

Microbacterium barkeri KCCM 10507 및 *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508에서 분비되는 PVA 분해 효소의 특성 연구

최 광 근 · ¹김 상 용 · ²류 원 석 · † 이 진 원
서강대학교 화공생명공학과, ¹한국생산기술연구원, ²영남대학교 섬유패션학부
(접수 : 2005. 7. 29., 게재승인 : 2006. 1. 18.)

Characterization of PVA Degrading Enzymes from *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508

Kwangkeun Choi, Sangyong Kim¹, Wonseok Lyoo², and Jinwon Lee†
Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea
¹Korea Institute of Industrial Technology, Chonan 330-825, Korea
²School of Textiles, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea
(Received : 2005. 7. 29., Accepted : 2006. 1. 18.)

The purpose of this study is to search the characteristics of PVA degrading enzymes which were obtained from *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508, respectively. As a result of the PVA degrading test using crude enzymes, the activity of SAO (secondary alcohol oxidase) was maximized after 2 or 3 days from start of the test, while the activity of BDH (β -diketone hydrolase) was gradually increased during the test. Activities of them were maintained in the presence of PVA, but as PVA was gradually degraded, their activity was decreased. PVA was inoculated again into the media, their activity was revealed. This result indicated that above two different enzymes were closely connected with PVA degradation and PVA was degraded by activity of SAO and BDH. Maximum activity of them was 1.5-1.8 unit for SAO and 1.5-2.0 unit for BDH under 35°C and pH 7.8-8.8, respectively.

Key Words : β -diketone hydrolase, PVA degrading enzymes, secondary alcohol oxidase

서 론

현재까지 많은 PVA (polyvinyl alcohol) 분해용 균주가 분리되어 PVA를 포함하고 있는 폐수의 처리에 이용되고 있다. 일반적으로 PVA 분해를 위해서는 단일 균주를 이용하기보다는 서로 다른 두 종의 공생작용을 이용하는 방법이 더욱 효과적인 것으로 보고되고 있다(1). 하지만 균주만을 이용하는 경우보다 세밀한 연구 진행이 어려워, PVA 분해 효소를 이용하여 PVA 분해 경로 등을 추정하는 연구가 보고되면서(2), PVA 분해 균주에서 효소를 분리하여 PVA 분해 기작 연구 및 균주를 이용했을 때와의 분해 효율 비교를 진행하는 연구 등, PVA 분해에 효소를 이용하는 많

은 연구가 보고되고 있다(2-14). 이 중에서, Sakazawa 등은 PVA는 먼저 secondary alcohol oxidase (SAO)에 의해 분해된 후 β -diketone hydrolase (BDH)에 의해 완전 분해되는 것으로 보고하고 있다(2). 즉, PVA는 SAO에 의해 먼저 산화되어 H₂O₂와 ketone으로 분해된 후 BDH에 의해 완전 분해된다. 또한, PVA 분해에 있어서는 상기 두 가지 효소가 반드시 필요한데, 이러한 효소는 배지 내에 PVA가 존재할 때에만 그 활성을 나타낼 수 있는 것으로 보고하고 있다.

많은 연구 결과를 토대로 PVA가 유사한 구조를 가지고 있는 고분자 물질의 분해에 이용되는 효소가 데이터베이스화 되어 있다. 이러한 데이터베이스 중 상기 두 가지 효소의 특성은 BRENDA 등(5) 각종 효소에 대한 정보를 제공하는 데이터베이스에서 찾아볼 수 있는데, PVA 분해와 관련된 효소 중 secondary alcohol oxidase (SAO)는 EC 1.1.3.18로써, 그리고 β -diketone hydrolase (BDH)는 EC 3.7.1.7로써 그 특성을 알아볼 수 있다. 각종 데이터베이스에서 볼 수 있는 SAO와 BDH는 PVA를 원시료로 사용하여 진행한 연구에서 얻은 효소가 아니고 각각 secondary alcohol과 nonane-4,6-dione을 사용하여 얻은

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea
Tel : +82-2-705-8919, Fax : +82-2-702-7926
E-mail : jinwonlee@sogang.ac.kr

효소의 특성이다. 따라서 PVA를 원시료로 사용하여 PVA 분해효소의 특성을 밝힌 연구는 매우 드문 실정이다. 또한, PVA 분해 효소는 매우 적은 균주 (특히, *Pseudomonas* sp.)에서 분리되고 있으며, 다양한 PVA 분해 균주를 이용하여 PVA 분해 효소의 특성을 밝히는 연구 또한 매우 적은 실정이다.

