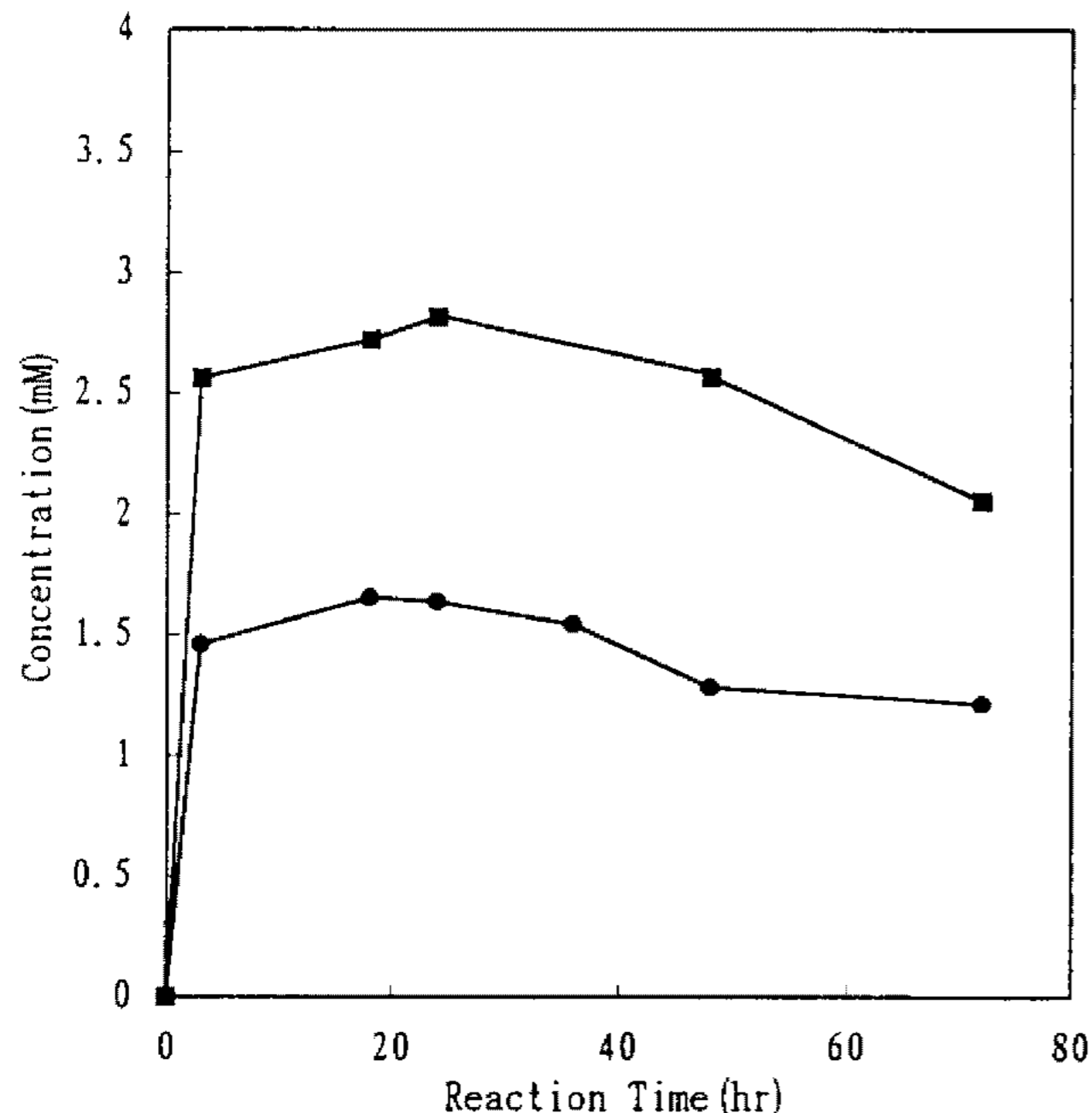


Fig. 4. Production of 2-phenylethanol at 0.06% styrene oxide concentration, and at 0.03% styrene and 0.03% styrene oxide concentrations: (■) 0.06% styrene oxide; (●) 0.03% styrene and 0.03% styrene oxide.

