

해수에서 분리한 *Vibrio* sp. M-96 균주의 열감수성 alkaline phosphatase 성질

박문경 · 진덕희 · 김중균 · 공인수 · 김광현* · 홍용기†

부경대학교 생물공학과

* 동의대학교 미생물학과

Properties of a Thermolabile Alkaline Phosphatase from the Marine Bacterium *Vibrio* sp. M-96

Moon-Kyung Park, Deuk-Hee Jin, Joong-Kyun Kim, In-Soo Kong, Kwang-Hyeon Kim*, Yong-Ki Hong

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

A thermolabile alkaline phosphatase has been purified through steps of osmotic shock, ammonium sulfate salting-out, and DEAE-cellulose chromatography from the cultured broth of the marine *Vibrio* sp. M-96 strain. The optimal temperature for the enzyme activity was 35°C. The optimal pH was pH 11.0, and the range of pH stability was pH 10.4 to 12.0. Thermal inactivation occurred within 6 minutes at 60°C. The enzyme was considerably inactivated by 0.1mM concentrations of Hg^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} , whereas activated up to 234% by 1mM of Mn^{2+} . The activation energy and deactivation energy by the Arrhenius equation were 4.02 Kcal/mol and 9.09 Kcal/mol, respectively. The K_m and V_{max} values of the enzyme for p-nitrophenylphosphate were found to be 0.0465mM and 0.001335mM/min, respectively. Active form of the enzyme had a molecular weight of 57,000 dalton determined by the Sephadex G-200 gel filtration method.

Key words : Alkaline phosphatase, thermolabile enzyme, thermostability, *Vibrio*.

서 론

해양세균들은 일반적으로 생육온도가 20°C 전후인 저온성이며, 운동성이 매우 큰 Gram 음성균들이다. 이들 해양세균들로부터 세포외 가수분해효소 즉 protease¹⁻³⁾, al-

ginase⁴⁾, nuclease⁵⁾, cellulase⁶⁾ 그리고 alkaline phosphatase⁷⁻⁸⁾와 같은 효소들의 생산이 알려져 있으며, Gram 음성균의 경우 이들 효소들은 일반적으로 세포 외피인 periplasmic space에 존재하며⁹⁻¹⁰⁾ spheroplast 형성시에 세포외부로 유출되어 나온다¹¹⁻¹³⁾. 이들 효소중 alkaline pho-

† Corresponding author

sphatase는 척추동물에서 세균에 이르기까지 폭넓게 존재하는 인산 ester결합 가수분해효소¹⁴⁾로서 자연계에서 phosphorus cycle과 세포내의 인산공급에 반드시 필요한 필수적인 유도효소로 세포내 무기인산의 결핍시에 생합성되어 진다¹⁵⁻¹⁶⁾. 대장균으로 부터의 alkaline phosphatase에 대해서는 이미 그 효소적 성질, 생산성, 유전적 조절현상등의 많은 것들이 알려져 있으며¹⁷⁻²⁰⁾, 해양세균에 대해서는 marine *Pseudomonas* B-16의 alkaline phosphatase 활성화와 안정성¹⁵⁾, marine *Pseudomonas* sp.가 생산하는 alkaline phosphatase의 균성장에 따른 효소의 생산과 정제, 효소의 성질등²¹⁾이 알려져 있다. Alkaline phosphatase는 최근 유전공학기술의 급속한 발전으로 말미암아 DNA의 5'말단의 인산기를 제거하여 self-ligation을 방지하는 수법과 DNA 혹은 RNA의 5'말단의 ³²P 방사선 동위원소를 사용한 표식수법등에 많이 이용되어지고 있다²²⁾. 현재 이와같은 목적으로 대장균 유래의 bacterial alkaline phosphatase(BAP)와 calf intestinal alkaline phosphatase(CIAP)가 주로 많이 사용되고 있다. 이 중에서 CIAP는 70°C에서 쉽게 실활되는데 반하여 BAP는 내열성이 매우 강하기 때문에 효소 반응 후에 phenol처리등을 여러번 반복하여 제거시키고 나서 다음 실험단계로 이행하고 있다. 따라서 간단한 열처리로 실활시키면서 실험단계를 간소화할수있는 장점을 가지는 미생물 기원의 열에 약한 alkaline phosphatase의 개발이 이루어지면 보다 더 값싸게 대량생산할 수 있을 것이다. 그러므로 본 실험에서는 저온성 해양세균으로 부터 열감수성 alkaline phosphatase를 생산하는 균주를 선별하여 이 균이 생산하는 효소를 정제한 후, 그 효소적 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