이에, 본 연구에서는 새롭게 분리한 두 종의 PVA 분해 균주에 대해 PVA 분해 시 나타나는 효소의 특성을 살펴보고자 하였다. 즉, 본 연구에서 새롭게 분리한 두 종의 PVA 분해 균주에 의한 PVA 분해 시 분비되는 효소의 특성 및 PVA 분해 효소의 최적 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에서 사용한 균주는 앞선 연구에서 PVA가 포함되어 있는 염색폐수로부터 순수 분리한 두 종의 균주, *Microbacterium barkeri* KCCM 10507과 *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508을 사용하였다 (16).

사용 배지

상기 두 종 균주의 배양을 위해 Suzuki 등(14)이 사용한 배지를 조정하여 사용하였으며, 그 조성은 다음과 같다. 중합도 500의 PVA를 유일탄소원 및 에너지원으로 사용하였다. 그 외 조성으로는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, KH_2PO_4 0.4 g, K_2HPO_4 3.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, yeast extract 1 g이며, 이를 증류수에 녹여 최종 부피를 1 L로 하였다. 또한, PVA가 존재하지 않는 배지에서의 PVA 분해 효소 분비 여부를 확인해보기 위하여 PVA가 포함되어 있지 않은 영양배지 (nutrient broth)를 비교용 배지로 사용하였다.

효소 분석

상기 두 종의 균주를 각각 전배양한 다음 배양액을 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 제거한 후 그 상등액을 crude enzyme으로 사용하였다. 두 종의 균주에서 분비된 효소는 실험 편의상 PE와 ME로 명명하였는데, PE는 *P. amylolyticus* KCCM 10508에서 분비된 crude enzyme을 말하며, ME는 *M. barkeri* KCCM 10507에서 분비된 crude enzyme을 지칭한다.

먼저, PVA를 산화시키는 효소, 즉 PVA oxidase의 활성을 측정하기 위해 다음과 같은 방법을 사용하였다. 22.5 mg의 PVA를 기질로 사용하고, peroxidase, phosphate buffer, 4-aminoantipyrine, 그리고 phenol을 1.5 ml의 crude enzyme과 혼합하여 총 반응혼합물의 부피를 3 ml로 만든다. 이 효소 반응물을 30°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 효소의 활성을 측정하였다. 반응 후 H_2O_2 와 4-aminoantipyrine 그리고 phenol의 반응에 의해 나타난 색을 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 550 nm에서 측정하였다. 측정된 PVA oxidase의 활성 단위는 1 분간 생성된 1 μmol 의 H_2O_2 의 양으로 하였다.

또 다른 효소인 PVA hydrolase의 활성 측정은 다음과 같은 방법을 사용하였다. 이 방법에서도 PVA를 기질로 사용하였고, phosphate buffer, KCN, 2,6-dichlorophenolindophenol

(DCPIP), phenazine methosulfate (PMS), 그리고 crude enzyme을 혼합하여 총 혼합 반응물 3 ml를 제조한 후 이 효소 반응물을 30°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 PVA hydrolase의 활성을 측정하였다. 이 경우에는 DCPIP를 600 nm에서 측정하여 분당 환원된 1 μmol 의 DCPIP 양을 1 단위로 계산하였다.

효소의 활성 측정

PE와 ME의 활성에 대한 온도와 pH의 영향을 살펴보고자 온도는 20~80°C의 범위에서 10°C 간격으로 측정하였으며, pH는 2~10의 범위에서 pH 1 간격으로 측정하였다. pH 조정을 위해서는 인산 표준 완충용액을 사용하였다. 상기 온도 및 pH 범위에서 처리된 효소에 PVA를 주입하고 세 시간 동안 반응시킨 후 잔여 PVA 농도를 측정하여 각 조건에서의 효소 활성을 측정하였다.