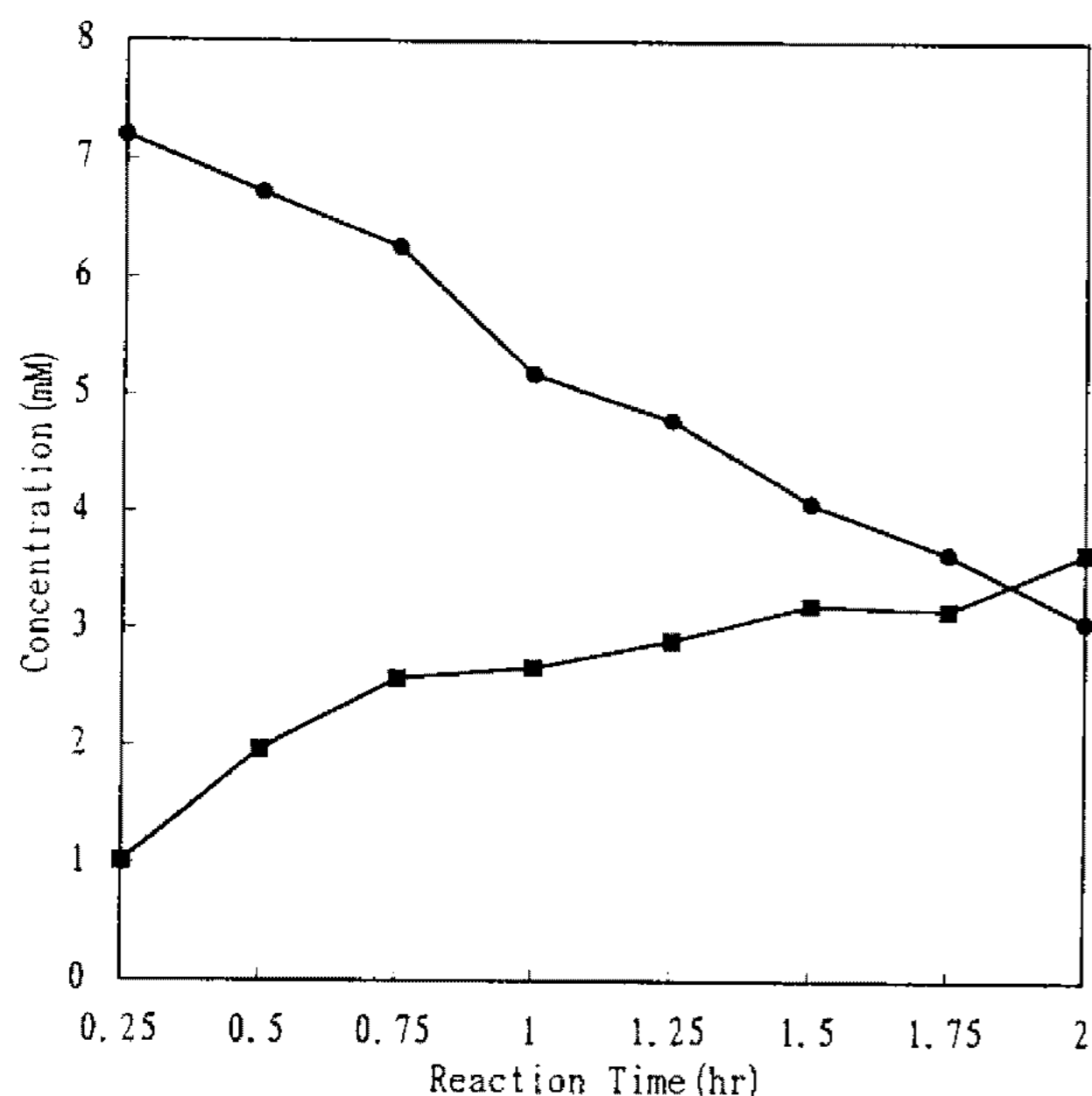


Fig. 5. Concentration profiles of phenylacetaldehyde and 2-phenylethanol as functions of reaction time at 0.1% phenylacetaldehyde concentration: (●) phenylacetaldehyde; (■) 2-phenylethanol.

