

폴리비닐 알콜 분해균 *Xanthomonas campestris* J2Y의 Polyvinyl alcohol oxidase 정제 및 성질

권대준 · 조윤래*

영남대학교 응용미생물학과

초록 : 생물학적 난분해성 물질인 폴리비닐 알콜(PVA : Polyvinyl alcohol)을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 *Xanthomonas campestris* J2Y로 부터 PVA oxidase를 생산하여 정제하기 위하여 PVA가 탄소원으로 첨가된 배지에서 진탕배양한 배양액을 원심분리한 후 상등액을 10 mM phosphate buffer(pH 7.5)로 평형시킨 DEAE-cellulose를 통과시켜 얻은 분획을 사용하여 DEAE-cellulose와 Sephadex G-150을 이용한 Gel filtration을 통하여 PVA oxidase를 정제하였다. 정제된 PVA oxidase는 polyacrylamide gel 전기영동으로 단일밴드로 확인되었으며, SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 Sephadex G-150 column chromatography를 통해 측정된 결과 55,000 daltons 이었다. PVA oxidase의 최적 pH는 7이고 최적 온도는 37°C였다. 열 안정성은 50°C까지는 70% 이상의 안정성을 나타내었고, pH에 대한 안정성은 5-11에서 비교적 안정하였다. 금속이온에 대한 영향은 Ag^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} 등에서는 아주 강한 저해를 받았고, Co^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} 에서는 50% 정도의 저해를 받았다. 반면에 Mn^{2+} , Cu^{2+} 는 효소활성을 증가시켰다. PVA에 대한 정제 PVA oxidase의 K_m 치는 7.04×10^{-4} mmol/l이었다.(1996년 8월 5일 접수, 1996년 9월 20일 수리)

서 론

고분자 유기합성 화합물은 그 이용도가 날로 증가추세에 있으나, 이들 고분자 유기화합물은 자연 중에서 분해가 어려운 난분해성 물질이 대부분을 차지하고 있어 이들이 자연에 유출되어 환경 오염을 가중시키고 있다. 이들 고분자 유기 화합물 중에서 Polyvinyl alcohol(PVA)은 난분해성의 수용성 물질로 직물 가공제, 접착제 및 유화 안정제 등 산업적으로 다방면에 이용되고 있으며, 이러한 PVA는 자연 환경에 유출될 경우 공공수역의 수질 오염의 원인이 되고 있다.

조¹⁾는 PVA를 빠른 시간내에 강력하게 분해하여 탄소 영양원으로 이용할 수 있는 미생물을 분리하여 폐수중의 PVA 제거 공정에 이용하기 위해 새로운 미생물 분리에 성공하여 이들 균주를 *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*으로 동정하였으며 각각 *Pseudomonas sp.* J2W와 *Xanthomonas sp.* J2Y로 명명하였다. 특히 이들은 공생적으로 PVA를 분해하여 탄소원으로 자화할 수 있었으며 이미 보고된 다른 미생물들에²⁻⁴⁾ 비해 분해능이 훨씬 우수하였다.

미생물에 의한 PVA 분해효소는 Suzuki,^{5,6)} Watanabe,^{3,7-15)} Sakazawa¹⁶⁻¹⁸⁾ 등에 의해 보고 되었으며, 특히 Watanabe등은 PVA 분해시 secondary alcohol oxidase에 의해 먼저 PVA가 산화된 후, 다시 β -diketone hydrolase의 작용으로 PVA가 분해된다고 보고하였다.

Xanthomonas sp. J2Y 균주는 PQQ가 존재할 경우 순수

배양으로 PVA를 분해하여 탄소원으로 자화할 수 있었다. 그러므로 이 균주는 PVA 분해관련효소의 생산 가능성을 보였다. 그래서, 본 보고에서는 *Xanthomonas sp.* J2Y 균주에 의한 PVA 이용에 대한 기작의 연구를 위해 PVA 분해의 첫단계인 PVA 산화단계에 작용하는 PVA oxidase를 정제하고 이들의 효소학적 특성을 조사하여 *Xanthomonas sp.* J2Y에 의한 PVA 이용에 대한 기작 연구의 기틀을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

본 연구에 사용한 DEAE-Cellulose, Polyvinylpyrrolidone(PVP-360), Sephadex G-150은 Sigma제를, 투석에 사용한 Cellulose tube(size : 32/16)는 Viskasa제를 사용하였으며, UV spectrophotometer는 Hitachi사의 U-2000을 사용하였다. Sonicator는 Braun Ultrasonic power사의 Braun-sonic 2000U를 사용하였다.