효소에 의한 PVA 분해

PE와 ME를 PVA 분해에 적용하기에 앞서, PVA의 크기 및 분자량 등을 고려하여 PVA 분해효소는 PVA가 존재할 때에만 체외로 분비되는 효소일 것이라고 예측하였다. 따라서 PVA 분해 시험에 앞서, 먼저 상기 두 종의 균주, 즉 *M. barkeri* KCCM 10507 및 *P. amylolyticus* KCCM 10508이 PVA 분해 시 효소를 분비하는 가, 분비한다면 PVA의 존재와는 어떤 관계가 있는 가를 조사하였다. 이 시험에는 PVA가 포함되어 있는 고체배지와 PVA가 포함되어 있지 않은 고체배지를 사용하였으며, 각 고체배지에 PE와 ME를 각각 도말하고 일정시간을 경과시킨 후 고체배지에 Finley 법을 적용하여 고체배지 상에 뚜명한 지역이 나타나는 지를 확인하였다.

이 실험 후 PE와 ME를 PVA 분해에 적용하여 PVA가 분해되어 그 농도가 감소해감에 따라 PE와 ME의 농도 변화에 어떤 영향을 주는 지를 조사해 보았다. 또한, PVA가 완전히 분해되어 배지 상에서 사라진 후 재차 PVA를 배지 내에 주입하게 되면 상기 두 가지 효소의 활성에 어떤 영향을 주는지를 조사해 보았다.

결과 및 고찰

우선, 상기 두 종의 균주, 즉, *M. barkeri*와 *P. amylolyticus*가 체외 효소를 이용하여 PVA를 분해하는 가를 확인하기 위한 시험을 진행한 후 그 결과를 Fig. 1에 보였다. 상기에 서술하였듯이 PVA의 크기 및 분자량 등을 고려하면 PVA 분해 효소는 PVA가 존재할 때에만 체외 효소로 분비된다고 예측하였다.

Fig. 1에서 PE와 ME는 앞서 기술한 것처럼 *P. amylolyticus*와 *M. barkeri*에서 분비된 crude enzyme을 각각 나타낸 것이고, _NB 및 _PVA는 각각 PVA가 포함되어 있지 않은 배지 및 PVA가 포함되어 있는 배지를 나타낸 것이다.

결과적으로, Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼, PVA가 기질로써 배지에 포함되어 있는 경우가 그렇지 않은 경우보다 PVA 분해 효율이 매우 높다는 것을 알 수 있다. 즉, PVA가 포함되어 있는 경우에는 60~70%의 PVA 분해 효율을 보인 반면, 그렇지 않은 경우에는 두 가지 효소 모두 약 10% 미만의 분해 효율을 보이고 있다. 따라서 본 연구에서 새롭게 분리한 두 종의 균

주는 PVA 분해 시 효소를 분비하고 있었으며, PVA가 배지 내에 기질로써 존재하는 경우에만 PVA 분해 효소를 분비하는 것으로 사료된다.

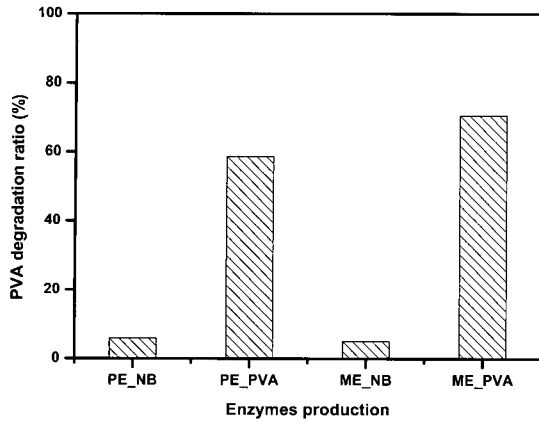


Figure 1. Effect of PVA as substrate in media on production of PVA degrading enzymes.

이로써 본 연구에서 새롭게 분리한 두 종의 균주는 PVA 분해 시 효소를 분비하는 것을 알 수 있었는데, 상기에 서술한 것처럼, PVA는 두 가지 효소에 의해 완전 분해된다. 즉, PVA는 secondary alcohol oxidase (SAO)와 β -diketone hydrolase (BDH)에 의해 완전 분해된다. 본 연구에서 분리한 crude enzyme도 이러한 두 가지 효소의 활성을 보이면서 PVA가 분해되는 지 5일

동안 최적조건 하에서 시험을 진행한 후 그 결과를 Fig. 2에 보였다.

