

## 폴리비닐 알콜 분해균 *Pseudomonas cepacia* G5Y의 Polyvinyl alcohol oxidase 정제 및 특성

장대균 · 조운래\*  
영남대학교 응용미생물학과

### Purification and Characteristics of the Polyvinyl Alcohol Oxidase from *Pseudomonas cepacia* G5Y

Dae-Geun Jang and Youl-Lae Jo\*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

**Abstract** — The Polyvinyl alcohol (PVA) oxidase is a key enzyme involved in degradation of PVA with PVA hydrolase. The PVA oxidase has been purified to homogeneity from the culture broth of PVA grown *Pseudomonas cepacia* G5Y strain by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography, and Sephadex G-150 gel filtration. The molecular weight of the purified enzyme was estimated about 60,000 daltons by SDS-polyacrylamid gel electrophoresis. The enzyme is most active at 45°C and at pH 8.5, and is stable below 55°C and between pH 6 and 9. The enzyme activity was strongly inhibited by  $Ag^{2+}$  and  $Hg^{2+}$ .

폴리비닐 알콜(Polyvinyl alcohol : PVA)은 난분해성의 수용성 물질로 직물 가공제, 접착제 및 유화안정제 등 산업적으로 다방면에 이용되고 있으며, 이러한 PVA는 자연 환경에 유출될 경우 공공수역의 수질 오염의 원인이 되고 있다.

필자(1)는 PVA를 빠른 시간 내에 강력하게 분해하여 탄소영양원으로 이용할 수 있는 미생물을 분리하여 폐수 중의 PVA 제거 공정에 이용하기 위해 새로운 미생물 분리에 성공하여 이들 균주를 *Pseudomonas pseudomallei* PW, *Pseudomonas cepacia* G5Y로 명명하였으며 이들 균주는 공생적으로 PVA를 분해할 수 있었으며 이미 보고된 다른 미생물들에(2-4) 비해 분해능이 훨씬 우수하였다.

미생물에 의한 PVA 분해에 대한 기작은 아직 명확하게 규명되지 않았으나, 그 분해효소는 Suzuki(5, 6), Watanabe(3, 7-15), Sakazawa(16-18) 등에 의해 보고되었으며, Watanabe 등은 PVA 분해시 secondary alcohol oxidase에 의해 먼저 PVA가 산화되고 다시  $\beta$ -diketone hydrolase 작용으로 PVA가 분해된다고 보고하였다.

필자는 PVA 분해에 관련된 효소중 PVA oxidase를

정제하고 그 특성을 조사하여 *P. cepacia* G5Y에 의한 PVA 분해 기작을 규명하기 위한 토대를 마련하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 기기

본 연구에 사용한 DEAE-Cellulose, Polyvinylpyrrolidone(PVP-360), Sephadex G-150은 Sigma 제를, 투석에 사용한 Cellulose tube는 Viskasa 제를 사용하였으며, UV spectrophotometer는 Hitachi 사의 U-2000을 사용하였다. Sonicator는 Braun Ultrasonic Power 사의 Braun-sonic 2000U를 사용하였다.

#### 사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 필자 등(1)이 염색 폐수로부터 분리한 PVA 분해균인 *Pseudomonas cepacia* G5Y를 사용하였다.

#### 사용 배지

*Pseudomonas cepacia* G5Y 균주의 배양을 위한 배지로는 PVA를 탄소원으로 첨가한 PVA 배지(1)에 Pyrrroloquinoline quinone(PQQ)를 10 ng/ml 첨가하여 사용하였다.

**Key words:** *Pseudomonas* sp. G5Y, polyvinyl alcohol oxidase, polyvinyl alcohol (PVA)

\*Corresponding author

### 배양 방법

*Pseudomonas cepacia* G5Y를 PVA 배지에 접종하여 30°C, 180 rpm에서 7일간 배양한 전배양한 액을 새로운 PVA 배지에 10% 접종하여 30°C, 180 rpm에서 3일간 배양하였다.

### 효소 역가의 측정

PVA oxidase 역가의 측정은 Sakazawa(19) 등의 방법을 사용하였다. 0.25  $\mu$ mol의 4-aminoantipyrine (Fluka 제), 3.2  $\mu$ mol의 phenol(Wako pure chemical industries, LTD.), 18 Unit의 peroxidase(EC 1.11.1.7 : Sigma chemical Co., Type I) 그리고 기질로 22.5 mg의 PVA를 함유하는 150  $\mu$ mol의 phosphate 완충용액(pH 7.5)에 효소액 1.5 ml를 첨가하여 전체가 3 ml가 되게 하였다.

효소의 반응은 30°C에서 reciprocal shaking(60회/분)을 하면서 3시간 동안 반응시켰다. 이때 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4-aminoantipyrine과 phenol이 결합하면서 나타나는 발색정도를 500 nm의 흡광도로 측정하였다. PVA oxidase 역가는 1분 동안에 1  $\mu$ mol의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하는 단백질 양을 1 Unit로 계산하였다.

### 단백질 정량

정제 단백질 정량은 Bovine serum albumin(Sigma 제)을 표준 단백질로 사용하여 Lowry(20)의 방법에 의해 행하였다. 그리고 효소 정제 과정에서는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 정량에 이용하였다.

### 조효소의 조제

*Pseudomonas cepacia* G5Y가 생산하는 PVA oxidase는 4°C에서 15,200×g로 30분 동안 원심분리한 상등액을 Amicon Diaflo System의 Diaflo PM10 ultrafiltration membrane(MW cut off : 10,000)을 사용하여 질소 가스로 가압 농축한 다음, ammonium sulfate를 80% 포화도가 되게 가하여 원심분리한 후 생긴 침전분획을 소량의 0.01 M phosphate 완충용액에 녹여 Cellulose tube(size : 32/16)로 24시간 투석하여 조효소로 사용하였다.

### PVA oxidase의 정제

투석한 조효소액을 0.01 M phosphate 완충용액(pH 7.5)으로 평형시킨 DEAE-Cellulose column(1.8×30 cm)에 통과시킨 후 0.2, 0.4, 0.6 M NaCl 용액(0.01 M phosphate buffered)을 200 ml씩 단계별로 용출시켰다. 여기에서 활성이 있는 부분을 모아 투석용 cellu-

lose tube에 넣은 다음 PVP-360으로 10 ml 정도 되게 탈수 농축하였다. 이를 phosphate 완충용액으로 평형시킨 Sephadex G-150 column(2.2×50 cm)으로 겔 거르기를 행한 후, 다시 DEAE-Cellulose column에 통과시킨 후 0.4 M NaCl에 의한 농도 구배로 용출시켰다.

