

Bacillus subtilis W700에서의 Staphylokinase 대량생산을 위한 배지 최적화 및 배양방법의 비교

박인석·*김병기
서울대학교 공과대학 응용화학부 및 유전공학연구소
(접수 : 2001. 8. 10., 게재승인 : 2001. 8. 23.)

Media Optimization and Comparison of Fermentation Type for Overproduction of Staphylokinase in *Bacillus subtilis* WB700

In-Suk Park and Byung-Gee Kim*

School of Chemical Engineering and Institute of Molecular Biology & Genetics, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea

(Received : 2001. 8. 10., Accepted : 2001. 8. 23.)

To produce staphylokinase (SAK) in *B. subtilis* WB700, media optimization was carried out and the operation of batch and fed-batch fermentation were compared. Tryptone is a good nitrogen source and its optimum concentration in modified super rich(MSR) media is 15 g/L. When glucose is used as a limiting carbon source in the MSR media, 5 g/L of an optimum glucose concentration was identified for the SAK production under the control of P43 promoter. As the expression of P43 promoter is controlled by the limitation of oxygen, the SAK production was controlled at the 30% DO level in the fed-batch fermentation. Unexpectedly, batch fermentation using MSR media showed 1.5 times higher yield of SAK than that of the fed-batch fermentation. The main cause of the results comes from not achieving higher cell concentration in the fed-batch fermentation and the optimum expression level of P43 promoter under oxygen or nutrient limitations. We could not achieve the increase in cell concentration by any means in batch culture as well as fed-batch culture. The highest yield in the batch culture was 2880 units of SAK activity and 455 mg/L of secreted SAK.

Key Words : *Bacillus subtilis*, fed-batch fermentation, staphylokinase(SAK)

서론

심장 혹은 뇌 등으로 공급되는 혈액은 비정상적인 혈전생성으로 인하여 그의 흐름이 제한되면 뇌졸중, 협심증 등의 직접적인 원인이 되며 이를 제거하는 목적으로 혈전용해제를 투여하는 방법이 널리 사용되고 있다. 이러한 혈전 용해제의 작용은 plasminogen을 plasmin으로 활성화시키고, 생긴 plasmin이 혈전을 용해시킴으로써 혈액의 원만한 흐름을 유지시켜 주는 것이다. 이러한 혈전용해제 중 가장 많이 사용되고있는 것이 urokinase, streptokinase, tissue plasminogen activator (tPA) 이나 각 제품의 활성 메카니즘이 다른 것이 잘 알려져 있다(1). 이들과는 약간 다른 기작으로 작용하는 혈전용해제

로서, fibrin에 특이적이며 streptokinase보다 활성이 높은 제품으로서 연구되고있는 물질이 *Staphylococcus aureus* 유래의 staphylokinase (SAK) 이다(2). 이와 같은 staphylokinase의 효능연구(3-5)를 위한 임상실험 등은 대량의 고순도 staphylokinase 생산을 요구하고있다.

Staphylokinase 유전자는 *Staphylococcus* 유래의 박테리오파아지인 S ϕ C(6)와 42D(7) 그리고 Collen 등(8)에 의하여 lysogenic *Staphylococcus aureus*로부터 cloning 된 이후 여러 연구진들에 의하여 *E. coli*에서 분비생산이 가능하도록 만들어졌다(5,6). 그러나 이 경우는 최고 생산수율이 50 mg/L에 그쳤으며(6), 생산균주가 성장저해를 받는 현상 등이 문제가 되었다(7). 또한 SAK 단백질이 분비되는 과정에서 세포막에 축적되는 현상으로 인하여 더 이상의 SAK가 분비되지 않는 현상들도 관측되었다(6). *E. coli* 시스템을 이용하여 생산된 SAK의 최고 수율은 Schlott 등에 의한 175 mg/L이었다. 이와 같은 문제점을 극복하고자 하는 시도로서 *Bacillus subtilis*을 숙주세포로 이용하고자 하는 시도가 있었다(7,8).

*Corresponding Author : School of Chemical Engineering,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel : +82-2-880-6774, Fax : +82-2-883-6020
E-mail : byungkim@plaza.snu.ac.kr

그러나 이러한 시도 또한 세포 밖으로 분비되는 프로테아제 등에 의한 분해 영향으로 인하여 25-50 mg/L 정도의 수율만이 보고되었다. 본 연구 결과는 이 후에 수행하여 얻어진 유가식 배양에서의 만족할 만한 결과에(9) 대한 예비 실험으로써 시기적으로 발표가 늦은 감이 있으나, 전체 연구에 있어서 중요한 위치를 차지하는 부분이므로 발표를 하게 되었다.