사용균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 조¹⁾가 염색 폐수로 부터 분리, 동정한 *Xanthomonas sp.* J2Y 균주를 사용하였고, 균주배양을 위한 배지로는 PVA배지에 Pyrroloquinoline quinone(PQQ)를 10 ng/ml 첨가하여 사용하였다.

찾는말 : *Xanthomonas sp.* J2Y, Polyvinyl alcohol oxidase, Polyvinyl alcohol(PVA)

*연락처자

배양 방법

Xanthomonas sp. J2Y를 PVA 배지에 접종하여 30°C, 180 rpm에서 7일간 前培養한 액을 새로운 PVA 배지에 10% (w/w) 접종하여 30°C, 180 rpm에서 3일간 배양하였다.

효소 활성 측정

PVA oxidase 역가의 측정은 Sakazawa¹⁹⁾ 등의 방법을 사용하였다. 150 μ mol의 phosphate 완충용액 (pH 7.5), 0.25 μ mol의 4-aminoantipyrine(Fluka 제), 3.2 μ mol의 phenol (Wako pure chemical Co.), 18 Unit의 peroxidase(EC 1.11.1.7 : Sigma chemical Co., TypeI), 기질로 22.5 mg의 PVA를 첨가하고 여기에 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 H₂O₂, 4-aminoantipyrine과 phenol이 결합하면서 나타나는 발색정도를 500 nm의 흡광도로 측정하였다. PVA oxidase 역가는 1분 동안에 1 μ mol의 H₂O₂를 생성하는 단백질 양을 1 Unit로 계산하였다.

단백질의 정량

Bovine serum albumin(Sigma 제)을 표준단백질로 사용하여 Lowry²⁰⁾ 등의 방법에 의해 정량하였으며, Column Chromatography 과정의 단백질 정량은 Hitachi사의 U-2000 spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서 흡광도로 측정하였다.

세포분획의 PVA oxidase 측정

Xanthomonas sp. J2Y 균주의 세포분획 PVA oxidase의 활성측정은 먼저 균배양액을 12,000 rpm으로 원심분리하여 세포와 배양액을 분획하였다. 또한 이때 침전된 균체를 0.01 M phosphate 완충용액으로 세척한 후 phosphate 완충용액에 현탁시켜 sonicator로 4°C에서 35 kHz, 5 min/ml로 균체를 파쇄하여 원심분리한 후 상등액을 세포 분획으로 취하였다.

PVA oxidase의 정제

Xanthomonas sp. J2Y의 PVA oxidase 조제는 탄소원인 PVA와의 분리와 농축의 효과를 위해 배양액을 50 mM Phosphate buffer (pH 7.5)로 평형시킨 DEAE-cellulose column (2.5×30 cm)에 통과시킨 후, 50mM Phosphate buffer (pH 7.5)로 washing 후 0.2M NaCl로 용출시킨 용액을 Diaflo PM10 ultrafiltration membrane (MW cut-off : 10,000)을 부착한 Amicon Diaflo System을 사용하여 질소가스로 가압, 농축후 Cellulose tube(size 32/16)로 24시간 투석하여 사용했다.

투석한 액을 재차 0.01M phosphate buffer(pH 7.5)로 평형시킨 DEAE-Cellulose column(2.5×30 cm)에 통과시킨 후 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M NaCl용액(0.01 M phosphate buffer)을 200 ml씩 단계별로 용출시켰다. 여기에 활성이 있는 부분을 모아 투석용 cellulose tube에 넣은 다음 PVP-360으

로 10 ml/정도 되게 탈수, 농축하였다. 이를 phosphate buffer로 평형시킨 Sephadex G-150 column(2.5×60 cm)으로 겔 거르기를 하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동

정제된 효소단백의 Polyacrylamide gel 전기영동은 Hames²¹⁾의 방법에 따라 실시하였다. 전기영동은 10 mA로 3시간 동안 실시하였고, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 탈색을 행하였다.