### Polyacrylamide gel 전기영동

정제된 효소단백의 Polyacrylamide gel 전기영동은 Hames(21)의 방법에 따라 실시하였다. 전기영동은 10 mA로 3시간 동안 실시하였고, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 탈색하였다.

### 효소 분자량 측정

PVA oxidase의 분자량을 조사하기 위해 Laemmli와 King(22)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel로 전기영동을 실시하였다. 10% polyacrylamide를 이용하여 50 volt의 직류 전류로 약 5시간 동안 전기영동한 후 gel을 염색, 탈색하여 분자량을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양시간에 따른 효소 생성

필자 등(1)이 염색폐수로부터 분리한 PVA 분해균인 *Pseudomonas cepacia* G5Y 균주는 순수배양으로는 PVA를 분해할 수가 없으며 *Pseudomonas pseudomallei* PW 균주를 함께 혼합배양을 할 경우 PVA를 분해할 수 있었다. 그러나, *P. pseudomallei* PW 균주 대신 Pyrroloquinoline quinone(PQQ)를 첨가하면 *P. cepacia* G5Y 균주의 순수배양으로도 PVA의 분해가 가능하였다(23). 본 실험에서는 PQQ를 첨가하여 *P. cepacia* G5Y 균주를 배양한 배양액으로부터 PVA oxidase를 정제하고자 하였다.

*P. cepacia* G5Y가 생산하는 PVA 분해효소인 PVA oxidase의 존재 위치확인에는 탄소원으로 PVA를 함유한 배지에서 균의 생육에 따라 배양액과 균체 내에서의 효소 역가를 각각 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 3일 정도 배양했을 때 배양액에서 효소의 역가가 가장 높게 나타났으며 3일 이후는 급격히 감소하였다. 그리고 세포 내에서의 효소 역가는 배양액에 비해 낮게 나타났다. 그러나 Sakazawa 등(18)은 *Pseudomonas* 속 세균의 세포막에 존재하는 PVA oxidase를 정제하여 보고한 바 있지만, 본 균은 배양액과 세포 내에 PVA oxidase의 활성이 있는 것으로 나타났으므로 효소 성상은 좀 더 연구되어야 할 것이다.

**PVA oxidase의 생산에 대한 탄소원의 영향**

*Pseudomonas cepacia* G5Y는 PVA 이외의 탄소원을 이용하여 생육할 수 있었다(1). *P. cepacia* G5Y가 다른 탄소원을 이용할 때도 PVA oxidase를 생산하는 지를 알아보기 위해 먼저, 배지 중에 PQQ를 10 µg/ml 첨가하고, 탄소원으로 glucose, glycerol, sodium acetate, ethyl alcohol, PVA를 각각 0.5%씩 첨가한 배지를 사용하여 균의 생육에 따른 PVA oxidase의 효소 역가를 측정하였다. Fig. 2에서 보는 것처럼 PVA를 이용한 것이 가장 높은 효소 역가를 나타냈으며 glucose와 sodium acetate의 경우에는 약간의 효소 역가를 나타내었다. 그러나, ethyl alcohol의 경우에는 거의 역가를 나타내지 않았다. 이와 같이 유일 탄소원으로 PVA를 사용시 가장 높은 효소 역가를 나타내는 것은 Sakazawa 등(19)의 보고와 거의 일치하였다.