본 연구에서는 7가지의 protease가 제거된 *B. subtilis* WB700를 숙주세포로 이용하여 SAK 발현을 수행하였다. 최적화된 생산시스템을 구축하고자 발효 배지 최적화를 통하여 탄소원과 질소원의 종류 및 농도를 찾고, 이러한 최적 배지 조건을 이용하여 유가식 배양을 수행하여 SAK 생산 극대화를 꾀하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

SAK 발현을 위하여 pSAKP 플라스미드를 함유한 *Bacillus subtilis* WB700 (trpC2 nprE aprE epr bpf Δ mpr::ble Δ nprB::bsr Δ vpr::ery) 균주를 이용하였다(9). pSAKP 플라스미드는 P43 promoter에 의하여 SAK을 발현한다. 진탕배양시 균주내플라스미드의 유지를 위해 kanamycin 항생제는 10 mg/L 농도로 사용하였으며, 이를 seed culture로 사용하여 시행하는 발효 배양 시에는 사용하지 않았다. seed culture를 위한 진탕배양은 250 mL Bellco-flask에서 20 mL 배지를 사용하여 37°C에서 250 rpm으로 배양하였다. 세포농도는 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

배지 조성

B. subtilis 배양시 seed culture는 LB배지 (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L)를 사용하였고, 플라스미드를 가진 균주를 유지할 수 있도록 kanamycin 10 g/L를 사용하였다. 회분식 배양이나 유가식 배양을 위하여는 Media 1 (M1)배지, Super Rich (SR)배지, 그리고 Modified Super Rich (MSR) 배지 등을 사용하였다. M1 배지는 30 g/L glucose(따로 멸균 후 혼합), 20 g/L tryptose, 10 g/L yeast extract, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 5 g/L Casamino acid, 10 g/L NaCl과 salt mixture로서 MgSO₄ 0.3 mM, K₂HPO₄ 1.3 mM, Na₂HPO₄ 79.6 mM, NaH₂PO₄ 38.4 mM이며 pH는 7.5로 조정하였다. SR 배지는 tryptose 25 g/L, yeast extract 20 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, 그리고 glucose의 경우 30 g/L를 첨가하였다. MSR 배지는 tryptose 대신에 tryptone을 동량 사용하였다.

SAK 농도 및 활성 측정

분비된 SAK 농도를 측정하기 위하여 적절한 시간에 시료를 채취한 후 -20°C에서 보관하였다. 배양액의 상등액에 존재하는 총단백질 양의 측정은 Bio-Rad사의 Bradford kit를 사용하였다. SAK 농도는 10 μ L의 시료 상등액을 SDS-PAGE로 분리한 후 Pharmacia사의 UltraScan KL densitometer를 이용하여 gel 상의 band 농도를 측정하였다.

SAK 활성 측정은 2단계법인 plasminogen-coupled chromogenic substrate assay를 사용하였다(4). SAK의 활성은 1 mL의 시료

상등액에서 1분간 변화하는 흡광도 차이(405nm에서 측정)를 1 unit로 정의하였다.

회분식 및 유가식 배양

10 mg/L kanamycin이 포함된 LB 배지 50 mL에 glycerol 50% 배지용액에 보관된 stock culture를 1% v/v로 접종하여 rotary shaking incubator (VS-8482SR, Vision Scientific Co. Ltd.)에서 대수 성장기 후반까지 배양한 후 (O.D. 1.5 - 2.0) 1.5 L의 MSR 배지가 포함된 3.4 L New Brunswick BIOFLO IIc 발효조에 접종하였다. 회분식 배양의 경우는 배양 온도 37°C, pH는 6.8, 그리고 교반속도는 500 rpm으로 맞추었으며, 산소 공급은 3 vvm으로 하였다. 유가식 배양인 경우는 포도당을 제외한 회분식 배지와 동일한 MSR 배지를 이용하여 배양을 시작하고, DO 농도가 30% 이하가 될 때마다 200 g/L의 포도당 용액을 외부에서 첨가하였다. 유가식 배양에 필요한 펌프는 발효조에 부착되어 있는 것을 그대로 사용하였으며, tubing은 Master flex (Cole-Palmer)를 사용하였다. 나머지 조건은 회분식 배양과 동일하게 하였다. 배지내의 포도당 농도는 매 30분마다 Glucose Kit (Sigma)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