균주의 분리는 단계별로 회석된 해수를 시료액으로 하여 아래와 같은 조성의 고체배지에 도말하여 30°C에서 3일간 배양한 후 생긴 colony들을 각각 2개의 multidish에 옮겨 2일간 액체배양한 다음 70°C에서 10분간 열처리하고 대조구는 열처리없이 효소활성을 조사하여 열실활이 가장 심한 alkaline phosphatase를 생성하는 균주를 선별하였다. 본 실험의 배지조성은 Bacto peptone 5.0g, Yeast extract 1.0g, Tris 1.2g, sea water 1L, pH 7.8이었다. 분리균주의 동정을 위한 검정검색은 motility, Gram test, catalase생산,

Table 1. Effect of metal salts on the alkaline phosphatase activity*

Metals	1mM	0.1mM
None	100	100
Al(NO ₃) ₂	75	123
BaCl ₂	68	119
CaCl ₂	53	98
CdCl ₂	35	57
CoCl ₂	148	112
HgCl ₂	2	16
KCl	73	100
MgCl ₂	95	110
MnCl ₂	234	114
NaCl	87	90
Ni(CH ₃ COO) ₂	36	20
Pb(NO ₃) ₂	80	87
ZnCl ₂	32	35

*Activity is expressed relatively to the control incubated in the absence of any metal salts.

Kovac test, Indole test, G+C % 함량등의 시험을 통하여 행하였다.

효소의 활성측정 및 단백질의 정량

효소의 활성측정은 2가지 방법을 병용하였다. 정제과정의 확인에는 시판하는 alkaline phosphatase 측정용 kit(아산 제약)를 사용하여 0.1 ml의 효소용액 혹은 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.1이 되는 균체 현탁액 0.1 ml에 4.3 mM의 페닐인산을 함유한 30 mM sodium carbonate 완충용액(pH 9.4)을 0.5 ml 첨가하여 37°C에서 20분간 효소반응을 시킨후 가수분해된 phenol을 sodium periodate-boric acid-NaOH 정색시약 0.5 ml를 넣어 상온에서 10분간 발색시킨 다음 생성된 키논을 500 nm에서 흡광 측정하였다. 정제효소의 성질조사에는 p-nitrophenyl phosphate 가수분해 방법을 사용하였다. 효소용액 0.025 ml에 10 mM p-nitrophenyl phosphate 0.2 ml와 0.1 M glycine-NaCl-NaOH 완충용액(pH 10.5) 0.1 ml를 넣어 최종 부피가 0.5 ml 되도록 하여 37°C에서 20분간 효소 작용을 시킨 뒤 1 M NaOH용액 0.5 ml로 반응을 정지시켜 생성된 p-nitrophenol을 410 nm에서 흡광측정하였다. 이

때의 효소 1 unit는 1분당 1 μmol 의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 규정하였다. 단백질의 정량은 Folin법²⁶⁾으로 측정하였으며, 정제과정중의 단백질 정량은 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

효소의 정제

배양액 3 L를 원심분리하여 균체를 모아 1 M NaCl을 함유하는 같은 양의 1 mM glycine 완충용액(pH 10.5)으로 현탁, 원심분리하여 배지성분을 충분히 제거한다. 모아진 균체를 1 M NaCl과 1 M sucrose가 함유된 200 ml의 1 mM glycine 완충용액으로 다시 현탁, 원심분리하여 얻어진 균체에 증류수(4°C) 30 ml를 가하여 cold osmotic shock 처리를 한 다음 원심분리하여 상등액을 모아 80%의 포화 농도가 되도록 황산암모늄을 첨가한다. 10시간 후에 원심분리하고 얻어진 침전물을 1 mM glycine 완충액으로 현탁하여 4°C에서 24시간동안 같은 완충용액으로 수차례 갈아주면서 투석시킨다. 다음 DEAE-cellulose column(1.9×10cm)을 이용하여 0.05 M, 0.15 M, 0.8 M의 NaCl을 함유하는 1 mM glycine 완충용액으로 stepwise 용출을 행하였다(30ml/hr).