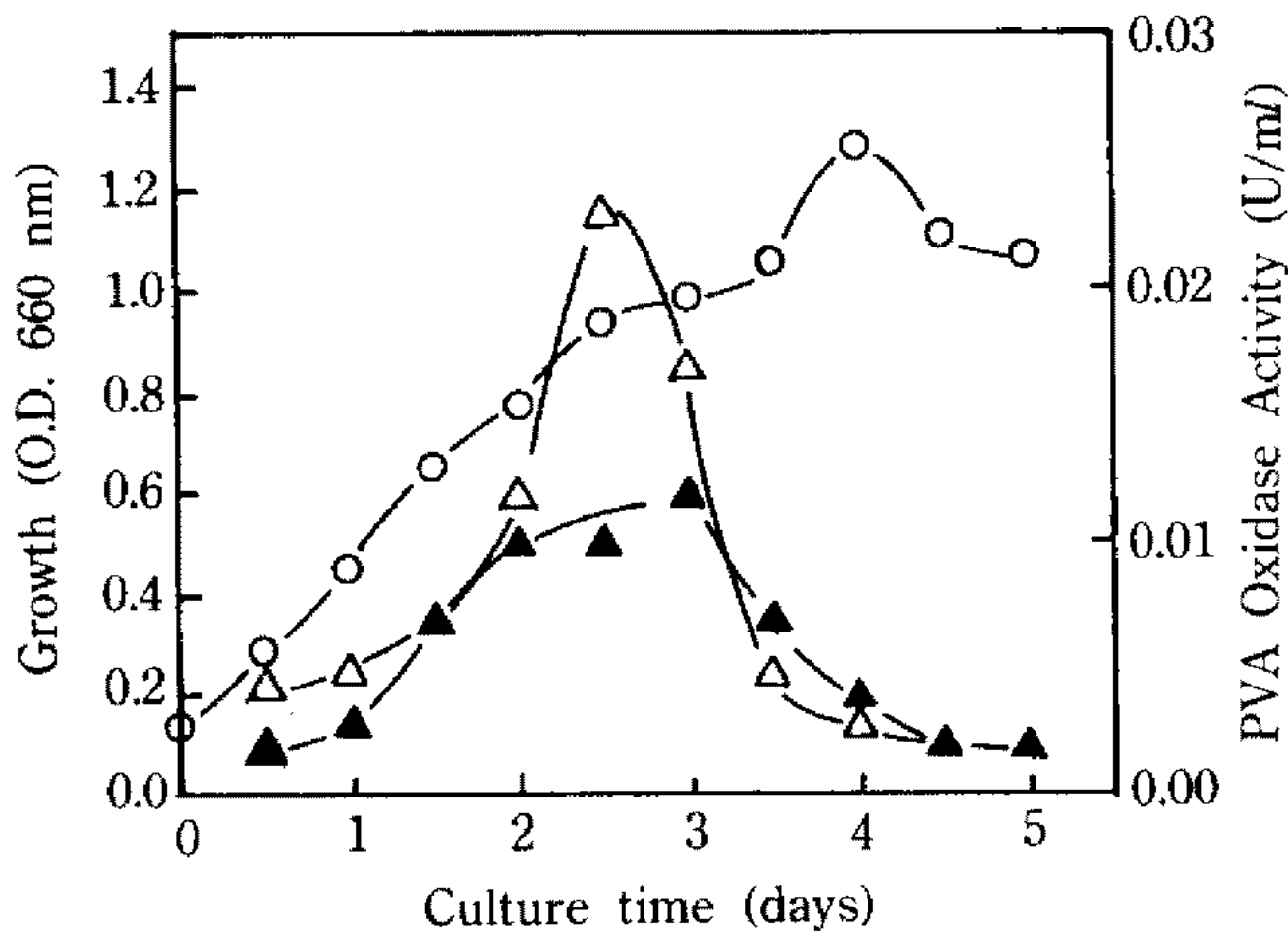
**PVA oxidase의 정제**

PVA oxidase의 정제 과정을 Table 1과 같이 행하였다. *Pseudomonas cepacia* G5Y의 배양액을 80% am-

monium sulfate를 처리하여 정제한 조효소를 DEAE-cellulose chromatography를 행한 결과, 0.2 M NaCl 분획에서 PVA oxidase 활성을 확인할 수 있었으며, 이 분획을 다시 Sephadex G-150 column 겔 거르기로 정제하였다. 활성 분획을 다시 DEAE-cellulose chromatography를 실시하여 0.2 M NaCl 분획을 다시 회수하였다. 정제된 효소의 순도는 10% polyacrylamide gel과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 확인하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 단일 band를 확인할 수 있었다.

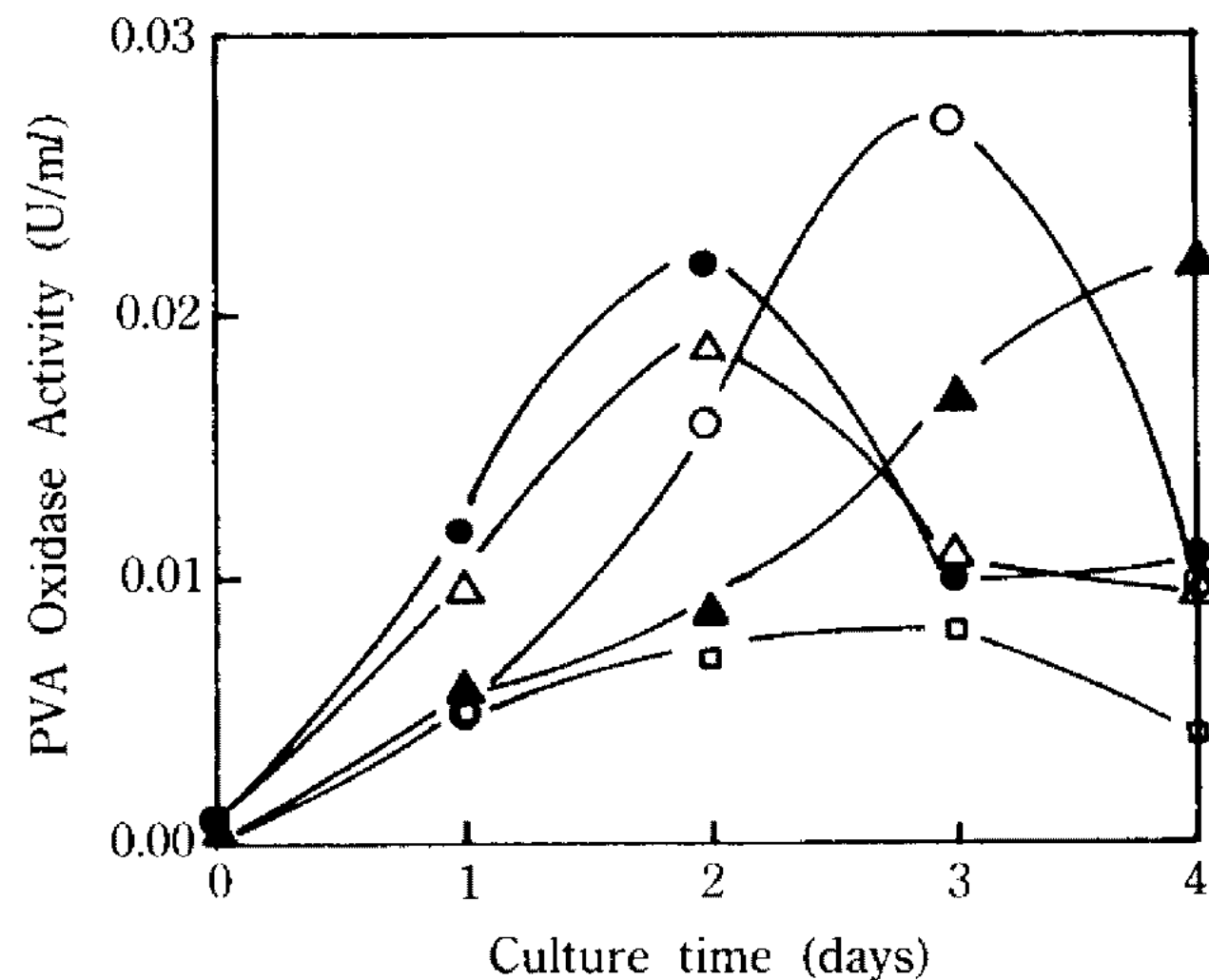
**PVA oxidase의 특성**

정제된 PVA oxidase의 분자량을 측정하기 위하여 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 3과 4에서와 같이 분자량은 약 60,000 daltons 임을 알 수 있었으며, 또한 Sephadex G-150 column 겔 거르기에 의한 분자량 측정시 거의 유사하였다. 이 결과는 Suzuki(5), Watanabe(10) 등이 보고한 45,000~50,000 daltons보다는 다소 크게