Fig. 2의 (a)와 (b)는 각각 ME와 PE의 crude enzyme를 시험한 결과를 보인 것이다. Fig. 2에서 알 수 있듯이, 5일 후 PVA는 완전히 분해되었으며, 이에 따라 균주 성장과 PVA 분해효소의 농도가 증가한 것을 알 수 있었다. 즉, 상기 두 종의 균주는 PVA를 분해할 때 SAO와 BDH 효소를 분비하여 PVA를 분해하는 것으로 사료된다. SAO 및 BDH 활성의 특성은 ME 및 PE 모두 유사하였는데, PVA가 분해되어 감에 따라, SAO의 활성은 증가하다가 감소하는 경향을 보였으며, BDH는 계속적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 다시 말하면, PVA 분해 초기에는 SAO의 활성이 BDH의 활성보다 강하게 나타나고 있음을 알 수 있었는데, 이 실험 결과로 보아 본 연구에서 분리한 두 종의 균주 또한 PVA 분해 시 SAO에 의해 우선적으로 PVA가 산화된 다음 BDH에 의해 분해되는 것으로 사료된다.

Fig. 2의 결과로써 알 수 있듯이, 본 연구에서 분리한 두 종의 균주도 PVA를 분해할 때 효소를 분비하는 것을 알 수 있었다. 이러한 효소의 활성에 대한 온도 및 pH의 영향을 살펴본 후 그 결과를 Fig. 3에 보였다.

Fig. 3의 (a) 및 (b)는 각각 PE와 ME의 활성에 대한 온도 및 pH의 영향을 나타낸 것이며, 각각의 효소에 대한 활성을 relative activity로 나타내었다. 먼저 Fig. 3(a)에서 볼 수 있듯이, PE 및 ME의 활성에 대한 온도의 영향은 PE에 대해서는 37°C 그리고 ME에 대해서는 34°C에서 최적의 활성을 보인다는 것을 알 수 있다. 또한, Fig. 3(b)에는 PE 및 ME의 활성에 대한 pH

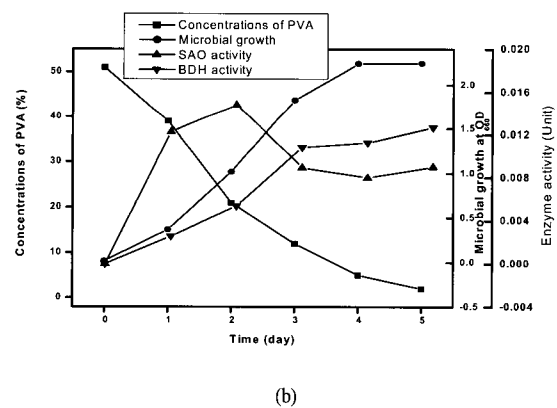
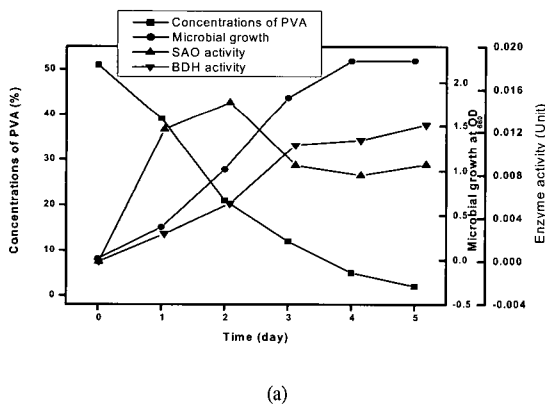


Figure 2. PVA degrading enzyme production from (a) *M. barkeri* KCCM 10507 and (b) *P. amylolyticus* KCCM 10508 with time.

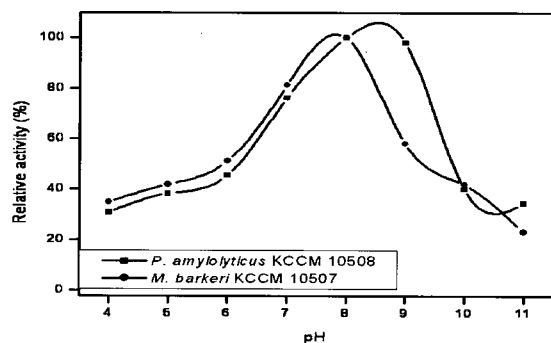
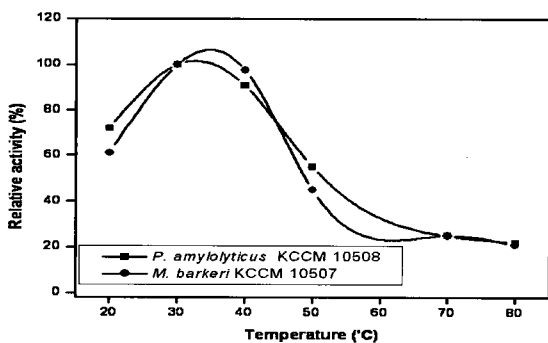


Figure 3. Effect of temperature and pH on the activity of PVA degrading enzymes.