결과 및 고찰

균의 동정

선정된 해양세균 M-96균주는 Gram 음성의 간균으로 운동성을 나타내었으며, polar flagellate 및 fermentation 성질을 나타내므로 *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. 혹은 *Photobacterium* sp.에 해당될 것으로 예측되나, oxidase 양성 및 luminescence 음성을 나타내므로 *Photobacterium*속은 아닌 것으로 생각된다. 그리고 *Vibrio*속은 G+C % 함량이 40-50% 범위이고 *Aeromonas*속은 57-63% 범위이므로 M-96 분리 균주의 G+C % 함량이 43%인 것으로 보아 해양 *Vibrio*속에 해당되는 것으로 추정된다²³⁻²⁵⁾.

효소정제

분리균으로 부터의 alkaline phosphatase는 세포막과 세포벽 사이의 periplasmic space에 위치하므로 삼투압을 이용한 osmotic shock 방법으로 추출해낼 수 있다. Osmotic shock 용액으로서의 antarctic bacteria²⁷⁾의 경우 50 mM의 Tris-HCl(pH 8.0)에 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂가 함유된 용액을 사용하였고, Heppel¹²⁾은 0.5 mM MgCl₂ 용

액을 사용하였다. 해양세균 M-96의 균체를 1 M NaCl과 1 M sucrose 용액으로 처리하여 osmotic shock 용액의 종류별로 행한 실험에 있어서는 저농도의 완충액이나 금속이온들이 함유된 용액에서보다 증류수를 사용하였을 때 16-133배 이상으로 용출력이 우수하였다. Osmotic shock으로 추출해낸 효소용액에 40-90% 포화의 황산암모늄으로 10시간정도 염석한 후, 원심분리하여 침전된 효소를 1 mM glycine 완충용액에 현탁, 투석하여 단백질과 효소활성을 측정하고 specific activity를 구하여 본 결과 60%-80% 사이의 포화농도에서 가장 높았다. 이의 효소액을 DEAE-cellulose column에서 NaCl로 stepwise 용출하였을 때 효소단백질은 0.15 M NaCl에서 가장 많이 용출되었다.

효소활성에 대한 온도 및 pH의 영향

효소활성의 최적온도는 Fig. 1(A)와 같이 35°C에서 최고치를 나타내었으며, 20°C에서는 최고치의 60%, 39°C에서는 68% 정도로 감소하였다. 이러한 효소반응의 최적온도는 marine *Pseudomonas* sp.⁷⁾의 alkaline phosphatase 경우 30°C, Antarctic bacteria²⁷⁾의 경우는 25°C인데 비하여 분리균 *Vibrio* M-96이 생산하는 효소는 일반 실험실에서 많이 사용하는 35°C전후의 온도범위에서 최적조건을 가지므로 그 이용면에서 미생물 기원의 열감수성 antarctic bacteria 효소보다 좋은 조건을 갖고 있다. 분리균 M-96이 생산하는 효소의 반응 최적 pH를 조사하기 위하여 0.1M의

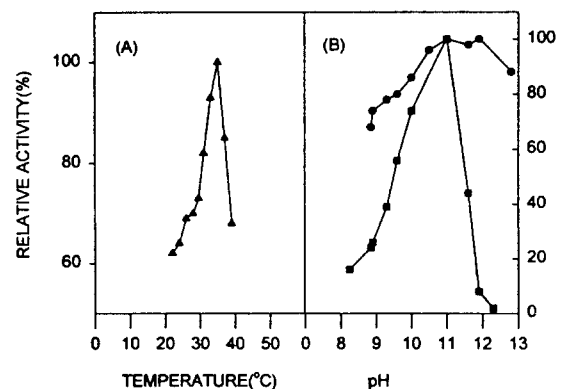


Fig 1. Activity of the alkaline phosphatase.

