

Thermus caldophilus GK24로부터 내열성 alkaline phosphatase의 최적생산

김유진 · 전명숙 · 김현규 · 권석태*

성균관대학교 유전공학과

초록 : 내열성 alkaline phosphatase의 탐색을 위해 극도호열균중에서 *Thermus caldophilus* GK24 균주를 선정하였다. 이 균주를 이용하여 basal salts에 sodium glutamate, bactotryptone, glucose 및 yeast extract를 첨가시킨 배지에서 alkaline phosphatase 생산을 검토하였다. 그 결과 sodium glutamate가 alkaline phosphatase 유도에 효과적인 것으로 판명되었다. Alkaline phosphatase 생산을 위한 최적유도용 배지는 basal salts에 0.3% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone, 0.5% glucose를 첨가한 것으로 효소활성은 기본배지보다 약 6배, 표준배지 보다는 약 27.5배 증가하였다. *T. caldophilus* GK24 alkaline phosphatase는 유도효소로 판명되었다. 무기인산 결핍시에 효소가 생산되며, 생육배지에 무기인산을 첨가하면 효소합성에 저해효과가 있었다(1995년 1월 1일 접수, 1995년 1월 1일 수리).

서 론

Alkaline phosphatase는 최적반응 pH가 알칼리성이고, 대부분의 일 인산 에스테르 결합을 가수분해하여 인산 모노에스테르를 생산하는 상당히 특이성이 넓은 아연 효소이며,¹⁻⁴⁾ 고등 동물로부터 세균에 이르기까지 광범위하게 존재하고 있다. Alkaline phosphatase 중에서 효소정제 및 생화학적 연구가 가장 잘 된 것은 송아지 내장에서 분리한 calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)와 대장균 유래의 bacterial alkaline phosphatase(BAP)이다. 이들 효소들은 분자생물학 및 유전공학 실험에 필수적인 효소로 산업적인 가치가 높다.

송아지 유래의 CIP는 분자량 약 50,000 Da의 subunit를 가진 이량체 효소로서 활성형은 Zn^{2+} 를 포함하는 당단백질 금속효소이다. 이 효소는 거의 모든 인산 모노에스테르를 분해하지만, 이 인산 에스테르 및 삼 인산 에스테르 결합은 전혀 분해하지 못한다. 또 최적 pH는 기질농도가 높을때 10부근이지만, 기질농도가 낮을 때는 pH 8.0까지 낮아진다.^{4,5)} 대장균 유래의 BAP는 *E. coli* C75, *E. coli* A19 및 *E. coli* JM83 등에서 많이 연구되었다.^{1,3,6)} 특히 대장균 alkaline phosphatase의 특징은 periplasmic enzyme으로, 전구체로 합성되어 periplasmic space까지 이동 후 signal peptidase에 의해 signal peptide가 절단된 후 활성형 효소로 되며 분자량은 47,029 Da로 보고되었다.^{7,8)} 또 *E. coli* JM83의 alkaline phosphatase 유전자가 최근에 cloning되어 아미노산 일차구조가 완전히 밝혀졌다.⁹⁾ 본 연구에서는 열에 안정하고 산업적으로 유용한 내열성 alkaline phosphatase를 분리하기 위해, 생육온도가 72~75°C인 *Thermus*속 10여 균주를 대상으로 조사하였다.¹⁰⁻¹²⁾ 그 결과 다른 균주들보다 al-

kaline phosphatase 활성이 비교적 높은 *Thermus caldophilus* GK24를 선택하였다. 본 실험에서는 *Thermus caldophilus* GK24로부터 내열성 alkaline phosphatase의 최적 유도조건과 최적생산에 대하여 연구 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

Thermus caldophilus GK24는 Taguchi, H. 등에 의해 일본 Tochigi-ken에 있는 Kawamata 온천에서 분리한 gram 음성세균으로 최적 생육온도가 70~75°C이다.¹²⁾ 이 균주를 5 ml의 전배양용 배지¹⁰⁾(0.4% bactotryptone, 0.2% yeast extract, 1X basal salts, pH 7.6)에 접종하여 72°C에서, 180 rpm으로 21시간 진탕 배양한 후, 500 ml용의 등근 플라스크에 담긴 100 ml의 alkaline phosphatase 유도용 배지에 각각 1% 씩 접종하였다. 배양액을 72°C에서, 180 rpm으로 진탕 배양하면서 시간별로 균체 생육과 효소 활성을 측정하였다.