**Fig. 1. PVA oxidase production by *Pseudomonas cepacia* G5Y.**

○-Growth; △-Extracellular enzyme activity; ▲-Intracellular activity

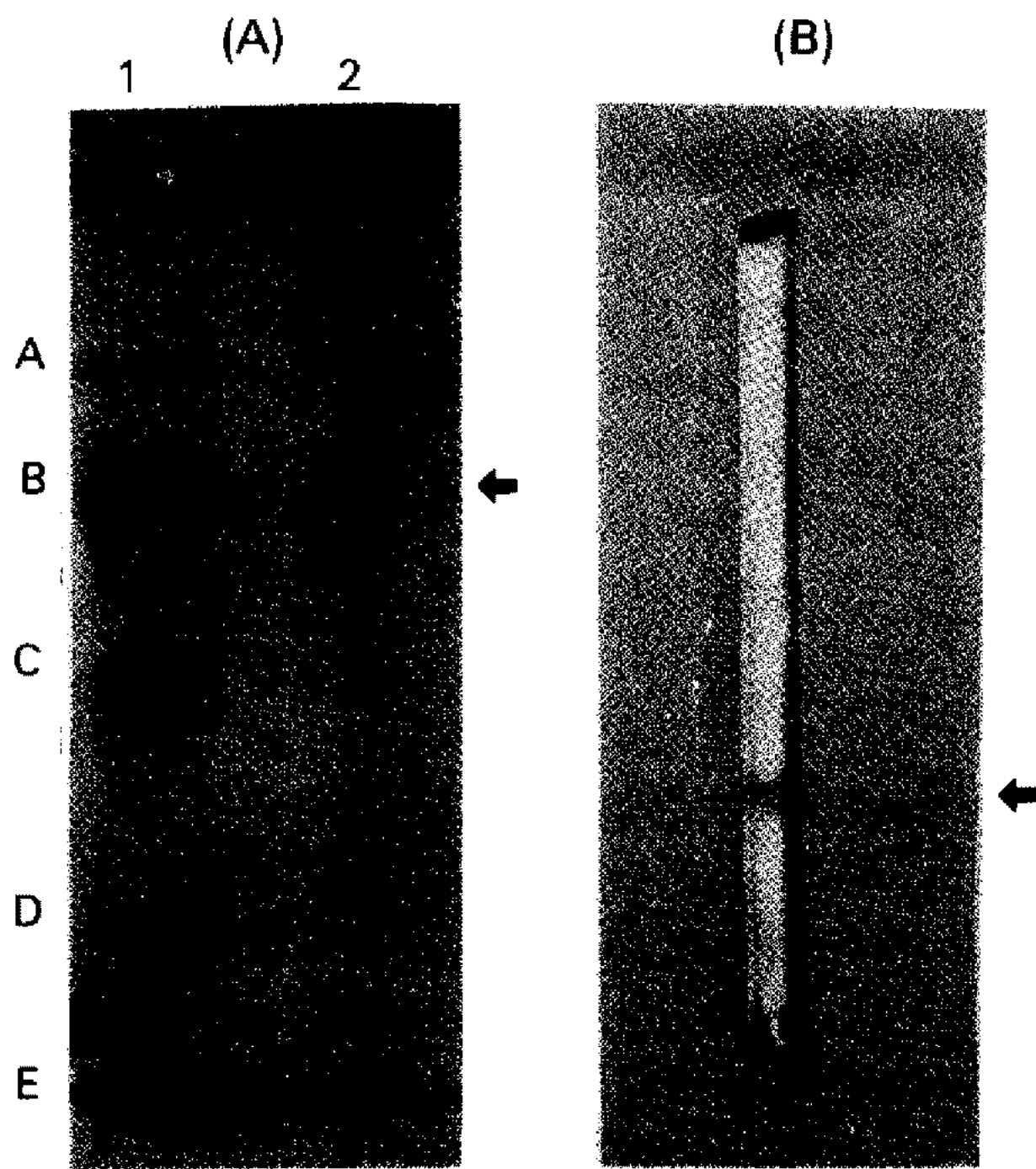


**Fig. 2. Effect of carbon sources on PVA oxidase production.**

○-PVA; ●-Glucose; △-Glycerol; ▲-Sodium acetate; □-Ethyl alcohol

**Table 1. Summary of purification procedure of PVA oxidase**

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/ml)	Yield (%)	Purification fold
Culture broth	1,300	280	0.26	100	1
Ammonium sulfate treatment (80%)	280	145.6	0.52	52	2
DEAE-cellulose	60	49.6	0.83	17.7	3.2
Sephadex G-150	22	31.2	1.42	11.5	5.5
2nd DEAE-cellulose	12	25.8	2.15	9.2	8.3



**Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified PVA oxidase.**

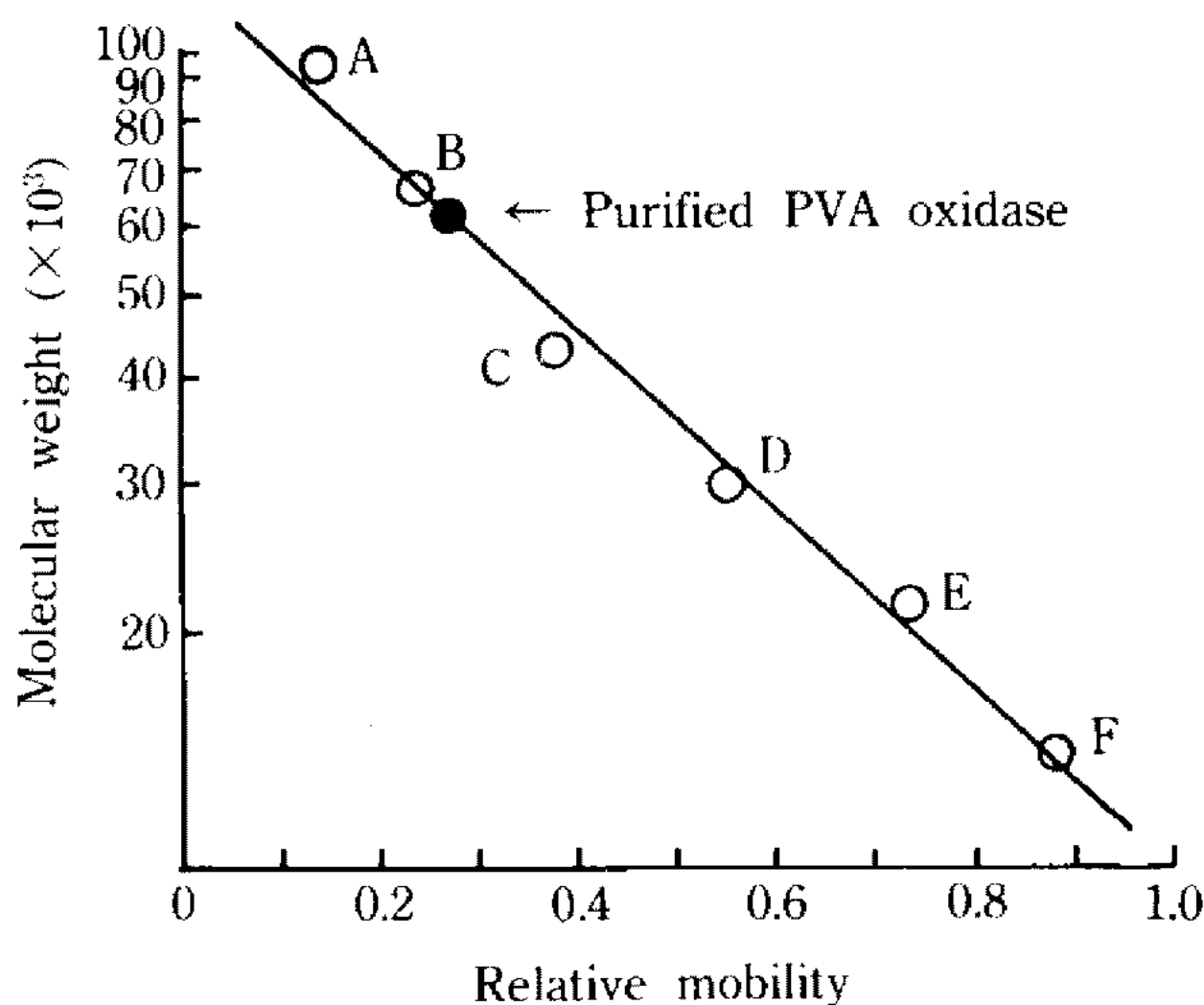
(A) SDS polyacrylamide gel.