- (A) Effect of temperature on the optimal activity
 (B) Effect of pH on the optimal activity(■) and the stability(●)

glycine-NaCl-NaOH 완충용액을 pH 8.4-12.8 범위에서 반응시켰을 때, Fig. 1(B)와 같이 효소반응의 최적 pH는 11.0이었다. 또 1 mM의 각 완충용액 pH에서 24시간동안 4°C에 방치한 후, 잔존효소활성을 측정된 결과, pH의 안정 범위는 Fig. 1(B)와 같이 pH 10.4-12.0이었다. 이러한 pH는 기질농도, 이온력, 완충용액 종류등과 함께 효소의 활성에 많은 영향을 준다²⁹⁾. Alkaline phosphatase는 일반적으로 pH가 높은 알카리에서 최적작용을 나타내나 곤충에서 생산되는 효소는 최적 pH가 8.0 정도인 것도 있다³⁰⁾. *E. coli*¹⁶⁾, *Bacillus subtilis*³¹⁾, antarctic bacteria²⁷⁾의 alkaline phosphatase의 최적 pH는 각각 9.3, 10.5, 9.5이고, marine *Pseudomonas* sp.⁷⁾의 alkaline phosphatase는 본 효소와 같이 최적 pH가 11.0이며, pH 안정범위가 10.4-12.0으로 높은 알카리성 효소이었다. 효소의 내열성을 조사하기 위하여 0-80°C의 온도에서 10분간 열처리시킨후 급냉시켜 효소의 잔존활성도를 측정된 결과, Fig. 2(A)와 같이 열처리하지 않은 것에 비하여 20°C에서는 90%, 30°C에서는 70%, 50°C에서는 10% 정도의 잔존활성을 나타내었으며 60°C 이상에서는 완전히 실활하였다. 효소의 활성에 급속한 영향을 주는 온도인 50°C, 60°C, 70°C에서 시간별로 열처리한 결과는 Fig. 2(B)와 같이, 50°C에서는 2분간의 가열로 50%, 10분간의 가열로 10%의 잔존활성을 나타내었으며, 60°C에서는 6분간의 가열로, 그리고 70°C에서는 2분간의 가열로 완전히 실활하였다. 열처리로 인한

효소활성의 저해는 CIAP의 경우 68°C에서 15분만에 실활될수 있으나 열처리 시에 반드시 SDS를 필요로 하며²⁸⁾, *E. coli*^{18,20)}, marine *Pseudomonas*⁷⁾ 및 antarctic bacteria^{26,27)}의 경우 각각 95°C에서 8분, 75°C에서 10분, 그리고 55°C에서 10분동안의 가열로 실활하였다. 따라서 본 효소는 60°C에서 6분이면 완전히 실활시킬수 있으므로 DNA의 complementary strand 사이의 hydrogen bond dissociation에도 거의 영향을 미치지 않는 온도범위내에서 효소만을 선택적으로 제거할수 있는 장점을 가진다.

금속염의 영향

일반적으로 해수중의 주요 금속이온 중에서 Mg²⁺는 해양세균의 alkaline phosphatase의 활성과 안정성을 위하여 필요하며^{15,21)}, *E. coli*의 경우에서도 Mg²⁺가 필요하다고 보고되어 있다^{18,19)}. 그러나 Morton³²⁾ 및 Okubo등³³⁾은 Zn²⁺이, Echetebe³⁴⁾ 및 Houk and Hardy³⁰⁾, Coleman and Geltings¹³⁾등은 Cu²⁺가 그 활성을 저해한다고 보고하고 있다. 본 실험의 효소활성에 대한 금속이온은 각종 금속염을 최종농도가 1 mM 및 0.1 mM되게 효소 반응용액에 첨가하여 그 효소활성도를 측정하였을때 표 1과 같이 1 mM의 농도에서는 Mn²⁺ 경우에서만 234% 정도로 크게 활성이 증가하였고, 그외에는 0.1 mM의 농도에서 Ni²⁺, Zn²⁺ 등에 의하여 잔존활성이 20-35% 정도로 저해받았으며, Hg²⁺에 의해서는 잔존활성이 16% 정도로 가장 저해정도가 컸다.

