

Phosphatase 의 활성이 *E. coli* P90C의 β -galactosidase 생성에 미치는 영향

최 동 원 · 심 창 환
경민전문대학 식품영양과

Effect of Phosphatase Activity on Product of β -galactosidase by *E. coli* P90C

Dong-Won Choi, Chang-Hwan Shim

Department of Food and Nutrition,
Kyung-Min Junior College, Uijeongbo 480-103, Korea

Abstract

ATPase was the most available phosphatase in culture broth of *E. coli* P90C. To measure the stable phosphatase activity it was necessary to react with reaction reagent over 30 min and then we can get stable optical density at 410 nm. Transfer time from preculture to main culture for the production of β -galactosidase was good after 3 hrs cultivation. Phosphatase activity was highest at log phase in main culture and as the cell begins to make β -galactosidase phosphatase activity begins to decrease

Key words : phosphatase, β -galactosidase, transfer time

서 론

미생물의 배양에는 여러가지 요인들이 검토되어야 한다. 온도, pH, 통기, 교반, 영양원, 금속이온효과등의 배양조건들이 그것이다. 이들 중 영양원 특히 아주 낮은 농도로 미생물의 생육에 영향을 주는 성분중의 하나가 무기인이다. ¹⁾ 무기인의 영향을 관찰하기 위해서는 여러가지 생물 세포내에서 수행되는 인산화합물의 기능 및 이들의 동태를 추적하는 것이 중요하다. 특히 무기폴리인산 (inorganic polyphosphoric acid, PPA)은 미생물의 세포내에서 일어나는 인산화 반응에 매우 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀져 있다. ²⁾ 근래에는 PPA의 합성 및 분해에 관련된 효소의 정제 및 활성도 측정에 관한 연구가 보고되어있다. 본보에서는 이미 확립된 phosphatase 활성측정 방법을 이용하여 재조합된 *E. coli* P90C로부터 β -galactosidase 생산시 배양상태를 확인하는 하나의 parameter

로 삼고자 하였으며 phosphatase의 활성과 β -galactosidase 생산균주들의 배양조건과의 관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

1) Control
chromosomal DNA의 lacZ gene을 제거시킨 *E. coli* P90C를 숙주로 사용하고, λ Q(amber mutation 된 Q gene과 temperature sensitive한 c1857 을 함유)와 λ gt11(lacZ를 포함)을 재조합시킨 λ HLL1을 벡터로 사용하였으며 본 균주는 연세대학교 식품생물공학과 대학원생 정형일군에게서 분양받았다.

2) Revertant
복귀변이주

3) S. S. 균주

Soil screen을 통해 동정한 β -galactosidase의 활성이 있는 균주

2. 배 지

본 실험에 사용한 배지는 bactotrypton 1g, yeast extract 0.5g, NaCl 1g, glucose 6g에 증류수를 첨가하여 100ml로 하였다.

3. 시 약

1) ACPase 반응액

0.1M acetate-buffer(pH 4.5)에 p-NPP (para-Nitrophenylphosphate) 5mM, MgCl₂ 10mM, KCl 10mM 되도록 첨가한 용액

2) ATPase 반응액

0.1M tris-buffer(pH 7.0)에 ACPase 반응액과 같은 시약첨가

3) ALPase 반응액

0.1M tris-buffer(pH 9.0)에 ACPase 반응액과 같은 시약첨가

4) TCA 용액

Trichloroacetic acid

4. 전배양

배양한 agar plate로부터 1백금이를 25ml 배지가 든 100ml 삼각플라스크에 접종후 30°C 에서 배양하였다. 적당한 시기에 배양액중 3ml를 취하여 100ml 배지가 든 500ml 삼각플라스크에 접종하였다.

5. 본배양

접종한 500ml 삼각플라스크를 30°C 진탕배양기에서 배양하였다. 진탕배양기의 교반속도는 250rpm 이었다.

6. 균체량 측정

균주 배양액 4.5ml를 15000rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 침전된 cell에 1ml 증류수를 첨가한 현탁액의 흡광도를 600nm에서 측정된 값과 건조균체량과의 사이에 검량곡선을 구한후 흡광도에 의해 균체량을 구하였다.

7. β -galactosidase 활성측정

원심분리한 균체를 pH 7.8, 0.1M Tris-buffer 1ml로 현탁시킨 후 초음파를 이용하여 균체를 모두 파괴하고 4°C에서 5000g 15min 의 조건으로 세포찌꺼기를 제거하였다. 상등액 40 μ l와 기질 ONPG(O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside, 4mg/ml water) 0.4ml를 첨가하여 28°C에서 10분간 반응시켰으며 1M Na₂CO₃ 1ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 증류수 2ml를 첨가한후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 미리구한 표준곡선으로부터 β -galactosidase활성을 구하였다. β -galactosidase 1unit는 28°C에서 ONPG 1 nano mole을 가수분해 시킬 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.⁹⁾

8. phosphatase 활성측정

배양액을 원심분리 (2500g \times 30 min, 6°C)후 여과한 여액을 증류수로 5배 희석한다. 희석액 0.5ml를 20ml volumetric flask에 넣고 조건별로 반응액 40ml를 첨가한다. 이 때 blank test는 각 반응액에서 P-NPP를 뺀 용액 4ml를 첨가한 것으로 한다.