의 영향을 나타내었는데, Fig. 3(b)에서 볼 수 있듯이, PE의 활성은 pH 7.8에서, 그리고 ME의 활성은 pH 8.8에서 최적의 결과를 보임을 알 수 있다. 즉, 상기 두 가지 효소의 활성에 대한 최적 온도는 비슷하나 pH 범위는 서로 상이함을 알 수 있었다. 이 실험 후, 각 효소의 안정성에 대한 온도 및 pH의 영향을 조사한 결과 PE는 온도 30~40℃, pH는 6~9에서 안정한 것을 알 수 있었고, ME의 안정성에 대한 온도의 영향은 PE와 같았으며, pH는 6~8 사이에서 안정한 것을 알 수 있었다.

마지막으로 상기에서 결정된 최적조건하에서 15일 동안 PVA 분해 실험을 진행한 후, 그 결과를 Fig. 4에 보였다.

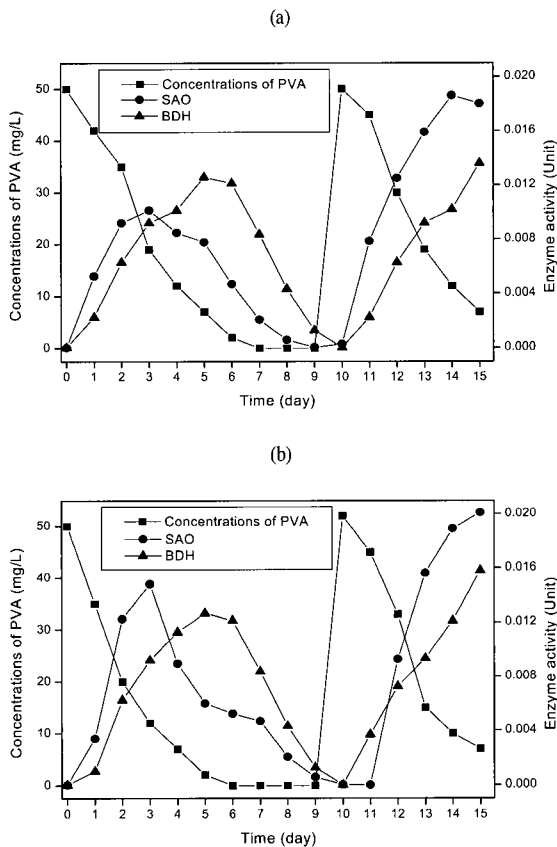


Figure 4. Activities of (a) PE and (b) ME with PVA adding.

Fig. 4에서 알 수 있듯이, 실험 진행 6일 후 PVA는 완전히 분해된다. 이 때 재차 PVA를 주입하는 형식으로 15일 동안 실험을 진행하면서 SAO와 BDH의 활성을 측정해 보았다. Fig. 4의 (a)와 (b)에는 각각 PE 및 ME의 활성을 보였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, 실험 진행 6일 후 PVA가 완전 분해되어 감에 따라 SAO와 BDH의 활성 또한 점차 감소됨을 알 수 있었다. 하지만, BDH의 활성은 PVA가 완전히 분해된 후에도 그 활성을 보이는 것으로 보아 Finely 방법으로 측정되는 PVA는 완전히 분해된 것으로 나타나지만, 아직 PVA의 잔여물이 남아 있는 것으로 사료된다. 실험 진행에 따라 PVA가 완전 분해됨에 따라 SAO와 BDH의 활성이 점차 감소하여 약 9일 경과 후에는 두 효소의 활성이 사라짐을 알 수 있었으며, 이 때 다시 PVA를 주입하자 이 두 효소의 활성이 다시 나타나고 있음을 알 수 있었다.

이로써, SAO와 BDH의 활성은 PVA가 존재할 때에만 나타나는 것을 재차 확인할 수 있었으며, 이 두 가지 효소에 의해서 PVA가 분해됨을 알 수 있었다.