효소 분자량 측정

정제효소의 분자량 측정은 Sephadex G-150에 의한 column chromatography(1×80 cm)을 이용하여 행하였다. 표준단백은 Ferritin(MW : 450,000), Catalase(MW : 240,000), Aldolase(MW : 158,000), Bovine serum albumin(MW : 68,000), Hen egg albumin(MW : 45,000), Chymotrypsinogen A(MW : 25,000)를 사용하였다. PVA oxidase를 구성하는 subunit의 유무와 그 크기의 조사는 Laemmli와 King²²⁾의 방법에 따라 sodium dodesyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel로 전기영동을 실시하였다. 10% polyacrylamide gel을 이용하여 50 volt의 직류 전류로 약 5시간 동안 전기영동한 후 gel을 염색, 탈색하여 분자량을 확인하였다.

결과 및 고찰

PVA oxidase의 생산

Xanthomonas sp. J2Y 균주는 *Pseudomonas sp.* J2W 균주와 혼합배양시 PVA를 분해하여 탄소원으로 이용할 수 있다.¹⁾ 그러나 *Pseudomonas sp.* J2W 균주 대신 PQQ의 첨가로 *Xanthomonas sp.* J2Y 균주는 순수배양으로 PVA를 분해하여 탄소원으로 자화할 수 있었다. 그리고 *Xanthomonas sp.* J2Y 균주로 부터 PVA oxidase의 활성을 확인할 수 있었다. 이 *Xanthomonas sp.* J2Y 균주는 Fig. 1에서와 같이 3일 정도 배양시 최대의 PVA oxidase 활성을 나타내었으며 세포분획보다 배양액에서 보다 높은 PVA ox-

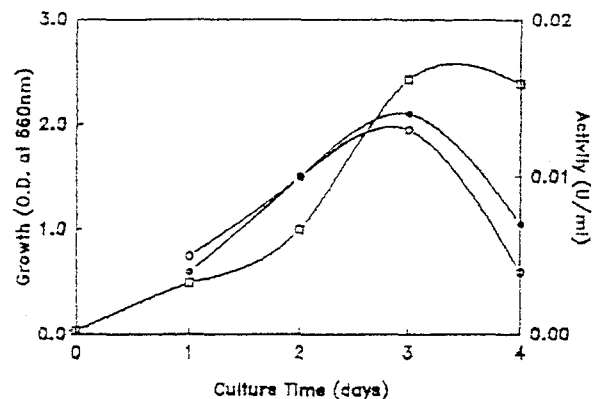


Fig. 1. PVA oxidase production by *Xanthomonas sp.* J2Y. (Symbols: □—□, Growth; ●—●, Extracellular enzyme activity; ○—○, Intracellular enzyme activity).

Table 1. Summary of purification procedure of PVA oxidase.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Culture broth	750.0	98	0.13	100	1
DEAE-cellulose (1 st)	36.77	38.4	1.04	39.1	8
DEAE-cellulose (2 nd)	8.32	28.8	3.46	29.3	26.6
Sephadex G-150	2.9	12.1	4.17	12.3	32

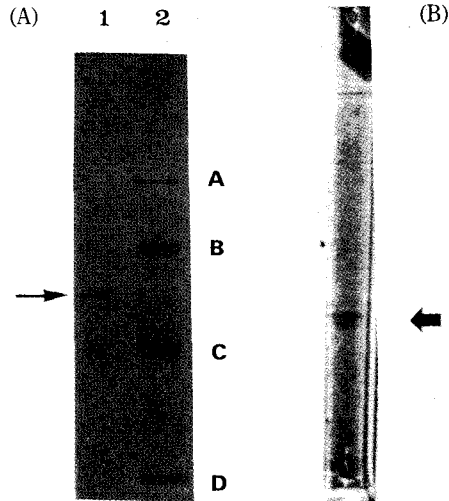


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified PVA oxidase. (A) SDS-polyacrylamide gel Line 1. Purified PVA oxidase Line 2. standard protein A: Rabbit muscle phosphorylase b (MW 97,400) B: Bovine serum albumin (MW 66,200) C: Hen egg white ovalbumin (MW 45,000) D: Bovine carbonic anhydrase (MW 31,000) (B) Disc Polyacrylamide gel in the absence of SDS.

idase 활성을 확인할 수 있었다. 그래서 본 실험에서는 *Xanthomonas sp.* J2Y 균주를 3일 배양한 배양액으로 부터 PVA oxidase를 정제하였다.