계속 진행되어 2-phenylethanol에서 페닐초산이 생성되어 없어지는 만큼 2-phenylethanol이 생성되므로 상당시간 동안 감소되지 않았다. 0.06% 스티렌을 넣은 경우는 2-phenylethanol의 생성이 거의 이루어지지 않았는데, 이 차이는 Fig. 4에서도 잘 나타나 있다. 스티렌 옥사이드에서 페닐아세트알데하이드가 생성되고 다음에 2-phenylethanol이 생성되었으므로, 0.1% 페닐아세

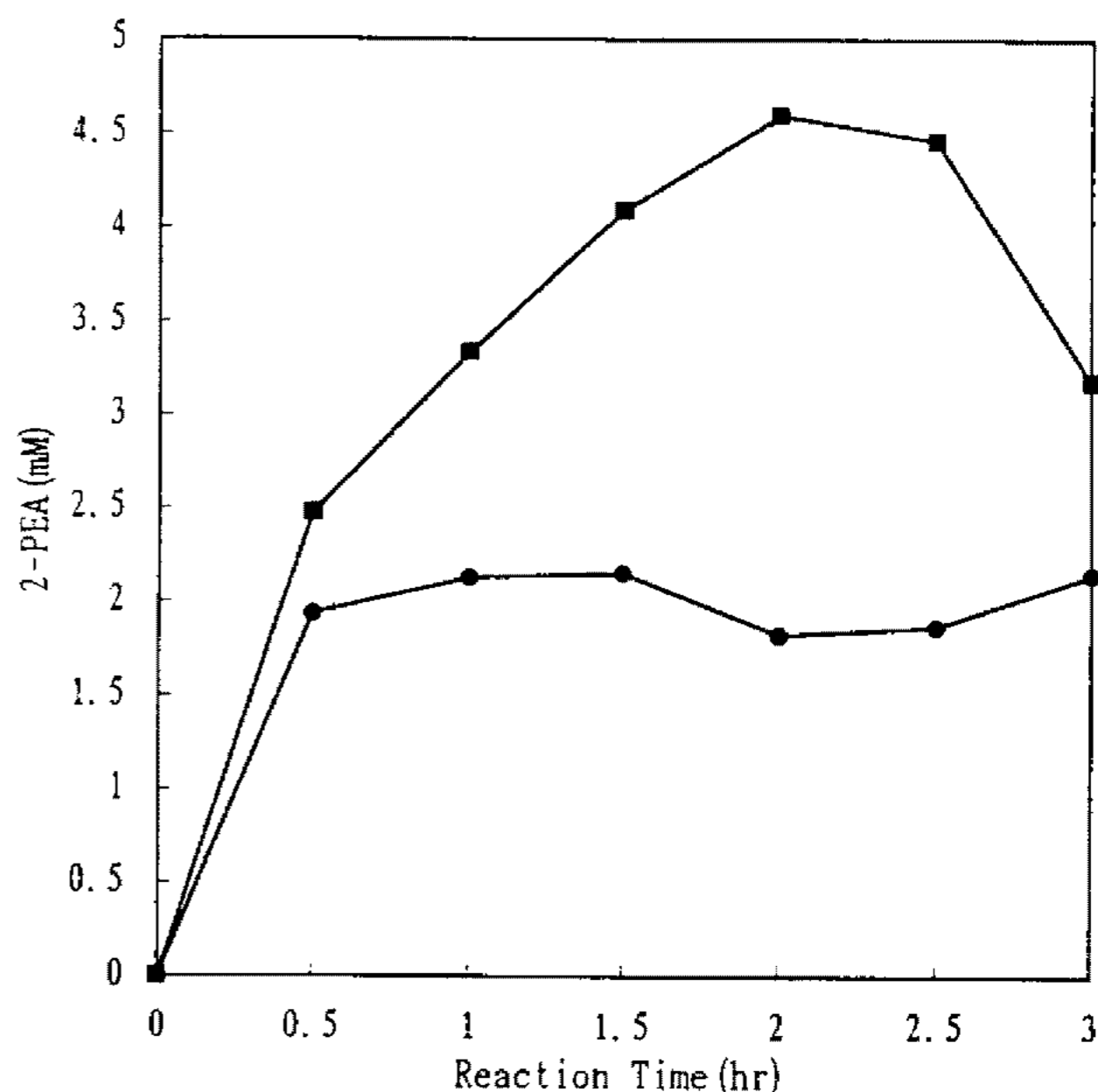


Fig. 6. Production of 2-phenylethanol at different phenylacetaldehyde concentration: (●) 0.03%; (■) 0.06%.

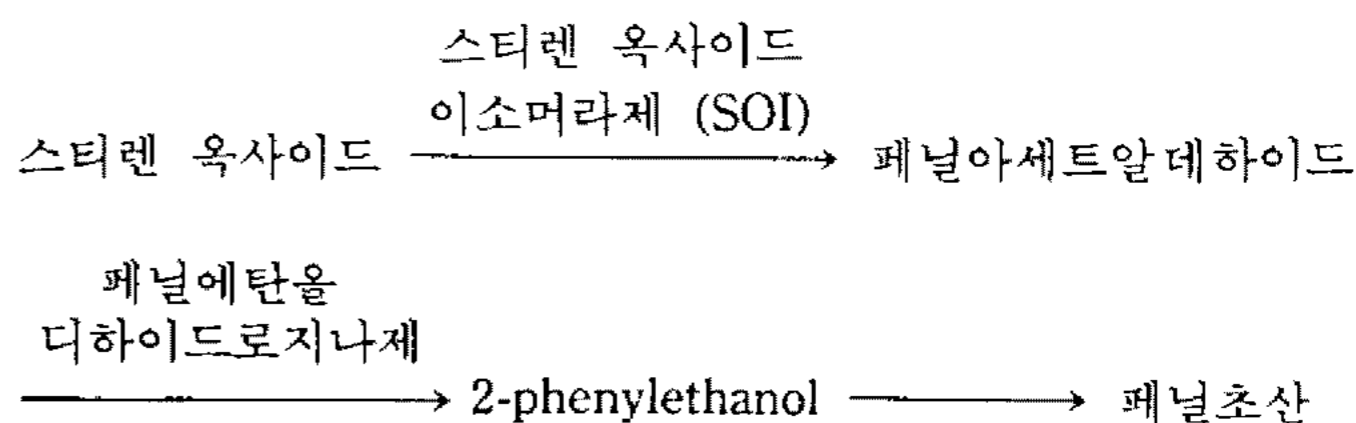


Fig. 7. Pathway for styrene oxide degradation by *Pseudomonas putida* 2150-2 cells.

트알데하이드를 넣은 후 반응시간에 따른 2-phenylethanol의 생성을 조사하였다(Fig. 5). 즉 페닐아세트알데하이드가 감소함에 따라 2-phenylethanol의 생성이 증가되어 페닐아세트알데하이드로부터 2-phenylethanol이 생성됨을 알 수 있었다. 페닐아세트알데하이드의 농도를 변화시킨 결과는 다음과 같았다(Fig. 6). 이 균주를 사용하여 스티렌 옥사이드에서 페닐아세트알데하이드와 2-phenylethanol을, 페닐아세트알데하이드에서 2-phenylethanol을 생성할 수 있었고, 또한 2-phenylethanol로부터 페닐초산이 생성되는 것이 관찰되었다. 따라서 본 연구자들에 의해 대사경로가 다음과 같이 제안되었다(Fig. 7).