질소원 최적화

*B. subtilis*는 예로부터 콩 발효식품에 널리 이용되어온 미생물이다. 따라서 여러종류의 protease를 분비하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에 이용되는 WB700은 7가지의 주요 protease가 제거된 균주이기 때문에 보다 적절한 질소원의 공급이 SAK 고농도 생산에 가장 중요한 역할을 한다. 이러한 질소원에 따른 균주의 성장과 SAK 발현량과의 관계를 좀더 자세히 알아보기 위하여 SR 배지 내의 질소원을 여러가지로 바꾸어 가며 SAK 발현을 관찰하였다. Figure 1 (A)는 질소원으로서 tryptose, tryptone, (NH₄)₂SO₄, 그리고 soy bean을 사용하였을 때의 SAK 발현량을 SDS-PAGE로 분석한 결과인데, tryptone을 질소원으로 사용하였을 때에 다른 질소원에 비하여 현격한 발현 증가를 보임을 알 수 있다. SAK을 대량으로 생산하기 위하여는 가급적이면 저가의 질소원을 사용할 필요가 있기 때문에 soy bean을 질소원으로 사용하였으나, 생산상의 문제가 아닌 분리상의 문제를 야기하기 때문에 질소원 후보로써 적합하지 않음을 알 수 있었다. 이러한 질소원의 최적 농도를 알아보기 위하여 여러 가지 농도의 tryptone을 첨가하여 Figure 1 (B)와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 그림에서 보는 바와 같이 tryptone 농도가 15g/L 이상일 때에는 거의 동일한 양의 SAK이 발현됨을 알 수 있었다. 이러한 현상으로 미루어볼 때 15 g/L의 tryptone을 첨가할 때 최적의 발효배지가 됨을 알 수 있다.

*B. subtilis*에 널리 이용되는 배지의 하나인 SR 배지와 이 배지의 질소원인 tryptose를 tryptone으로 바꾼 MSR 그리고 본 연구실에서 설계한 M1배지, 이렇게 세 종류의 배지를 이용하여 *B. subtilis* WB700[pSAKP]를 배양하였다. Figure 2는 상기한 세 가지 종류의 배지에서 증식하는 SAK 생산 균주의 성장곡선을 나타낸 것이다. M1배지에서 가장 낮은 비성장속

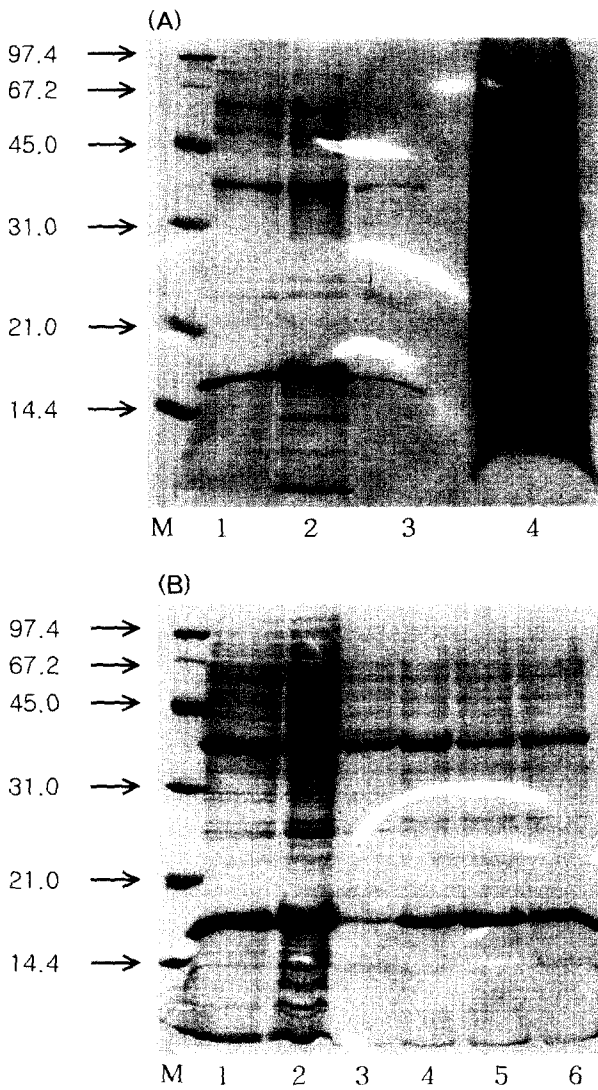


Figure 1. Comparison of various nitrogen sources and concentrations for production of SAK in *B. subtilis* WB700 [pSAK]. (A) Every nitrogen source concentration is 25 g/L. M; Standard marker, 1; tryptose, 2; tryptone, 3; (NH₄)₂SO₄, 4; soy bean. (B) Effect of various concentration of tryptone on the production of SAK. 1; 25 g/L, 2; 15 g/L, 3; 1 g/L, 4; 5 g/L, 5; 10 g/L, 6; 35 g/L

도와 최종세포농도를 보였으며, SR와 MSR 배지는 거의 동일한 비성장속도와 최종세포농도를 보였다. 5 g/L의 tryptose가 (NH₄)₂SO₄로 치환된 M1배지에서의 낮은 비성장 속도는 tryptose가 (NH₄)₂SO₄ 보다는 세포 성장에 좋은 질소원이며, tryptose와 tryptone의 세포 성장 속도에 대한 영향은 그리 크지 않음을 알 수 있다.