1X basal salts의 조성은 nitrilotriacetic acid 0.1 g, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.06 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, NaCl 0.008 g, KNO_3 0.103 g, $NaNO_3$ 0.689 g, $FeCl_3$ solution(0.03%) 1 ml, Nitsch's trace element 용액 1 ml, 20 mM Tris/HCl(pH 8.0)이다.

Nitsch's trace elements의 조성은 H_2SO_4 0.5 ml, $MnSO_4$ 2.2 g, $ZnSO_4$ 0.5 g, H_3BO_3 0.5 g, $CuSO_4$ 0.016 g, Na_2MoO_4 0.025 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.046 g/l이다.

Alkaline phosphatase의 최적 유도용 배지탐색은 1X basal salts에 sodium glutamate, bactotryptone, yeast extract 및 glucose를 각각 첨가하여 효소활성과 균체 증가량을 조사하여 제조하였다.

찾는말 : *Thermus caldophilus* GK24, 내열성 alkaline phosphatase

*연락처

기본배지(basal medium) 조성은 1X basal salts, 0.2% sodium glutamate 이고, 표준배지(standard medium) 조성은 1X basal salts, 0.2% sodium glutamate, 0.2% bacto-tryptone이다.

내열성 alkaline phosphatase의 활성 측정

Alkaline phosphatase의 활성은 Onish 등¹³⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 기질용액은 10 mM Tris/HCl (pH 7.6) 완충용액에 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP), 1 mM MgCl₂를 첨가하여 만들었다. 반응액은 50 mM Tris/HCl(pH 8.6) 완충용액 800 ml에 10 mM *p*NPP 기질용액 100 μl와 시료액을 혼합하여 72°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 옮겨 2N NaOH 200 μl로 반응을 중지시키고 실온에서 원심분리하였다. 효소활성의 측정은 분광계의 extinction coefficient 1.77×10⁴/Mcm를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹³⁾ 효소활성 1 unit(U)은 72°C에서 1분당 1 nmole *p*-nitrophenol을 유리시키는 효소량으로 정의했다.

시료액의 제조는 다음과 같다. 배양액 500 μl를 취하여 원심분리한 후, cell pellet을 50 mM Tris/HCl(pH 8.6) 500 μl로 현탁하였다. 현탁액에 toluene과 acetone의 2:1 혼합액 500 μl를 첨가하여 5분간 agitation하였다. 하층액 100 μl를 조효소액으로 취하여 효소반응에 이용하였다.

균체량은 배양액 1 ml를 취한 후 분광계를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정한 값을 균체량으로 간주하였다.

조효소액의 제조

전기영동을 하기 위해서 cold osmotic shock 방법^{14,15)}으로 alkaline phosphatase를 추출하였다. 먼저 배양액의 균체농도를 일정하게 조정하여 10 ml씩 취하여 원심분리한 후, 균체를 회수하였다. 균체에 냉각시킨 10 mM Tris/HCl(pH 8.0) 2 ml로 수회 washing한 후, 20% sucrose/50 mM Tris/HCl(pH 8.0) 1 ml에 현탁하였다. 여기에 lysozyme 0.1 mg과 0.5M EDTA(pH 8.0) 4 μl를 첨가하여 잘 섞은 후, 실온에서 10~15분간 방치, 가끔 흔들어 주면서 spheroplast를 형성시켰다. 얼음내에서 1M MgSO₄ 10 μl를 첨가하여 5분간 방치한 후, 저온 원심분리하여 상층을 회수하였다. 침전물에 다시 1 ml의 냉각수를 첨가하여 20분간 얼음속에서 흔들어 주면서 alkaline phosphatase를 추출하였다. 이렇게 추출된 조효소액을 전기영동에 사용하였다.

비변성 겔 전기영동 및 activity 염색

추출된 조효소액을 이용하여 비변성 겔 전기영동¹⁶⁾을 하였다. Polyacrylamide gel은 7% separating gel, 5% stacking gel을 사용하였고, 10°C에서 70V로 12시간 전기영동하였다. 전기영동에 사용한 완충용액의 조성은 Trizma base 3 g, Glycine 14.4g/l (pH 8.8)이다.