Line 1. Standard protein

- A: Rabbit muscle phosphorylase b (MW 97,400)
- B: Bovine serum albumin (MW 66,200)
- C: Hen egg white ovalbumin (MW 45,000)
- D: Bovine carbonic anhydrase (MW 31,000)
- E: Soybean trypsin inhibitor (MW 21,500)

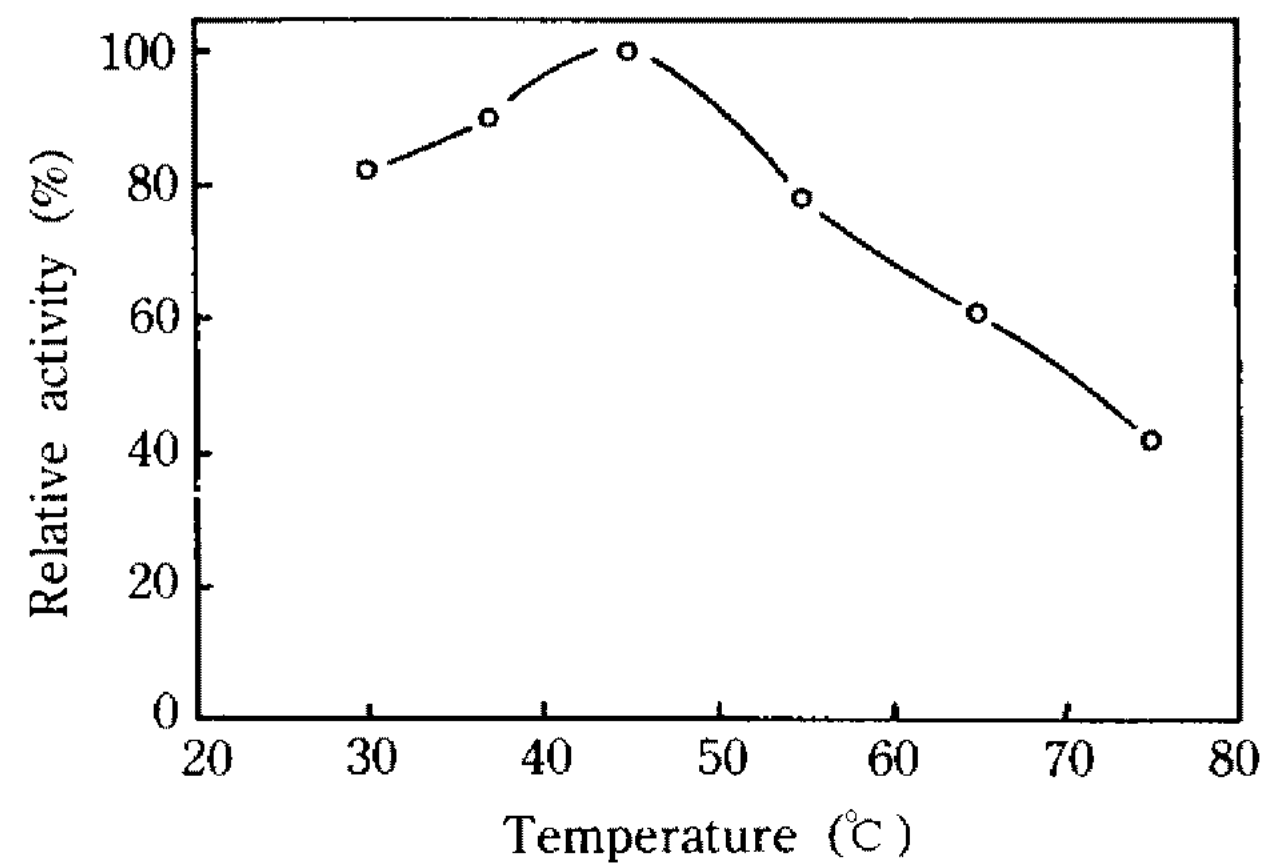
Line 2. Purified PVA oxidase

(B) Disc polyacrylamide gel in the absence of SDS.