활성화 energy 및 Km값

Alkaline phosphatase의 기질 p-nitrophenylphosphate에 대한 활성화 energy는 Fig. 3과 같이 Arrhenius 식에 따라 activation energy가 4.02 Kcal/mol, deactivation energy는 9.09 Kcal/mol, Tmax는 308 °K로 나타났다. Km값은 Fig. 4에 나타난 바와 같이 기질 p-nitrophenylphosphate에 대하여 0.0465 mM, Vmax는 0.001335 mM/min이었다. 이러한 결과는 marine *Pseudomonas*^{15,21)}의 Km값 0.061 mM 및 0.041 mM과 유사한 기질친화력을 지녔다.

분자량의 측정

Vibrio sp. M-96균주가 생산하는 alkaline phosphatase의 분자량을 Sephadex G-200에 의한 gel filtration법³⁵⁾으로 측정된 결과, 분자량 70,000인 bovine serum albumin과 분자량 45,000인 ovalbumin 사이의 분자량인 약

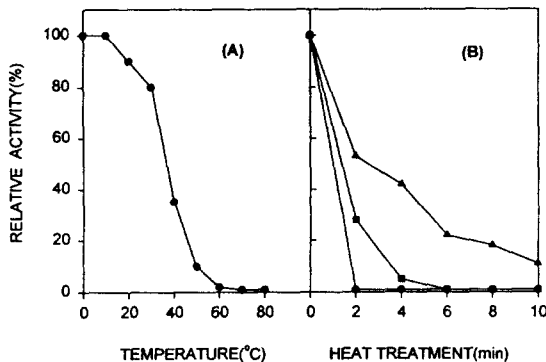


Fig 2. Heat stability of the alkaline phosphatase.
(A) Remaining enzyme activity after 10 min at each temperature
(B) Heat inactivation within 10 min at 50°C(▲), 60°C(■) and 70°C(●)

57,000 dalton 정도로 추정되었다. 이것은 marine *Pseudomonas* sp.⁷⁾의 100,000 dalton, *E. coli*²⁶⁾의 94,000 dalton, antarctic bacteria²⁷⁾의 68,000 dalton에 비하여 다소 작은 분자량을 가졌다.

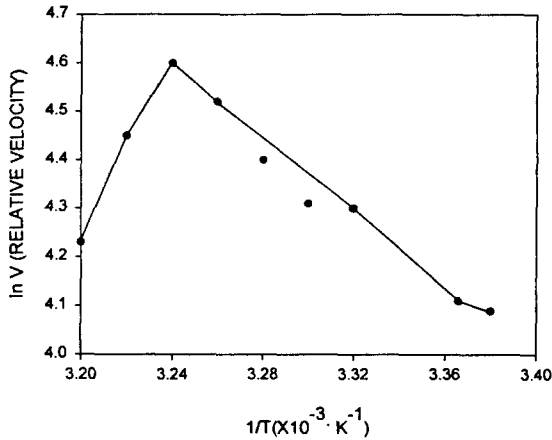


Fig. 3. Activation energy and deactivation energy of the alkaline phosphatase.

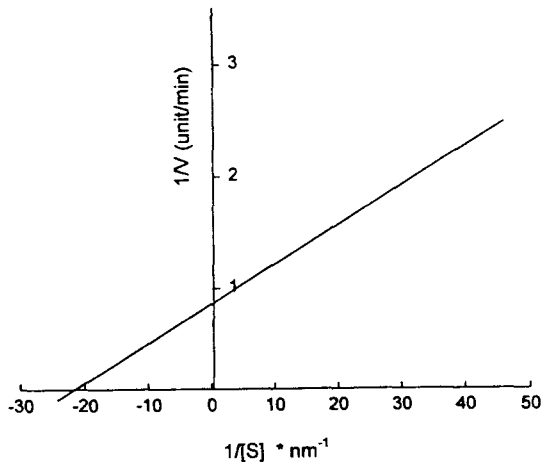


Fig. 4. Effect of the p-nitrophenyl phosphate concentrations on the reaction rate of the alkaline phosphatase.