Activity staining¹⁷⁾(활성염색)은 사용용도에 따라 2가지 기질(*α*-naphthyl acid phosphate와 *p*-nitrophenyl phosphate)을 사용하였다. 먼저 활성 band를 확인하기 위해 시료를 비변성 겔 전기영동한 후, polyacrylamide gel을 0.5M Tris/HCl(pH 8.8), 10 mM *α*-naphthyl acid phosphate, 1 mM MgCl₂, 0.25 M Fast Blue BB Salt 기질용액과 함께 72°C shaking incubator에서 10분간 반응시켜 발색시킨 후 7% methanol, 7% acetic acid 용액으로 고정하였다.

Coomassie Brilliant Blue 염색은 전기영동한 polyacrylamide gel을 Coomassie Brilliant Blue R-250 1 g, methanol 450 ml, acetic acid 100 ml/1l 용액으로 염색하고, 7% methanol, 7% acetic acid 용액으로 탈색하였다.

결과 및 고찰

Alkaline phosphatase 유도를 위한 배지 탐색

T. caldophilus GK24로부터 내열성 alkaline phosphatase의 최적생산을 위해 1X basal salts(재료 및 방법 참조)에 각기 다른 질소원을 첨가하여 alkaline phosphatase의 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

질소원으로는 yeast extract, bacto-tryptone 및 sodium glutamate를 선택하였다. Fig. 1은 1X basal salts에 질소원을 0.2% 농도로 각각 첨가하여 alkaline phosphatase 활성을 관찰한 것이다. 0.2% yeast extract 첨가시의 균체량은 0.2% bacto-tryptone 및 0.2% sodium glutamate 첨가시 보다 약 2배 이상 증가되었다는 것을 알 수 있다. 그러나, alkaline phosphatase 활성은 sodium glutamate 첨가(90U/ml)가 yeast extract 첨가(13U/ml) 보다는 약 7배, bacto-tryptone 첨가(4U/ml) 보다는 약 23배 높게 나타났다.

위의 실험과 별도로 1X basal salts에 yeast extract를 0.1~0.5% 농도로, 또 동일한 방법으로 bacto-tryptone을

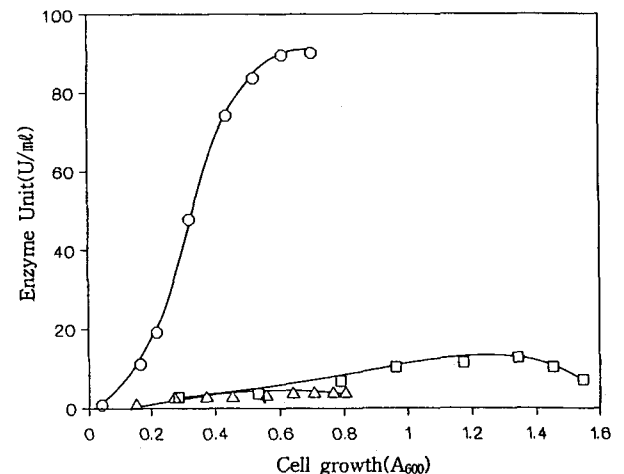


Fig. 1. Growth and activity of alkaline phosphatase by *T. caldophilus* GK24 at pH 8.0 at 72°C. The organism was inoculated into basal salts containing various nitrogen sources. Enzyme assay conditions: *p*NPP, 72°C, pH 8.6. Symbols; ○-○, 0.2% sodium glutamate; △-△, 0.2% bacto-tryptone; □-□, 0.2% yeast extract