Shirai와 Hisatsuka(6)가 제안한 대사경로는 스티렌 옥사이드에서 스티렌 옥사이드 환원효소에 의해 2-phenylethanol이 생성되는 것인데, 본 연구에 의하면, Hartmans 등(8)이 제안한 것과 같이 2단계로 스티렌 옥사이드에서 페닐아세트알데하이드가 생성되고, 다음에 페닐아세트알데하이드에서 2-phenylethanol이 생성됨을 확인할 수 있었다. 또한 *Xanthobacter* sp.(8)이나 *Pseudomonas putida*(10)과는 다르게 페닐아세트알데하이드에서 직접 페닐초산이 생성되지 않고 2-phenyletha-

nol을 거쳐 페닐초산으로 진행하여 기존의 균주들과는 다른 대사경로를 가짐을 알 수 있었다.

## 요 약

울산 유공 옥시케미칼 (주)의 PO/SM 공장 주변의 토양 샘플로부터 스티렌을 분해하여 성장하는 균주를 분리하였는데, 이 균주에 대한 생리·생화학적, 형태학적 특성을 조사한 결과와 DNA G+C 함량에서 *Pseudomonas putida*로 동정되었다. 이 균주의 스티렌 옥사이드에서 2-phenylethanol로의 대사경로가 연구되었고, 이 균주에 의해 스티렌 옥사이드가 페닐아세트알데하이드로, 다음에 2-phenylethanol(PEA)로, 그리고 페닐초산으로 대사되어 기존의 스티렌 자화 균주와는 다른 대사경로를 가짐을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Watabe, T., M. Isobe., K. Yoshikawa, and E. Takabatake. 1978. Study on metabolism and toxicity of styrene. I. Biotransformation of styrene to styrene glycol via styrene oxide by rat liver microsomes. *J. Pharm. Dyn.* **1**: 98-104.
2. Belvedere, G., L. Talve, E. Hietanen, and H. Vainio. 1984. Effect of blood on styrene oxidation in perfused rat liver. *Toxicol. Lett.* **23**: 261-265.
3. Lof, A., E. Gullstrand, E. Lundgren, and M.B. Nordqvist. 1984. Occurrence of styrene-7,8-oxide and styrene glycol in mouse after the administration of styrene. *Scand J. Work Environ. Health* **10**: 179-187.
4. Korn, M., R. Wodarz, K. Drysch, W. Schoknecht, and F.W. Schmahl. 1985. Stereometabolism of styrene in man: Gas chromatographic determination of phenylethyleneglycol enantiomers and phenylethanol isomers in the urine of occupationally-exposed persons. *Arch. Toxicol.* **58**: 110-114.
5. Sielicki, M., D.D. Focht, and J.P. Martin. 1978. Microbial transformation of styrene and [<sup>14</sup>C]styrene in soil and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 124-128.
6. Shirai, K. and K. Hisatsuka. 1979. Production of  $\beta$ -phenethyl alcohol from styrene by *Pseudomonas* 305-STR-1-4. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 1399-1406.
7. Baggi, G., M.M. Boga, D. Catelani, E. Galli, and V. Treccani. 1983. Styrene catabolism by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *System. Appl. Microbiol.* **4**: 141-147.
8. Hartmans, S., J.P. Smits, M.J. van der Werf, F. Volkering, and J.A.M. de Bont. 1989. Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading *Xanthobacter* strain 124X. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2850-2855.
9. Warhurst, A.M., K.F. Klarke, R.A. Hill, R.A. Holt, and C.A. Fewson. 1994. Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1137-1145.
10. O'connor, K., C.M. Buckley, S. Hartmans, and A.D.W. Dobson. 1995. Possible regulatory role for nonaromatic carbon sources in styrene degradation by *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 544-548.
11. Palleroni, N.J. 1984. Family I. *Pseudomonadaceae* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555<sup>AL</sup>. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, The Williams & Willkins, Baltimore.
12. Saito, H. and V. Miura. 1963. Preparation of transforming DNA by phenol treatment. *Biophys. Acta.* **72**: 619-629.
13. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS. Microbiol. Lett.* **25**: 125-128.

(Received 29 September 1995)