요 약

해수에서 분리한 인산ester결합 가수분해효소인 열감수성 alkaline phosphatase를 생산하는 *Vibrio* sp. M-96 균주

로부터 osmotic shock에 의하여 효소를 추출하고 60% - 80% 포화의 황산암모늄 염석, DEAE-cellulose chromatography로 정제한후 그 효소적 성질을 조사하였다. 효소활성의 최적온도는 35°C였으며, 60°C에서 6분간의 열처리로 완전히 실활되었다. 효소활성의 최적 pH는 11.0이었고 안정범위는 pH 10.4 - 12.0이었다. 효소의 활성화에 대한 금속이온의 영향에서는 0.1 mM의 Hg²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺에 의해서 저해를 받았으나, 1 mM의 Mn²⁺에 의해서는 234% 정도로 크게 활성이 증가하였다. 효소의 activation energy는 4.02 Kcal/mol이며, deactivation energy는 9.09 Kcal/mol, Tmax는 308 °K이었다. 효소의 Km치는 p-nitrophenyl-phosphate에 대하여 0.0465 mM이었으며, Vmax는 0.001335 mM/min이었다. 또한 Sephadex G-200 column chromatography를 이용하여 gel filtration법으로 측정한 효소의 분자량은 57,000 dalton이었다.

감사의 글

본 논문은 농림수산부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 일부로서 수행되었으며, 진덕희는 한국학술진흥재단 박사후 연수지원금에 의하여 지원되었다.

참 고 문 헌

1. Prescott, J. M. and Wikes, S. H : *Aeromonas* aminopeptidase ; Purification and some general properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 328(1966).
2. Litchfield, C. D. and Prescott, J. M : Regulation of proteolytic enzyme production by *Aeromonas proteolytica*. I. Extracellular endopeptidase. *Can. J. Microbiol.*, 16, 17(1970).
3. Litchfield, C. D. and Prescott, J. M : Regulation of proteolytic enzyme production by *Aeromonas proteolytica*. II. Extracellular aminopeptidase. *Can. J. Microbiol.*, 16, 23(1970).
4. Ando, Y. and Inoue, K. : Decomposition of alginic acid by microorganisms. V. On the alginase of *Vibrio* sp. SO-20 strain. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 27, 342 (1961).
5. Maeda, M. and Taga, N. : Extracellular nuclease produced by a marine bacterium ; II. Purification and properties of extracellular nuclease from a marine *Vibrio* sp., *Can. J. Microbiol.*, 22, 1433(1976).
6. Kadota, H. : *Cellulose-decomposing bacteria in the sea*, pp. 332 - 340, Ray, D. L, Marine boring and fouling