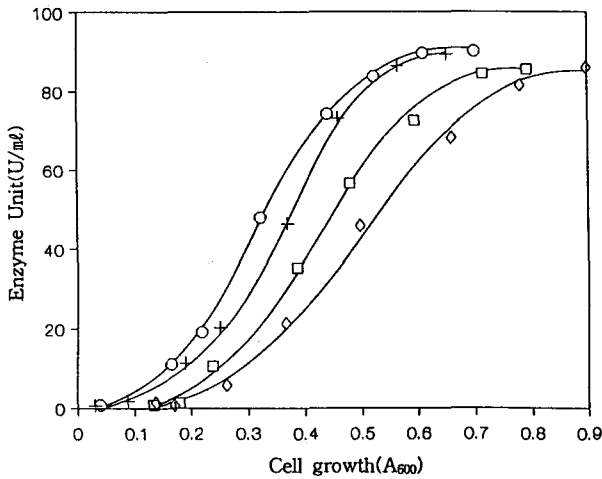


Fig. 2. Effect of sodium glutamate concentration on the induction of *T. caldophilus* GK24 alkaline phosphatase. The organism was inoculated into basal salts containing various sodium glutamate concentration. Enzyme assay conditions: *p*NPP, 72°C, pH 8.6. Symbols: ○-○, 0.2% sodium glutamate; +-+, 0.3% sodium glutamate; □-□, 0.4% sodium glutamate; ◇-◇, 0.5% sodium glutamate.

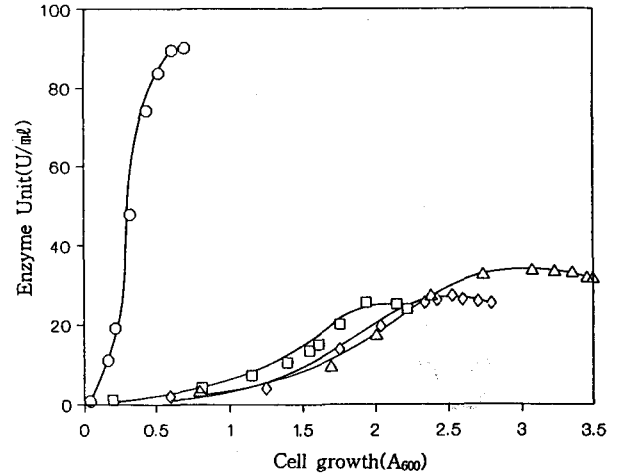


Fig. 3. Growth and activity of alkaline phosphatase of *T. caldophilus* GK24 at pH 8.0 at 72°C. The organism was inoculated into basal medium (1X basal salts, 0.2% sodium glutamate) containing various bactotryptone concentration. Enzyme assay conditions: *p*NPP, 72°C, pH 8.6. Symbols: ○-○, basal medium (control); □-□, 0.1% bactotryptone; ◇-◇, 0.3% bactotryptone; △-△, 0.5% bactotryptone.

다양하게 첨가시킨 배지를 각각 만들어서 균체를 접종한 후 배양시간에 따른 alkaline phosphatase의 활성을 조사해 보았다(data 생략). 이 실험에서 bactotryptone과 yeast extract 첨가시에는 첨가농도의 증가에 비례하여 효소활성이 약간 높아지지만, 균체 증식율에 비해 효소활성이 상당히 낮았다. 예로서 0.2%와 0.5% yeast extract가 첨가된 배지에서 각각 16시간 배양시켰을 때 균체 증식율은 0.5%를 첨가한 배지에서 약 4배정도 높지만, 효소활성은 약간 증가하여 약 2배 정도에 그치고 있다.

Bactotryptone의 경우도 유사한 현상을 보였다. 따라서 yeast extract 및 bactotryptone의 농도를 증가시키면 균체 증식 효과는 있으나, alkaline phosphatase의 유도효과는 거의 없다고 생각된다.

또 1Xbasal salts에 탄소원인 glucose만을 첨가한 결과 질소원의 부족, 유기산의 생성 등으로 균체생육이 부진하였고 또 효소활성도 거의 없었다(data 생략).

Sodium glutamate 첨가의 경우, yeast extract와 bactotryptone에 비교하여 alkaline phosphatase 유도 효과가 있다는 것을 Fig. 1에서 알 수 있다. 이러한 원인은 yeast extract와 bactotryptone에 소량의 인산이 함유되어 유도를 저해하는 것으로 판단된다. 왜냐하면 yeast extract와 bactotryptone에는 인산이 각각 0.29%와 0.75% 함유한 것으로 보고되어 있다(Difco Manual 참조). 따라서 효소 유도에 따른 sodium glutamate의 최적농도를 조사하였다.