요 약

본 연구의 목표는 새롭게 분리한 두 종의 균주 *Microbacterium barkeri* KCCM 10507과 *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508에서 분비되는 PVA 분해 효소의 특성을 알아보고자 하였다. 상기 두 종의 균주로부터 얻은 crude enzyme를 사용하여 PVA 분해 실험을 진행한 결과, SAO의 활성은 시험 시작 후 2일 혹은 3일 후 최대를 보인 반면, BDH의 활성은 시험 내내 점차 증가하는 경향을 보였다. 또한, 배지 내에 PVA가 존재하면 이들 효소의 활성이 유지되었으나, PVA가 배지에서 완전히 사라지게 되면, PVA 분해 효소의 활성도 사라졌다. 배지에 다시 PVA를 주입하면 이들 효소의 활성이 다시 나타났다. 이 결과를 통해 상기 두 종의 효소는 PVA 분해와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었고, PVA는 SAO와 BDH의 활성에 의해 분해된다는 것을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 차세대 핵심 환경기술 개발 사업 (난분해성 염색가공 폐액의 복합 고도처리 및 재이용 공정 개발)의 지원을 받아 수행하게 되어 이에 감사를 드리는 바이며, 아울러 국가지정연구실 사업 (선택적 고정화 생물반응 및 NF 분리 복합공정에 의한 섬유가공 폐수의 공정내 재이용 및 무배출 관리기술)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, C. K., Y. J. Choi, C. W. Lee, Y. T. Rim, and J. K. Ryu (1997), PVA removal from textile wastewater by the symbiotic PVA-utilizing bacteria, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 89-95.
- Shimao, M., K. Ninomiya, O. Kuno, N. Kato, and C. Sakazawa (1986), Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinine dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. Strain VM15C, *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 268-275.
- Suzuki, T., Y. Ichihara, M. Yamada, and K. Tonomura (1973), Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol, *Agr. Biol. Chem.* **37**, 747-756.
- Suzuki, T. (1978), Oxidation of secondary alcohols by polyvinyl alcohol degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1187-1194.
- Kwon, D. J. and Y. L. Jo (1996), Purification and properties of the polyvinyl alcohol oxidase from *Xanthomonas campestris* J2Y, *Agric. Chem. Biotechnol.* **39**, 349-354.
- 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.

7. Shimao, M., Y. Taniguchi, S. Shikata, N. Kato, and C. Sakazawa (1982), Production of polyvinyl alcohol oxidase by a symbiotic mixed culture, *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 28-32.
8. Sakai, K., N. Hamada, and Y. Watanabe (1986), Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and β -diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp., *Agric. Biol. Chem.* **50**, 989-996.
9. Hatanaka, T., N. Asahi, and M. Tsuji (1995), Purification and characterization of poly(vinyl alcohol) dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 113P3, *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1813-1816.
10. Mejia, A. I., J. Lopez, and A. P. Mulet (1999), Biodegradation of poly(vinyl alcohol) with enzymatic extracts of *Phanerochaete chrysosporium*, *Macromol. Symp.* **148**, 131-147.
11. Sakai, K., M. Fukuda, Y. Hasui, K. Moriyoshi, T. Ohmoto, T. Fujita, and T. Ohe (1998), Purification and characterization of an esterase involved in poly(vinyl alcohol) degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2000-2007.
12. Sakai, K., M. Morita, N. Hamada, and Y. Watanabe (1981), Purification and properties of oxidized poly(vinyl alcohol) degrading enzyme, *Agric. Biol. Chem.* **45**, 63-67.
13. Kawagoshi, Y. Y. Mitihiro, M. Fujita, and S. Hashimoto (1997), Production and recovery of an enzyme from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH that degrades polyvinyl alcohol, *World. J. Microb. Biot.* **13**, 63-67.
14. Suzuki, T. (1976), Purification and some properties of polyvinyl alcohol degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3, *Agric. Biol. Chem.* **40**, 497-504.
15. <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
16. Choi, K. K., J. C. Shin, H. H. Jeon, S. Y. Kim, W. S. Lyoo, and J. W. Lee (2003), Isolation and characterization of *Microbacterium barkeri* LCa and *Paenibacillus amylolyticus* LCb for PVA (Polyvinyl Alcohol) degradation. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 479-484.