혼합액을 30°C에서 30분간 흔들어준후 10% TCA 용액을 0.5ml 첨가하고 10분간 방치후 1N-NaOH 2.5ml를 첨가하고 다시 원심분리 (2500g \times 30min)후 상등액을 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 phosphatase의 활성은 OD_{sample}에서 OD_{blank}를 뺀 값으로 정하였다.

결과 및 고찰

1. pH가 배양액중 phosphatase의 활성에 미치는 영향

배양액의 phosphatase중에서 pH 4.5 에서 높은 활성을 나타내는 것을 ACPase, pH 7.0, pH 9.0에서 높은 활성을 나타내는 것을 각각 ATPase, ALPase로 구분하고^{8, 10)}, 각 pH별로 phosphatase의 활성을

Table 1. Effect of reaction pH on the activity of phosphatase in broth

	ACPase (pH 4.5)	ATPase (pH 7.0)	ALPase (pH 9.0)
OD _{Sample}	0.389	0.404	0.257
OD _{Blank}	0.102	0.130	0.124
phosphatase activity (OD _{Sample} - OD _{Blank})	0.287	0.274	0.133

Table 2. Effect of reaction time on ATPase activity

reaction time	10 min	20 min	30 min
OD _{Sample}	0.154	0.189	0.191
OD _{Blank}	0.082	0.084	0.085
ATPase activity (OD _{Sample} - OD _{Blank})	0.072	0.105	0.106

측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. *E. coli* P90C의 배양액(이하 배양액)중에서는 ALPase의 활성이 다른 두가지 phosphatase에 비해 상대적으로 낮은 것으로 나타났다.

E. coli 배양중 pH는 7.0~7.5 사이가 유지되므로 배양액중 phosphatase의 활성은 ATPase의 활성으로 대표할 수 있다.

2. 반응시간에 따른 ATPase의 활성변화

배양액중 ATPase 활성을 검토하기 위해 배양액을 여과한 후 여액을 취해서 30°C에서 10분, 20분, 30분간 반응액과 반응시키면서 ATPase의 활성변화를 측정하였다. (Table 2) 반응시간 20분까지는 ATPase의 활성이 계속 증가하는 경향을 보였으며 30분간 반응시킨경우 20분간 반응시킨 것과 거의 같은 ATPase 활성을 나타내었다. 따라서 배양액중 ATPase의 활성을 측정하기 위해서는 30°C에서 30분간 반응시키는 것이 적당할 것으로 생각된다.

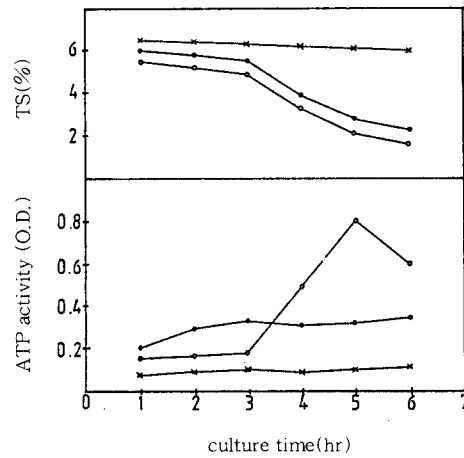


Fig. 1. Change of ATPase activity and TS concentration during preculture.

-○- : S.S., -●- : revertant, -×- : control

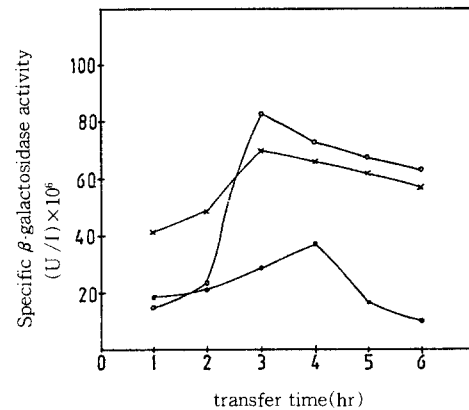


Fig. 2. Effect of transfer time on β -galactosidase production in broth after 16hr culture.