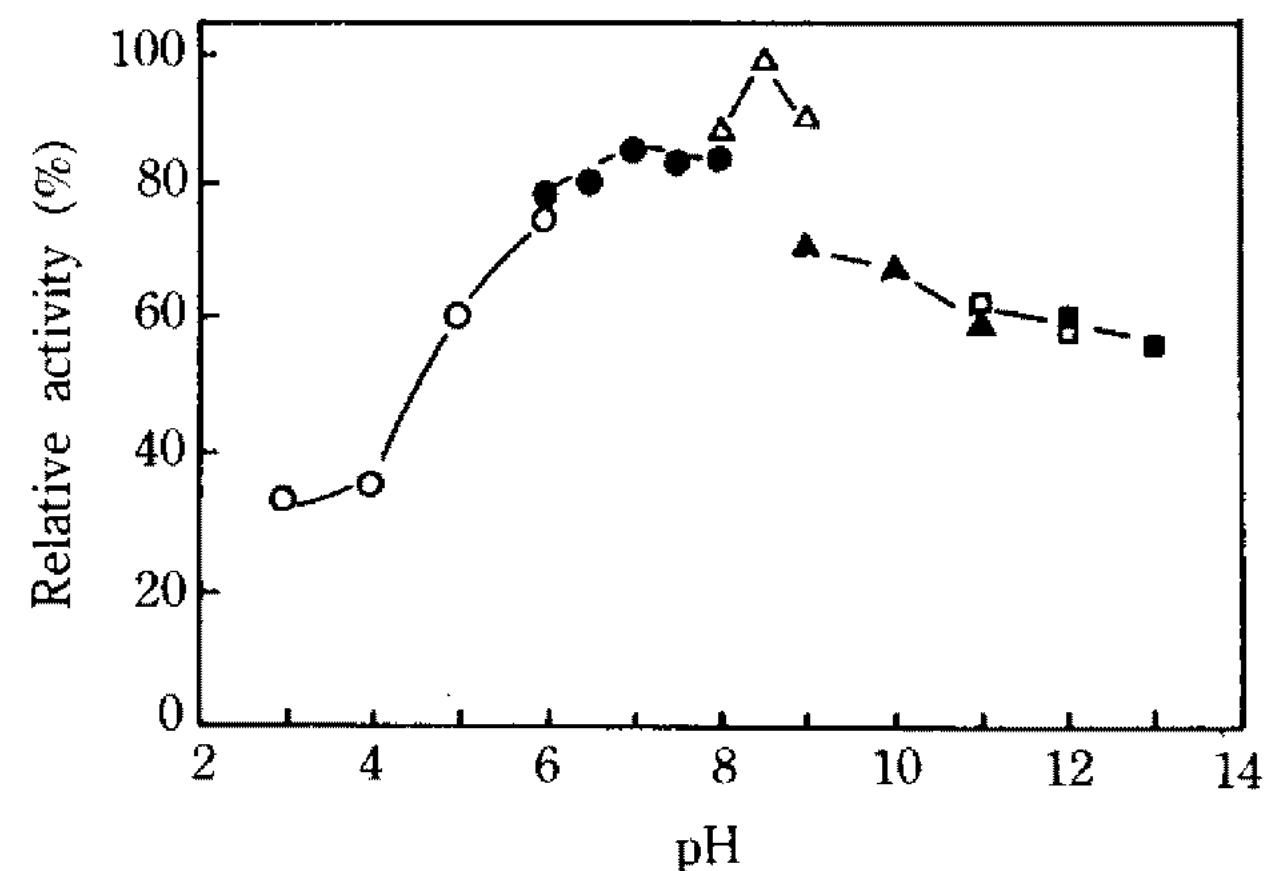


**Fig. 4. Molecular weight determination of PVA oxidase by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.**

- A: Rabbit muscle phosphorylase b (MW 97,400)
- B: Bovine serum albumin (MW 66,200)
- C: Hen egg white ovalbumin (MW 45,000)
- D: Bovine carbonic anhydrase (MW 31,000)
- E: Soybean trypsin inhibitor (MW 21,500)
- F: Hen egg white lysozyme (MW 14,400)



**Fig. 5. Effects of temperature on the activity of PVA oxidase.**



**Fig. 6. Optimum pH for the action of PVA oxidase.**  
 ○-NaOH-Citrate buffer; ●-Potassium phosphate buffer; △-Tris-HCl buffer; ▲-NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer; □-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH buffer; ■-KCl-NaOH buffer

나타났다. PVA oxidase의 최적 활성 온도는 Fig. 5에서와 같이 45°C에서 효소의 활성이 가장 높게 나타났다. 그리고, 최적 활성 pH는 Fig. 6에서와 같이 pH 8.5에서 가장 높게 나타났다.

PVA oxidase의 열안정성을 조사하기 위하여 온도 30~75°C까지의 범위에서 정제된 효소를 1시간 동안 열처리한 후 최적 활성 pH와 최적 활성온도에서 3시간 동안 반응시켜 잔존 활성을 측정하였다. Fig. 7에서와 같이 30°C에서 55°C까지는 거의 70% 정도의 효소 활성을 나타내었으나 60°C 이상부터는 활성이 급격히 감소하였다.

PVA oxidase의 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH 3에서 13까지의 범위에서 정제된 효소를 4°C에서 24시간 동안 방치한 후 최적 활성 pH와 최적 활성 온도에서 3시간 동안 반응시켜 잔존 활성을 측정한 결과는 Fig. 8과 같이 pH 6에서 10 사이에서 80% 이상의 잔존활성을 나타내었다.