Basal salts에 sodium glutamate를 0.2~0.5% 농도로 다양하게 첨가시킨 배지를 각각 만들어서 균체를 접종한 후 배양시간에 따른 alkaline phosphatase의 활성을 조사한 것이 Fig. 2이다. 0.2~0.3% sodium glutamate의 농도에서 효소활성이 약 90U/ml로 유사하게 높은 값을

보인다. 그러나, 0.4% 이상의 경우, 효소활성은 비슷하지만, 균체량이 증가와 더불어 효소 유도 시간이 길어지기 때문에 상대적으로 비활성은 낮아진다. 이러한 현상은 효소 유도에 대한 최적 질소함량과도 관계가 있을 것으로 생각된다.

Alkaline phosphatase의 보다 효율적인 생산을 위해서는 균체 증식량에 비례하여 효소 생산량도 증가되어야만 한다. 따라서 1X basal salts에 우선 0.2% sodium glutamate를 첨가시킨 배지를 기본배지(basal medium)로 하고 여기에 탄소원 및 질소원을 보충하여 alkaline phosphatase의 생산량을 증가시키는 방향으로 연구하였다.

기본배지(basal medium)에 yeast extract, bactotryptone 및 glucose의 첨가 효과

기본배지 (1X basal salts, 0.2% sodium glutamate)에 glucose를 0.1~0.5%까지 다른 농도로 첨가시킨 후, *T. caldophilus* GK24를 배양하면서 효소활성과 균체 증식량을 조사한 결과 glucose를 첨가함으로써 균체 생육이 저해되었으며 alkaline phosphatase의 활성도 기본배지보다 현저히 떨어졌다(data 생략). 이것은 탄소원과 질소원의 균형이 맞지 않아서 생긴 현상이라고 생각된다.

마찬가지 방법으로 기본배지에 bactotryptone을 각각 0.1%, 0.3%, 및 0.5%로 첨가한 후 *T. caldophilus* GK24를 배양하면서 2시간 간격으로 균체량과 내열성 alkaline phosphatase의 활성을 조사한 것이 Fig. 3이다. 0.5% bactotryptone의 첨가에 의해 균체 성장률이 상당히 증가하였으나, 내열성 alkaline phosphatase의 활성은 첨가하지 않은 기본배지보다 2.8배 정도 감소하였다. 또 yeast extract 첨가시에도 유사한 현상을 보였다(data 생략).

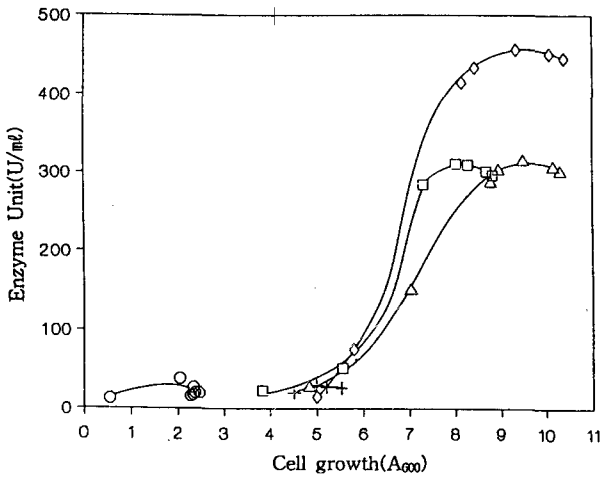


Fig. 4. Growth and production of alkaline phosphatase of *T. caldophilus* GK24 at pH 8.0 at 72°C. The organism was inoculated into standard medium (1X basal salts, 0.2% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone) containing various glucose concentration. Enzyme assay conditions: pNPP, 72°C, pH 8.6. Symbols: ○-○, standard medium (control); +-+, 0.2% glucose; □-□, 0.4% glucose; ◇-◇, 0.5% glucose; △-△, 0.6% glucose.