-○- : S.S., -●- : revertant, -×- : control

3. 전배양중 ATPase 활성이 본배양시 β -galactosidase 활성에 미치는 영향

각 균주별로 (control, revertant, S. S.) 전배양에서의 ATPase 활성과 TS(total sugar) 농도변화와 관계를 Fig. 1에 나타내었다. TS의 소비속도는 곧 미생물의 대사속도와 연관이 있으므로 TS의 소비속

도가 클수록 미생물의 활성이 큰 것으로 판단하였다. ATPase의 활성은 control과 revertant의 경우 6시간까지 큰 변화를 보이지 않은 반면 S. S. 의 경우 3시간에서 5시간까지 ATPase의 활성이 증가하다가 6시간까지는 감소하는 경향을 보였다. TS소비의 경우는 ATPase와는 달리 revertant와 S. S. 의 경우 28시간 이후 거의 같은 속도로 소비하는 반면 control의 경우 TS의 소비가 없었다.

전배양 시간별로 균을 선택하여 본배양한 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다.

S. S. 균과 control의 경우 3시간에 transfer한 경우에 가장 생성량이 높았으며 revertant의 경우 3시간에 transfer한 경우와 4시간에 transfer한 경우에 별 차이 없었다. 따라서 이들 균주에 있어서 본배양으로 transfer하는 시기는 3시간 가량 전배양 시킨 때가 가장 좋았으며 이 때가 ATPase의 활성이 급격히 증가하는 시기였다. (Fig. 1)

4. 본배양중 ATPase 활성의 변화

본배양중 ATPase의 활성은 4시간에 최대값을 보이고 β -galactosidase 생성이 시작됨과 동시에 급격한 감소를 보였으며 8시간부터 안정된 값을 나타내었

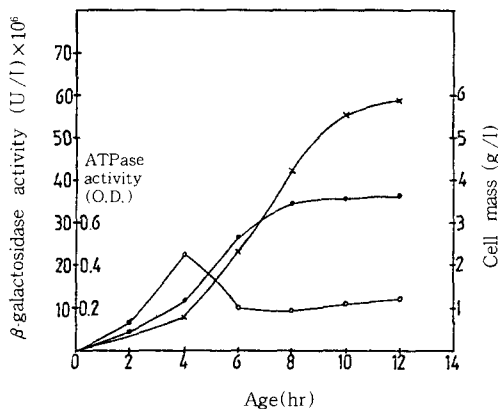


Fig. 3. Change of ATPase activity during β -galactosidase product by *E. coli* P90C.

- : phosphatase activity
- : cell mass
- ×- : β -galactosidase activity

다. (Fig. 3)

이는 β -galactosidase가 생성되기 시작할 때까지 균체의 증식이 급격히 이루어지면서 ATPase의 활성도 급격히 증가한 것으로 생각되며 β -galactosidase 생성이 시작된 이후부터 균체량의 증가가 둔화되면서 ATPase의 활성이 떨어지는 것으로 생각된다.

요 약

E. coli P90C 배양액중의 phosphatase는 ATPase로 대표될 수 있고 phosphatase 활성을 측정하기 위해서는 반응액과 30분이상 반응시켜야 안정된 발색도를 나타내었다. β -galactosidase의 생산을 위해 전배양에서 본배양으로 접종하는 시기는 phosphatase의 활성이 급증하기 직전(3hr)이 가장 좋았으며, 본배양에서 phosphatase 활성은 대수증식기에서 최고였으며, β -galactosidase가 생성되기 시작하면 phosphatase의 활성이 떨어지기 시작하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Hostalek Z., Blulmauerova M. and Vanek Z.,. *In Economic Microbiology*, vol. 3, 293, 1979
2. Kulaev, I. S., *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, John Wiley and Sons Ltd, New York, chapt. 4, 1979
3. Grillo, J. F. and J. Gibson, Regulation of phosphate accumulation in the unicellulon *Cyanobacterium cynechococcus*, *J. of Bacteriol*, 140, 508, 1979
4. Nahas, E., Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase and alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*, *J. of Gen. Microbiol.*, 128, 2017, 1982
5. Nesmeyanova, M. A., A. D. Dmitriev, A. D. vobik and I. S. Kulaev, Joint Brochemical Symposium UDSSR-DDR, Reinhardsbrunn, Academic-VErlah, Berlin, 82, 1973
6. Toda, K., *Mathematical model of cell growth*

- and phosphatase biosynthesis in *Saccharomyces carlsbergensis* on the phosphate limitation, *Biotech. and Bioeng.*, **21**, 487, 1979
7. Varma, A. K., A new inorganic pyrophosphate utilizing bacterium from a stagnant lake, *Can. J. of microbiol.*, **29**, 1470, 1983
 8. Weinberg, R., Repression of the acid phosphatase of *Saccharomyces bisporus* in relation to the poly-phosphate content of the cells, *Can. J. of Microbiol.*, **22**, 867, 1976
 9. 정형일, Q mutation Bacteriophage vector를 이용한 재조합 유전자의 증폭특성연구, 연세대학교 석사학위논문, 1995년 예정
 10. Ernst, S. A., Transport ATPase cytochemistry: ULTRASTRUCTURAL localization of potassium dependent and potassium independent phosphatase activities in rat kidney cortex, *J. of Cell Biol.*, **66**, 586, 1975
-

(1994년 12월 15일 수리)