PVA oxidase의 정제

PVA oxidase의 정제과정을 Table 1과 같이 행하였다. *Xanthomonas sp.* J2Y의 배양액을 10 mM phosphate buffer (pH 7.5)로 평형 시킨 DEAE-Cellulose column를 통과 시킨 결과 0.2 M NaCl의 분획에서 PVA oxidase의 활성을 확인할 수 있으며, 이 분획을 Amicon diaflo system으로 10 ml 정도로 농축시켜 재차 DEAE-cellulose column에 통과 시킨 후 10 mM phosphate buffer로 농도별로 용출시켰다. 그 결과 0.1 M NaCl로 용출시킨 분획에서 활성이 나타났으며 다시 Sephadex G-150 column 겔거르기로 정제하였다.

이러한 과정을 통해 정제된 효소는 10% polyacrylamide gel과 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 통해 확인해 본 결과 Fig 2와 같이 단일밴드를 확인할 수 있었다.

PVA oxidase 분자량

정제된 PVA oxidase의 분자량을 측정하기 위하여 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide 전기영동을 실시한 결

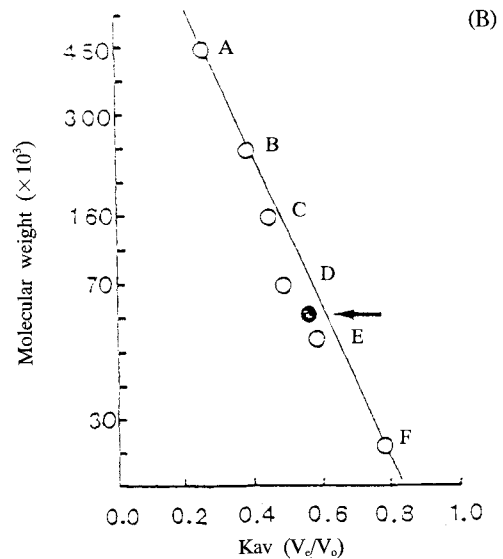
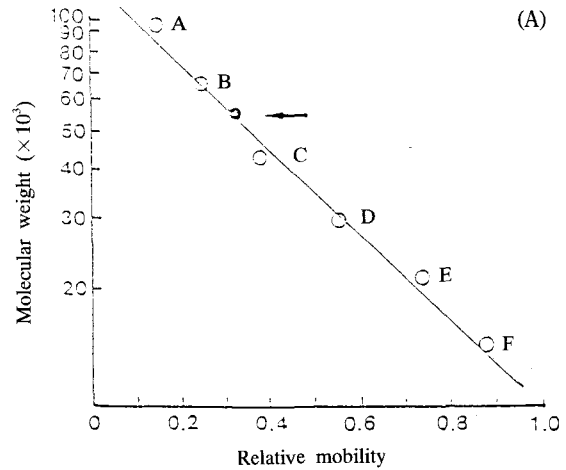


Fig. 3. Molecular weight determination of PVA oxidase. (A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis A: Rabbit muscle phosphorylase b (MW 97,400) B: Bovine serum albumin (MW 66,200) C: Hen egg white ovalbumin (MW 45,000) D: Bovine carbonic anhydrase (MW 31,000) E: Soybean trypsin inhibitor (MW 21,500) F: Hen egg white lysozyme (MW 14,400), (B) Sephadex G-150 Gel filtration chromatography A: Ferritin (MW 450,000) B: Catalase (MW 240,000) C: Aldolase (MW 158,000) D: Albumin bovine serum (MW 68,000) E: Albumin hen egg (MW 45,000) F: Chymotrypsinogen A (MW 25,000).