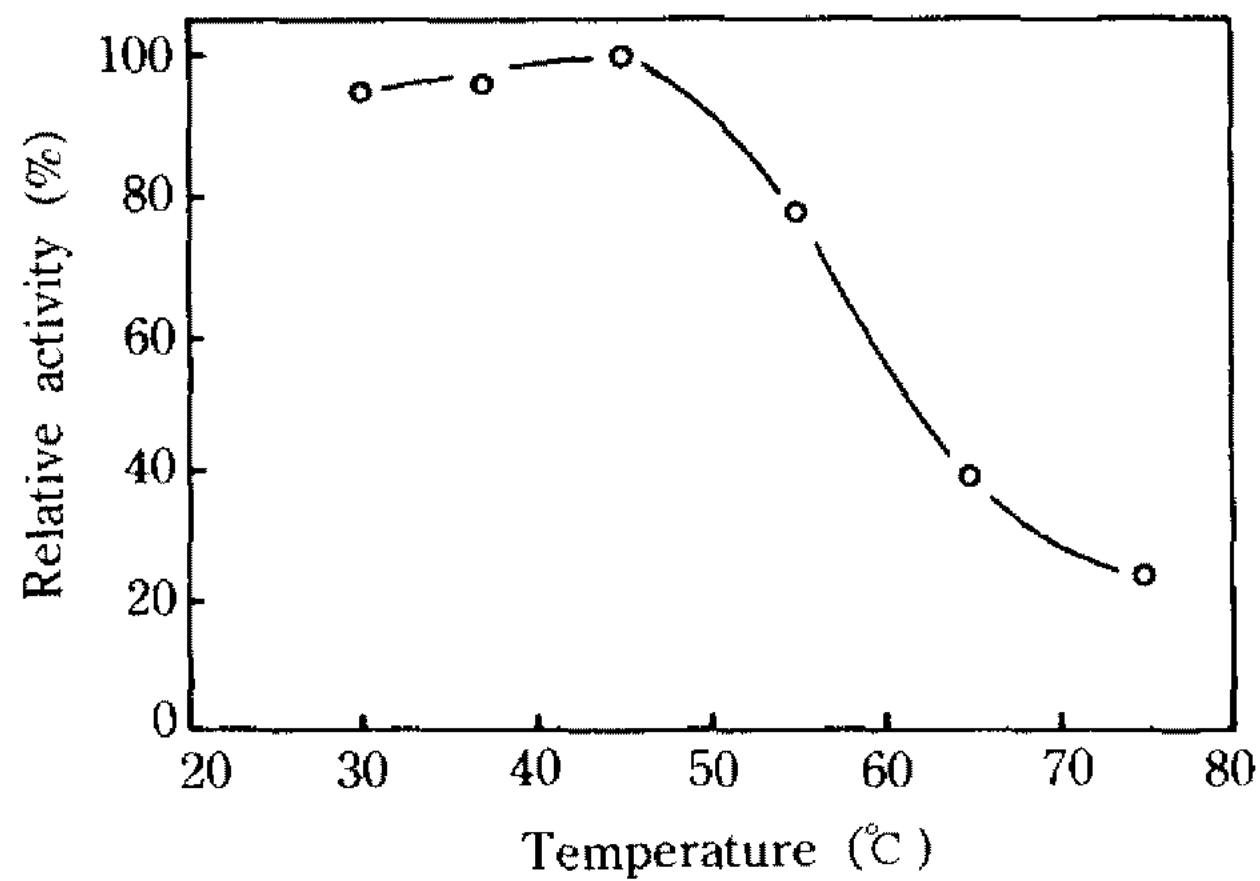


Fig. 7. Effect of temperature on the stability of PVA oxidase.

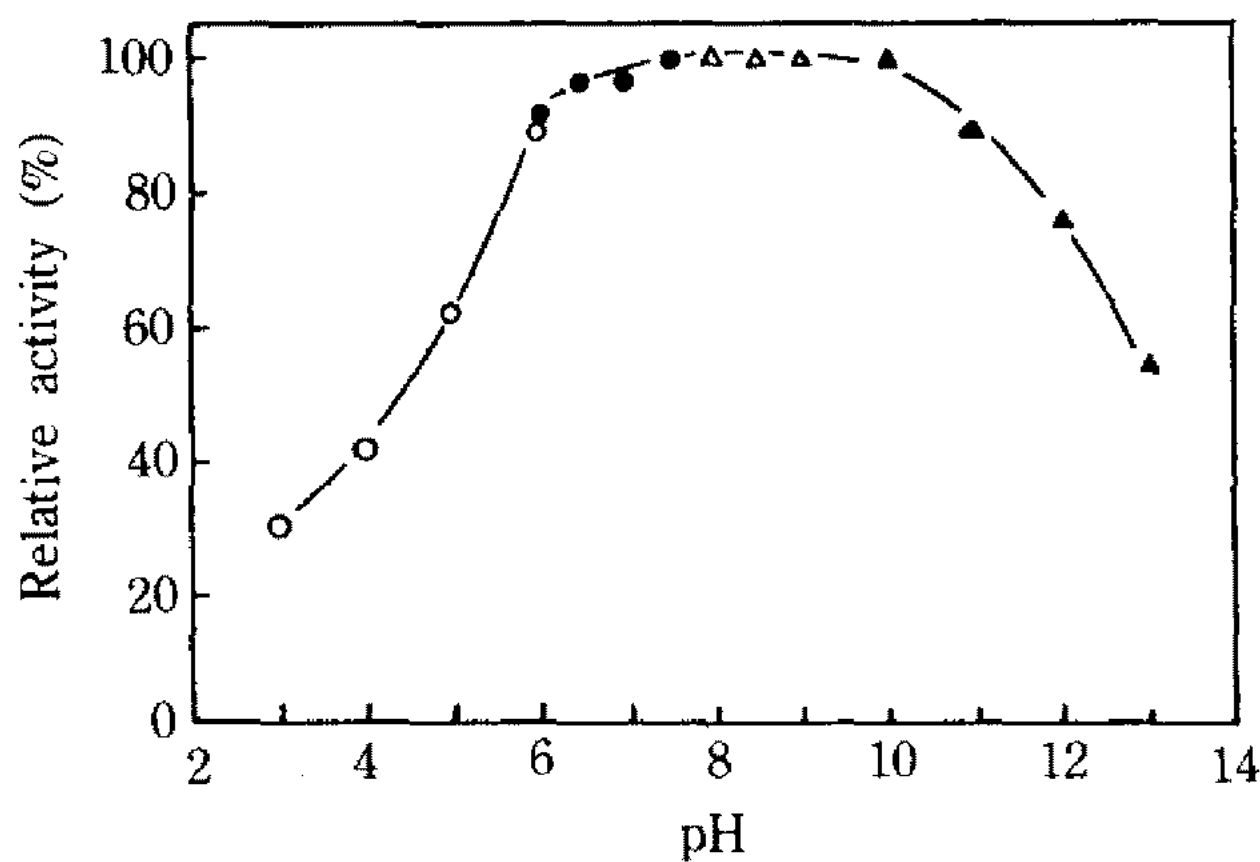


Fig. 8. pH stability of PVA oxidase. ○-NaOH-Citrate buffer; ●-Potassium phosphate buffer; △-Tris-HCl buffer; ▲-NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer

금속 이온에 대한 영향은 Table 2에서와 같이 Ag<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> 등에 의해 강한 저해를 받았으나, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> 등에는 영향을 받지 않았다. 나머지 대부분의 금속 이온에 의해서는 20~50% 정도의 활성이 저해되었다.

이상의 정제 PVA oxidase의 효소학적 특성은 Watanabe 등(10)에 의해서 *Pseudomonas* sp. 균주로부터 정제된 PVA oxidase와 그 특성이 매우 유사하였다. 그러나 Watanabe 등이 정제한 PVA oxidase가 특이하게 핑크 색을 나타낸다고 보고하였으나, 본 효소는 핑크색을 나타내지 않았다.