효소생산을 위한 최적배지의 선정

기본배지에 bactotryptone과 glucose를 동시에 첨가시켜 적정농도를 잘 유지시키므로써 균체증식 및 alkaline phosphatase의 효과적인 생산을 검토해 보았다. Fig. 3에서 기본배지에 bactotryptone의 첨가 결과는 효소활성의 증가보다 오히려 균체증식에 영향을 미치는 것 같다. 또 Fig. 1에서도 yeast extract는 균체수율은 증가시키지만 효소 유도효과는 오히려 떨어진다는 것을 알 수 있다. 또 glucose를 첨가한 기본배지에서는 균체증식보다는 생육저해를 일으킨다. 이러한 glucose에 의한 생육저해는 bactotryptone 또는 yeast extract를 함께 첨가함으로써 방지할 수 있다(data 생략). 따라서 균체의 효과적인 증식을 위해 기본배지에 0.2% bactotryptone을 첨가시킨 배지를 표준배지(standard medium)로 삼고 여기에 탄소원인 glucose를 첨가하여 효소 유도효과를 조사하여 보았다. 즉, 표준배지(1X basal salts, 0.2% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone)에 탄소원인 glucose를 각각 0.2%, 0.4%, 0.5% 및 0.6%로 첨가한 배지에서 균체증식 및 alkaline phosphatase의 활성을 조사한 것이 Fig. 4이다.

효소활성은 glucose 첨가 농도에 따라 크게 차이를 보였다. 0.2% glucose 첨가는 효소활성에 거의 영향을 주지않고 균체 증식 효과만 보였다. 0.3% glucose 첨가 시에는 효소활성 및 균체증식 효과가 보였다(data 생략). 또 0.4% glucose 첨가시에 효소활성은 상당히 증가하였다. 특히, 0.5% glucose 첨가의 경우 표준배지에서의 효소활성(약 20U/ml)보다 약 22.5배 정도(450 U/ml) 높게 나타났다. Glucose의 농도를 0.6% 이상 첨가시에는 균체량은 증가하지만 효소활성은 오히려 상당히 떨어진 것으로 나타났다.

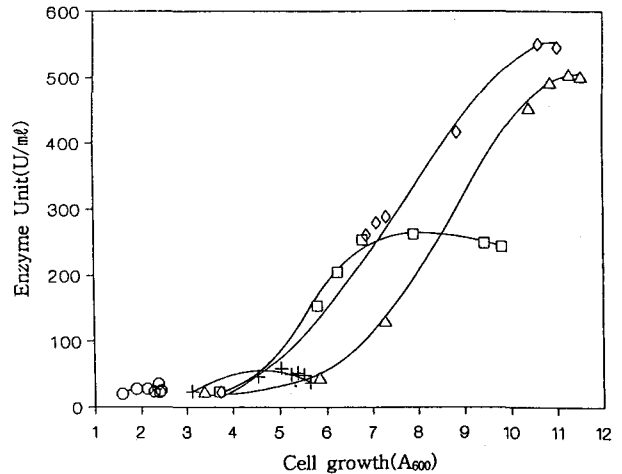


Fig. 5. Growth and production of alkaline phosphatase of *T. caldophilus* GK24 at pH 8.0 at 72°C. The organism was inoculated into modified standard medium (1X basal salts, 0.3% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone) containing various glucose concentration. Enzyme assay conditions: pNPP, 72°C, pH 8.6. Symbols: ○-○, modified standard medium (control); +-+, 0.2% glucose; □-□, 0.4% glucose; ◇-◇, 0.5% glucose; △-△, 0.6% glucose.

한편, 효소유도 및 균체증식에 sodium glutamate와 glucose의 농도가 복합적으로 관여한다고 생각되어 표준배지 조성중 0.2% sodium glutamate를 0.3% sodium glutamate로 조정하여 제조하였다. 여기에 탄소원인 glucose를 다양한 농도로 첨가하여 균체증식 및 alkaline phosphatase의 활성을 조사한 것이 Fig. 5이다. 대체로 glucose 농도를 증가시키면 균체량도 증가하는 것으로 나타났다. 효소 유도효과는 0.2% glucose 이하에서는 거의 없었다. 또 0.5~0.6% glucose 농도에서는 효소활성이 비슷하게 높은 것으로 나타났다. 균체량에 비해 효소활성이 가장 높게 나타난 0.5% glucose 첨가의 경우 표준배지의 약 27.5배 정도(550 U/ml)로 증가하였고, 기본배지의 효소활성(약 90 U/ml, Fig. 3 참조)보다 약 6배 정도 증가하였다.

따라서, *T. caldophilus* GK24로부터 내열성 alkaline phosphatase의 생산을 위한 최적유도배지(optimal induction medium)를 1X basal salts, 0.3% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone, 0.5% glucose 및 20 mM Tris/HCl(pH 8.0)로 결정하였다. 이 배지를 이용하여 균체 1%를 접종한 후 72°C에서 15~16시간 배양함으로써 alkaline phosphatase를 최대량으로 생산할 수 있다.