과 Fig. 2와 Fig. 3(A)와 같이 분자량은 55,000 daltons으로 확인되었으며 또한 Sephadex G-150 column 겔 거르기에 의한 분자량 측정도 Fig. 3(B)와 같이 거의 유사하였다.

이로써 정제 PVA oxidase는 monomer로 존재함을 알 수 있었다. 이 결과는 조²³⁾ 등이 앞서 보고한 *Pseudomonas sp.* G5Y의 PVA oxidase의 60,000 daltons 보다는 다소 작고 Suzuki,⁵⁾ Watanabe¹⁰⁾ 등이 보고한 45,000~50,000보다는 다소 크게 나타났다.

PVA oxidase 특성

PVA oxidase의 최적 반응 pH는 Fig. 4과 같이 pH 7로 나타났고, 최적 반응 온도는 Fig. 5과 같이 30°C에서 80°C까지 반응시켜 그 활성을 측정해본 결과 37°C에서 활성이 가

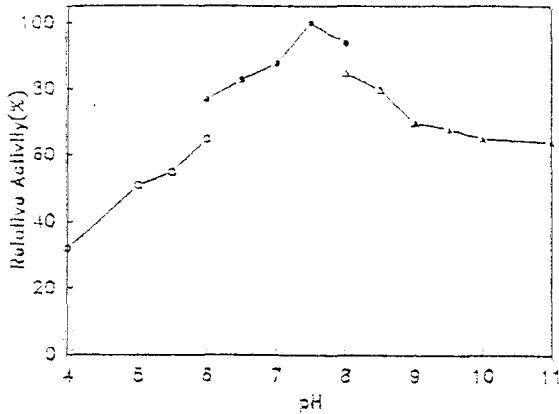


Fig. 4. Optimum pH of the action of PVA oxidase. (Symbols: ○—○, NaOH-Citrate buffer; ●—●, Potassium phosphate buffer; △—△, Tris-HCl buffer; ▲—▲, NaHCO₃-NaOH buffer).

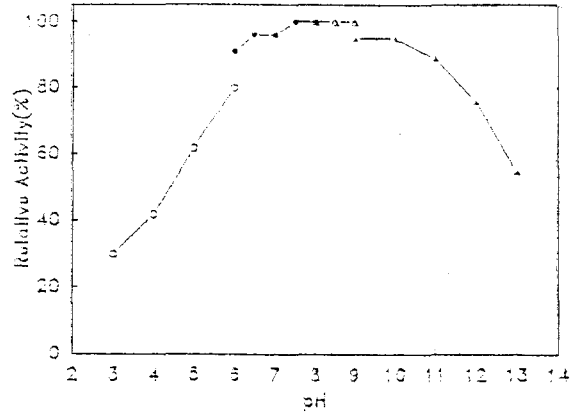


Fig. 6. Effect of pH on the stability of PVA oxidase. (Symbols: ○—○, NaOH-Citrate buffer; ●—●, Potassium phosphate buffer; △—△, Tris-HCl buffer; ▲—▲, NaHCO₃-NaOH buffer).

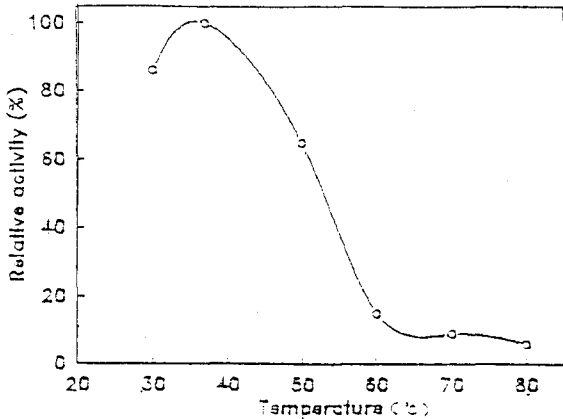


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of PVA oxidase.