- organisms, University of Washington Press, Seattle (1959).
7. Kobori, H. and Taga, N. : Extracellular alkaline phosphatase from marine bacteria ; Purification and properties of extra-cellular phosphatase from a marine *Pseudomonas* sp., *Can. J. Microbiol.*, **26**, 833 (1980).
 8. Fedosov, Y. V., Mikhailov, V. V., Zhigalina, I. I., and Ivanova, Y. P. : High activity alkaline phosphatase from marine bacterium, *Loklady Akademii Nauk SSSR*, **320**, 485(1991).
 9. Heppel, L. A. : *The concept of periplasmic enzymes*, pp. 223-247, Rotheffeld, L. I., The structure and function of biological membranes, Academic Press, New York(1971)
 10. Wynne, D. : The role of phosphatases in metabolism of *Peridinium cinctum*, *Hydrobiologia*, **83**, 93(1981).
 11. Costerton, J. W., Inoue, J. M., and Cheng, K. J. : Structure and function of the cell envelope of Gram-negative bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **38**, 87(1974).
 12. Heppel, L. A. : Selective release of enzyme from bacteria, *Science*, **156**, 1451(1967).
 13. Coleman, J. E. and Geltings, P. : Alkaline phosphatase, structure and mechanism, *Adv. Enzymol.*, **55**, 381(1983).
 14. Carpena, E. and Wynne, D. : Properties of an alkaline phosphatase from the Dinoflagellate *Peridinium cinctum*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **83**, 163(1985).
 15. Thompson, L. M. M. and MacLeod, R. A. : Factors affecting the activity and stability of alkaline phosphatase in a marine *Pseudomonas*, *J. Bacteriol.*, **117**, 813(1974).
 16. Torriani, A. : Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *E. coli*, *Biochem. Biophys. Acta.*, **38**, 460(1960).
 17. Brockman, R. W. and Heppel, L. A. : On the localization of alkaline phosphatase and cyclic phosphodiesterase in *E. coli*, *Biochem.*, **7**, 2554(1968).
 18. Garen, A. and Levinthal : A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli* ; I. Purification and characterization of alkaline phosphatase, *Biochem. Biophys. Acta.*, **38**, 470(1960).
 19. Malamy, M. H. and Horecker, B. L. : Release of alkaline phosphatase from cells of *E. coli* upon lysozyme spheroplast formation, *Biochem.*, **3**, 1880(1964).
 20. Urban, R. G., Dreyfus, L. A., and Whipp, S. C. : Construction of a bifunctional *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin, *Infection and Immunity*, **58**, 3645(1990).
 21. Hassan, H. M. : Diminution of outer membrane permeability by Mg^{2+} in a marine *Pseudomonas*, *J. Bacteriol.*, **125**, 910(1976).
 22. Wright, A. C., Miceli, G. A., Landry, W. L., Christy, J. B., Watkins, W. D., and Morris, J. G. Jr. : Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 541 (1993).
 23. Sieburth, J. M. : *Sea microbes*, pp. 256-270, Oxford University Press, New York(1979).
 24. Holt, H. G. : *The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., pp. 126-132, The Williams & Wilkins Company, Baltimore(1977).
 25. Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., and Schlegel, H. C. *The prokaryotes*, Vol.II, pp. 1272-1331, Springer-Verlag, New York(1981).
 26. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
 27. Kobori, H., Sullivan, C. W., and Shizuya, H. : Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria ; Rapid 5' end-labeling of nucleic acids, *Biochem.*, **81**, 6691(1984).
 28. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, H. *Molecular cloning*, pp.133-134, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1982).
 29. Fernley, H. N. *Mammalian alkaline phosphatase*, Vol. 4, pp. 417-447, Boyer, D., The Enzymes, Academic Press, New York(1971).
 30. Houk, E. J. and Hardy, J. L. : Alkaline phosphatases of the mosquito, *Culex tarsalis*, Coquilett, *Comp. Biochem. Physiol.*, **78**, 303(1984).
 31. Takeda, K. and Tsugita, A. : Phosphatases of *Bacillus subtilis* ; II. Crystallization and properties of alkaline phosphatases, *J. Biochem.*, **61**, 232(1967).
 32. Morton, R. K. : Some properties of alkaline phosphatases of cow's milk and calf intestinal mucosa, *J. Biochem.*, **60**, 573(1955).
 33. Okubo, A., Langerman, N., and Kaplan, M. M. : Rat liver alkaline phosphatase, purification and properties, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7174(1974).
 34. Echetebe, C. O. : Alkaline phosphatase from *Basilolous haptosporosus* comparison with alkaline phosphatase from rainbow lizard and man, *Comp. Biochem. Physiol.*, **70**, 359(1981).
 35. Andrews, P. : Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel-filtration, *J. Biochem.*, **91**, 222(1964).
 36. Bradshaw, R. A., Cancedda, F., Ericsson, H., Neumann, P. A., Piccoli, S. P., Schlesinger, M. J., Shrieffer, K., and Walsh, K. A. : Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 3473(1981).