요 약

폴리비닐 알콜(PVA : Polyvinyl alcohol) 분해균인 *Pseudomonas cepacia* G5Y 균주로부터 PVA oxidase를 생산하여 이 효소를 정제하기 위하여 PVA가 첨가된 배지에서 진탕배양한 배양액을 원심 분리한 후 ammonium sulfate를 가하여 얻은 침전물을 phos-

Table 2. Effects of metal ions on PVA oxidase activity

Reagernts	Ions (1 mM)	Relative activity (%)
Buffer	None	100
AgNO <sub>3</sub>	Ag <sup>2+</sup>	0
CoCl <sub>2</sub>	Co <sup>2+</sup>	56
MgSO <sub>4</sub>	Mg <sup>2+</sup>	98
MnCl <sub>2</sub>	Mn <sup>2+</sup>	25
BaCl <sub>2</sub>	Ba <sup>2+</sup>	96
HgCl <sub>2</sub>	Hg <sup>2+</sup>	0
CaCl <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup>	23
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Pb <sup>2+</sup>	57
NiCl <sub>2</sub>	Ni <sup>2+</sup>	75
SnCl <sub>2</sub>	Sn <sup>2+</sup>	53
ZnSO <sub>4</sub>	Zn <sup>2+</sup>	81

phate 완충용액에 녹여 조효소로 사용하여 DEAE-Cellulose와 Sephadex G-150을 이용한 gel filtration을 통하여 PVA oxidase를 정제하였다. 정제된 PVA oxidase는 polyacrylamide gel 전기영동을 통해서 단일밴드를 확인할 수 있었으며, SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 분자량을 측정된 결과 약 60,000 daltons이었다. 이 효소의 최적온도는 45°C였으며 최적 pH는 8.5였다. 열안정성은 55°C까지는 안정하였으나, 그 이상에서는 효소의 활성이 급격히 저하되었다. pH 안정성은 pH 6에서 10까지는 거의 100%의 잔존 활성을 나타내었다.

금속 이온에 대한 영향은 Ag<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> 등에 의해 강한 저해를 받았으나, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> 등에는 영향을 받지 않았다. 나머지 대부분의 금속이온에 의해서는 20~50% 정도의 활성이 저해되었다.

감사의 말

이 연구는 1992년도 영남대학교 학술연구 조성비에 의해 이루어졌으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. S.Y. Jeong, Y.L. Jo, M.W. Cho and J.M. Kim. 1992. Isolation and characteristics of polyvinyl alcohol degrading bacteria. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 20(1): 96-101.
2. Suzuki, T., Y. Ichihara, M. Yamada and K. Tonomura. 1973. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agric.*



- Biol. Chem.* 37(4): 747-756.
3. Watanabe, Y., M. Morita, N. Hamada and Y. Tsujisaka. 1975. Formation of hydrogen peroxide by a polyvinyl alcohol degrading enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 39: 2447-2448.
  4. Sakazawa, C., M. Shima, Y. Taniguchi and N. Kato. 1981. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(1): 261-267.
  5. Suzuki, T. 1976. Purification and some properties of polyvinyl alcohol oxidase produced by *Pseudomonas* O-3. *Agric. Biol. Chem.* 40(3): 497-504.
  6. Suzuki, T. 1978. Oxidation of secondary alcohols by polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1187-1194.
  7. Watanabe, Y., N. Hamata, M. Moryta and Y. Tsujisaka. 1976. Purification and properties of polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.* 174: 575-581.
  8. Morita, M. and Y. Watanabe. 1977. A secondary alcohol oxidase: a component polyvinyl alcohol-degrading enzyme preparation. *Agric. Biol. Chem.* 41: 1535-1537.
  9. Morita, M., N. Hamata, K. Sakai and Y. Watanabe. 1979. Purification and properties of secondary alcohol-oxidase from a strain of *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 43(6): 1225-1235.
  10. Sakai, K., M. Morita, N. Hamata and Y. Watanabe. 1981. Purification and properties of oxidized polyvinyl alcohol-degrading enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 45(1): 63-71.
  11. Sakai, K., N. Hamata and Y. Watanabe. 1983. Separation of secondary alcohol oxidase and oxidized polyvinyl alcohol hydrolase by hydrophobic and dye-ligand chromatographies. *Agric. Biol. Chem.* 47(1): 153-155.
  12. Sakai, K., N. Hamata and Y. Watanabe. 1984. Non-enzymatic degradation of secondary alcohol oxidase-oxidized polyvinyl alcohol. *Agric. Biol. Chem.* 49(4): 1093-1095.
  13. Sakai, K., N. Hamata and Y. Watanabe. 1985. Purification and some properties of secondary alcohol oxidase with an acidic isoelectric point. *Agric. Biol. Chem.* 49(3): 817-825.
  14. Sakai, K., N. Hamata and Y. Watanabe. 1985. A new enzyme,  $\beta$ -diketone hydrolase: a component of polyvinyl alcohol-degrading enzyme preparation. *Agric. Biol. Chem.* 49(6): 1901-1902.
  15. Sakai, K., N. Hamata and Y. Watanabe. 1986. Degradation mechanism of polyvinyl alcohol by successive reactions of secondary alcohol oxidase and  $\beta$ -diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* 50(4): 989-996.
  16. Shima, M., Y. Taniguchi, S. Shikata, N. Kato and C. Sakazawa. 1982. Production of polyvinyl alcohol oxidase by symbiotic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(1): 28-32.
  17. Shima, M., T. Tsuda, M. Takahashi, N. Kato and C. Sakazawa. 1983. Purification of membrane-bound polyvinyl alcohol oxidase in *Pseudomonas* sp. VM15C. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 429-433.
  18. Shima, M., Y. Nishimura, M. Takahashi, N. Kato and C. Sakazawa. 1985. Localization of polyvinyl alcohol oxidase produced by a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(1): 8-10.
  19. Masayuki, S., Y. Taniguchi, S. Shikata, N. Kato and C. Sakazawa. 1982. Production of polyvinyl alcohol oxidase by a symbiotic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(1): 28-32.
  20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent.
  21. Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstein. Protein method. Wiley-liss. Pp. 143-160.
  22. Laemmli, V.K. and J. King. 1971. Polypeptide of tail fibers of Bacteriophage T-4. *J. Mol. Biol.* 62: 465-477.
  23. Jung S.Y. 1992, Isolation and some characteristics of Polyvinyl Alcohol(PVA) degrading Bacteria, Yeungnam univ, Graduate sch. 24-27

(Received 31 August 1994)