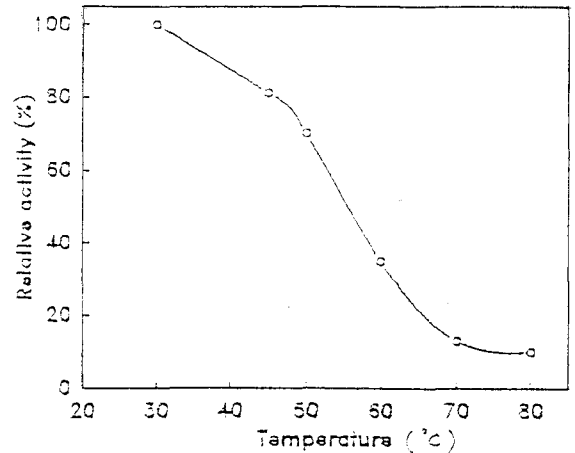


Fig. 7. Effect of temperature on the stability of PVA oxidase.

장 높았다.

이것은 Suzuki 등의 보고⁵⁾와는 약간 차이가 있었으나 거의 유사한 결과이다. PVA oxidase의 pH 안정성을 조사하기 위해 정제된 효소를 4°C에서 pH 3~13 범위에 24시간 방치시킨 후, 최적 온도와 최적 pH에서 반응시켰을 때 Fig. 6에서와 같이 pH 5~11에서 약 80% 이상의 잔존 활성을 나타내었고, 또한 PVA oxidase의 열 안정성을 조사하기 위해 정제된 효소를 30~80°C 온도에서 30분 동안 열처리한 후, 최적 pH와 최적 온도에서 반응시켜 잔존활성을 측정하였다.

그 결과는 Fig. 7에서와 같이 50°C까지는 70% 이상 잔존 활성을 나타내었지만, 60°C부터는 활성이 급격히 감소하였고, 70°C에서는 10% 이하로 감소하였다.

금속이온에 대한 영향은 최종농도를 1 mM로 해서 최적 반응온도와 최적 pH에서 반응시켰을 때 Table 2과 같이 Ag²⁺, Hg²⁺, Sn²⁺ 등에서는 아주 강한 저해를 받았고, Co²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺에서는 50% 정도의 저해를 받았다. 반면에 Mn²⁺, Cu²⁺ 등은 효소활성이 다소 촉진되었다.

이 PVA oxidase의 PVA에 대한 Km치는 Fig 8과 같이 7.04 × 10⁻² mmol/l로 나타났다.

PVA oxidase 활성에 대한 PQQ 영향

Table 2. Effects of metal ions on PVA oxidase.

Reagents	Ions	Relative activity (%)
Buffer	None	100
AgNO ₃	Ag ²⁺	3.5
CoCl ₂	Co ²⁺	42
MgSO ₄	Mg ²⁺	94
FeSO ₄	Fe ²⁺	49
MnCl ₂	Mn ²⁺	144
BaCl ₂	Ba ²⁺	105
HgCl ₂	Hg ²⁺	0
CuSO ₄	Cu ²⁺	150
ZnSO ₄	Zn ²⁺	46
CaCl ₂	Ca ²⁺	85
Pb(CH ₃ COO) ₂	Pb ²⁺	58
NiCl ₂	Ni ²⁺	70
SnCl ₂	Sn ²⁺	26
NaCO ₃	Na ²⁺	108

Xanthomonas sp. J2Y 균주는 PVA를 탄소원으로 자화하기 위해서는 PQQ를 요구하고 있다. 그래서 PVA분해과정에 포함된 PVA oxidase에 대한 PQQ의 영향을 조사하였다. Fig. 9과 같이 PQQ를 20 ng/ml의 농도까지 첨가해 반응시킨 결과, 아무런 영향을 미치지 않았다. 그래서 PQQ는

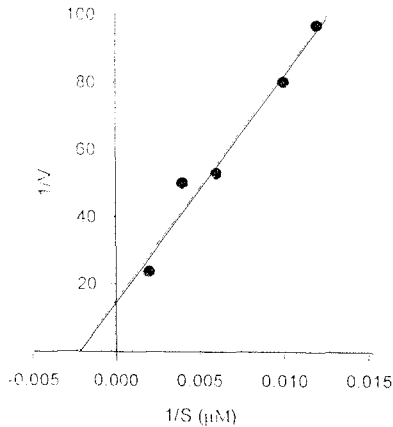


Fig. 8. Lineweaver-burk plot for the determination of Km value of PVA oxidase. Substrate: PVA pH: 7.0 Temperature: 37°C Time: 1 hr.