무기인산의 첨가 효과

내열성 alkaline phosphatase의 생산을 위한 최적유도배지(0.3% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone, 0.5% glucose, 1X basal salts) 400ml에 1%로 *T. caldophilus* GK 24를 접종하여 72°C에서 10시간 배양한 후, 50 ml씩 나누어 다른 배양용기에 배양액을 옮겼다. 이 분취된 배양액에 무기인산으로 potassium phosphate를 각기 다른 농도별로 첨가하여 계속 배양하면서 배양액을 시간별로

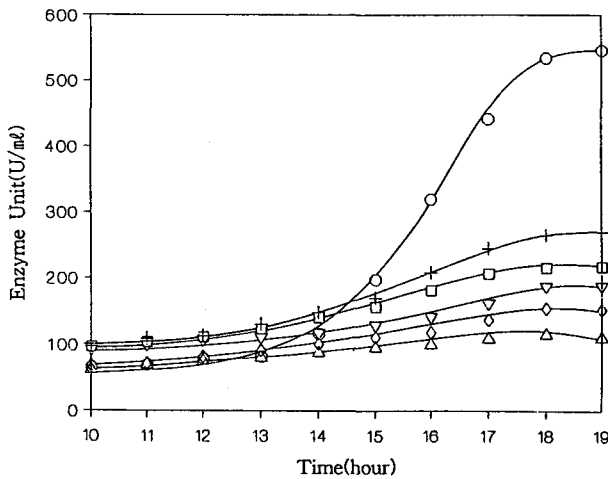


Fig. 6. Effect of potassium phosphate concentration on the inhibition of *T. caldophilus* GK24 alkaline phosphatase. The organism was inoculated into optimal induction medium (1X basal salts, 0.3% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone, 0.5% glucose) containing various potassium phosphate concentration. Enzyme assay conditions: *p*NPP, 72°C, pH 8.6. Symbols: ○-○, No addition of potassium phosphate(control); +-+, 1 mM potassium phosphate; □-□, 2 mM potassium phosphate; ▽-▽, 3 mM potassium phosphate; ◇-◇, 4 mM potassium phosphate; △-△, 5 mM potassium phosphate.

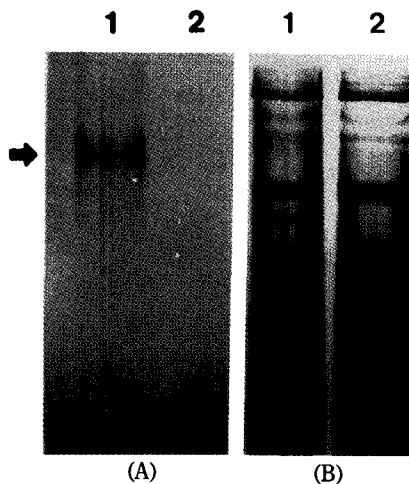


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis of crude extract of *T. caldophilus* GK24. The organism was inoculated into optimal induction medium containing 10mM potassium phosphate. A samples of crude extract were subjected to electrophoresis under non-denaturing conditions. Gel A was stained for alkaline phosphatase activity and the parallel gel B with Coomassie Brilliant Blue G250. The closed arrow indicates *Tca* alkaline phosphatase. Lane 1, optimal induction medium(control); Lane 2, optimal induction medium containing 10 mM potassium phosphate.

취하여 내열성 alkaline phosphatase의 활성을 조사한 것이 Fig. 6이다. 무기인산을 첨가하지 않은 control 배지에 비해 potassium phosphate를 첨가한 배지에서 alkaline phosphatase의 활성이 더 이상 증가하지 않았다. 또한, Fig. 7은 내열성 alkaline phosphatase의 생산을