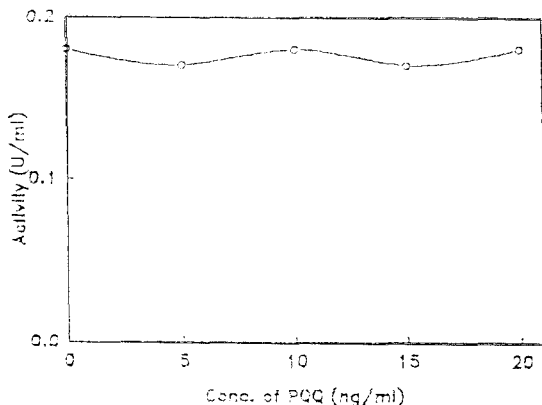


Fig. 9. Effect of PQQ on PVA oxidase activity.

Xanthomonas sp. J2Y 균주의 PVA 자화과정중 PVA oxidase의 작용이후의 특성의 과정에 작용하리라 생각된다. Sakazawa²⁴⁾ 등은 PQQ가 PVA dehydrogenase의 cofactor로 작용함을 보고한 바 있으며 *Xanthomonas sp.* J2Y균주의 PVA dehydrogenase 활성화에는 PQQ가 필수적임이 확인되었다. (원고투고예정)

감사의 글

이 연구는 1992년도 한국학술진흥재단 공모과제 연구비에 의하여 이루어졌으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 조운래 (1992) Polyvinyl alcohol 이용공생균 *Pseudomonas sp.* J2W와 *Xanthomonas sp.* J2Y의 특성. 한국농화학회지 **35**(1), 30-35.
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., N. Hamata, M. Morita and Y. Tsujisaka (1975) Formation of hydrogen peroxide by polyvinyl al-

- cohol-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-degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3. *Agric. Biol. chem.* **42**, 1187-1194.
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.* **48**(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 β -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 by successive reactions of secondary alcohol oxidase and β -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. and N.J. Roserbrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
21. Daniel M. Bollag, Stuart J (1991) Edelstein. Protein method. Wiley-Liss. P143-160.
22. Laemmli, V. K. and J. King (1971) Polypeptide of tail fibers of Bacteriophage T4. *J. Molbiol.* **62**, 465-477.
23. 장대균, 조윤래 (1995) 폴리비닐 알콜 분해균 *Pseudomonas cepacia* G5Y의 Polyvinyl alcohol oxidase 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지 **23**(2), 203-208.
24. Shimao, M., K. Ninomiya, O. Kuno, N. Kato and C. Sakazawa (1986) Existence of a Novel Enzyme, Pyroloquinoline Quinone-Dependent Polyvinyl Alcohol Dehydrogenase, in a Bacterial Symbiont *Pseudomonas sp.* Strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(2), 268-275.

Purification and Properties of the Polyvinyl alcohol oxidase from *Xanthomonas campestris* J2Y.

Dae-Jun Kwoen and Youl-Lae Jo* (Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea)

Abstract : The Polyvinyl alcohol(PVA) oxidase involved in PVA degradation by microorganism has been purified to homogeneity from culture broth of *Xanthomonas campestris* J2Y grown in a minimal medium containing PVA as a sole carbon source. The enzyme was purified by DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-150 gel filtration. The purified PVA oxidase was electrophoretically homogeneous both in the absence and presence of SDS. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 55,000 daltons by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Sephadex G-150 gel filtration. The native enzyme existed as a monomer. The optimal pH and temperature was shown to be pH 7 and 37°C respectively. The activity of enzyme was stable below 55°C and between pH range of 5-11. The enzyme activity was significantly inhibited by metal compounds such as Ag²⁺, Hg²⁺. While, metal ions such as Mn²⁺ and Cu²⁺ stimulated the reaction. Km value of the enzyme for PVA was 7.04 × 10⁻³ mmol/l.

*Corresponding author