위한 최적유도배지(A)와, 이 배지에 10 mM potassium phosphate를 첨가시킨 배지(B)에서 *T. caldophilus* GK24를 생육시킨 후 균체를 회수하여 조효소액을 추출하여 비변성 겔 전기영동 및 활성 염색 방법으로 alkaline phosphatase의 유도효과를 조사한 것이다. 여기에서 무기인산이 첨가된 배지에서 생육시킨 균체유래의 시료에서는 효소활성을 검출할 수 없었다(Fig. 7). 따라서 *T. caldophilus* GK24의 내열성 alkaline phosphatase는 대장균의 alkaline phosphatase¹⁸⁾와 마찬가지로 무기인산이 배지중에 없을 때에만 유도되는 효소라는 것을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 '94 핵심전문연구 지원과제(과제번호: 941-0500-036-2)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Coleman, J. E. and Gettins, P. (1983) Molecular properties and mechanism of alkaline phosphatase. in 'Metal Ion in Biology', Spiro, T., Ed., Vol. 5, Chap. 5, pp. 153-217, John Wiley and Sons, Inc., New York.
2. Reid, T. W. and Wilson, I. B. (1971) *E. coli* alkaline phosphatase. in 'The Enzymes', Boyer, P. D., Ed., Vol. 4, pp. 373-416, Academic Press, New York.
3. Takanami, M. (1967) Analysis of the 5'-terminal nucleotide sequences of ribonucleic acids. *J. Mol. Biol.* **23**, 135-148.
4. Fernley, H. N. (1971) Mammalian alkaline phosphatase. in 'The Enzymes', vol.4, 417-447.
5. Morton, R. K. (1955) The substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatase of cow's milk and calf intestinal mucosa. *Bioch.* **61**, 232-240.
6. Vieira, J. and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**, 259-268.
7. Inouye, H. and Beckwith, J. (1977) Synthesis and processing of an *Escherichia coli* alkaline phosphatase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 1440-1444.
8. Bradshaw, R. A. (1981) Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3473-3477.
9. Shuttleworth, H., Taylor, J. and Minton, N. (1986) Sequence of the gene for alkaline phosphatase from *Escherichia coli* JM83. *Nucleic Acids Res.* **14**, 8689.
10. Brock, T. D. (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n. a non-sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**, 289-297.
11. Brock, T. D. (1986) in 'Thermophiles', Brock, T. D., ed., pp. 27-28, John Wiley & Sons, Inc., New York
12. Taguchi, H., Yanashita, M., Matsuzawa, H. & Ohta, T. (1982) Heat stable and fructose 1,6-bisphosphate activated L-lactate

- dehydrogenase from an extremely thermophilic bacterium. *J. Biochem. (Tokyo)* **91**, 1343-1348.
13. Onishi, H. R., Tkacz, J. S. and Lampen, J. O. (1979) Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **254**, 11943-11952.
 14. Abrams, A., McNamara, P. and Johnson, F. B. (1960) Adenosine triphosphatase in isolated bacterial cell membrane. *J. Biol. Chem.* **235**, 3659-3662.
 15. Neu, H. C. and Heppel, L. A. (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**, 3685-3692.
 16. Davis, B. J. (1964) Disk electrophoresis II-method and application to human serum proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
 17. Gabriel, O. (1971) Locating enzymes on gels. *Meth. Enzymol.* **22**, 578-604.
 18. Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. (1987) Structure and function of the regulatory genes for the phosphate regulon in *Escherichia coli*. in 'Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms', Torriani-Gorini, A., Rothman, F. G., Silver, S., Wright, A. and Yagil, E., Ed., pp. 20-25, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Optimal Production of Thermostable Alkaline Phosphatase from *Thermus caldophilus* GK24

Youjin Kim, Myungsook Chun, Hyunkyu Kim and Suk-Tae Kwon* (Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea)

Abstract: *Thermus caldophilus* GK24 was selected as sources of thermostable alkaline phosphatase from a survey of extreme thermophile. *T. caldophilus* GK24 was tested for production of alkaline phosphatase by addition of various concentration of sodium glutamate, bactotryptone, glucose and yeast extract to basal salts. Sodium glutamate was found to be effective for the alkaline phosphatase induction. The optimal induction medium for production of alkaline phosphatase involves the addition of 0.3% sodium glutamate, 0.2% bactotryptone and 0.5% glucose to basal salts. The activity of the enzyme in optimal induction medium increased nearly 6-fold/ml than basal medium and 27.5-fold/ml than standard medium. *T. caldophilus* GK24 alkaline phosphatase was found to be inducible. When starved of inorganic phosphate, *T. caldophilus* GK24 produces the enzyme alkaline phosphatase. The addition of inorganic phosphate to growth medium had a repressive effect on enzyme synthesis.

*Corresponding author