포도당 농도 최적화

*B. subtilis*는 내생포자를 생성하는 호기성 그람양성 세균이다. 이러한 특징으로 인하여, 성장환경이 악화될 경우 더 이상 자라지 못하고 동시에 포자를 생성함으로써 더 이상의 대사작용을 극소화하게 되기 때문에 포자 생성과 관련한 단백질 이외는 단백질 생산을 거의 멈추게 된다. 이와 같은 성질 때문에 vegetative growth phase에서 사용되는 프로모터 하에

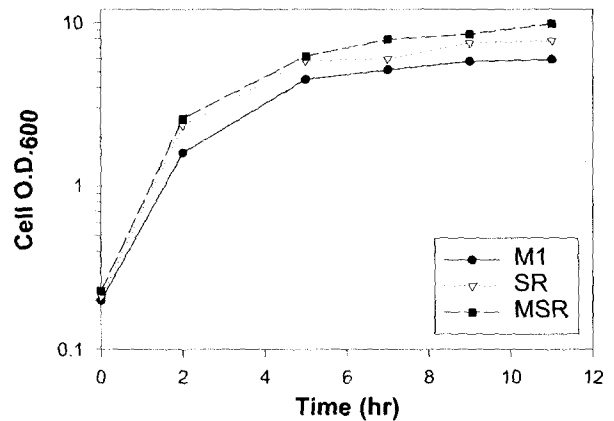


Figure 2. Time course of the cell growth using different media.

클로닝된 외래 단백질인 경우는 포자 형성기에 접어들면서 단백질의 발현이 중단된다. *B. subtilis*는 여러 가지 장점에도 불구하고 많은 외래 단백질을 생산하는데 널리 이용되지 못하는 이유가 바로 이러한 특성 때문이다. 이러한 현상을 극복하려는 여러 가지 시도 중 대표적으로는 포자형성에 관여하는 유전자를 제거하여 포자를 만들지 않는 변이주를 만드는 시도(10), 및 세포분열에 관여하는 격막형성 단백질의 발현을 조절함으로써 포자형성을 억제하려는 시도 (11) 등이 있었다. 그러나 대부분의 경우에는 발효조건을 최적화하여 균주가 포자를 만들지 않는 환경을 만들어 주는 발효배지의 변경 내지는 발효 컨트롤 개발이 전통적인 방법이었다. 이러한 시도는 대개 사용하는 promoter의 발현조건과 맞물려 어느 한가지 상황만을 고려할 경우 최적의 발효 조건을 얻지 못하는 경우가 많다. 특히 포도당 농도는 이러한 현상을 조절하는데 매우 중요한 인자이다. 본 논문에서 SAK 발현에 사용된 P43 promoter는 대수성장기 말기에 존재하는 sigB에 의하여 발현을 조절 받기 때문에(12) 포도당이 배지 내에 충분히 존재할 경우 P43 promoter의 발현능이 저하된다. 그러나 이러한 조건을 맞추기 위하여 포도당 농도를 너무 낮추게 되면 포도당이 고갈되어 원치 않는 상태에서 *B. subtilis*는 포자형성 과정으로 돌입하게 되고, 더 이상 외래단백질을 생산할 수 없는 상황이 되고 만다. 이러한 상황을 고려하여 적절한 포도당공급 조건을 찾는 것은 *B. subtilis*를 이용한 재조합 단백질 고발현에 매우 중요하다. 먼저 플라스크 수준에서의 SAK 발현을 위한 최적 포도당 농도를 알아보았다. Figure 3 (A)는 포도당 농도에 따른 WB700 [pSAK]의 생장곡선을 나타낸 것이다. 포도당 농도가 증가할수록 균주의 성장속도는 어느 정도 감소함을 알 수 있었다. 5 g/L 혹은 10 g/L 일 경우에는 동일한 비성장속도를 보인 반면에 20 g/L 이상에서는 비성장속도 및 최종세포농도가 낮아짐을 알 수 있었다. 이때 각각의 포도당 농도에서의 SAK 발현정도를 SDS-PAGE를 통하여 알아보았다. Figure 3 (B) 결과에서 10 g/L까지는 SAK 발현이 증가 하지만 그 이상에서는 더 이상 증가하지 않음을 알 수 있었다. 오히려 배양시간이 증가함에 따라서 SAK 발현 양이 감소하는 것으로 나타나고 있다. 이러한 현상은 SAK 생산 균주가 심한 기질 저해를 받지 않는 수준에서 높은 비성장속도를 가지는 것이 발현에도 긍정적인 효과를 끼친다는 것을 의미하는 것이다. 또한 배양 시간을 적절하게

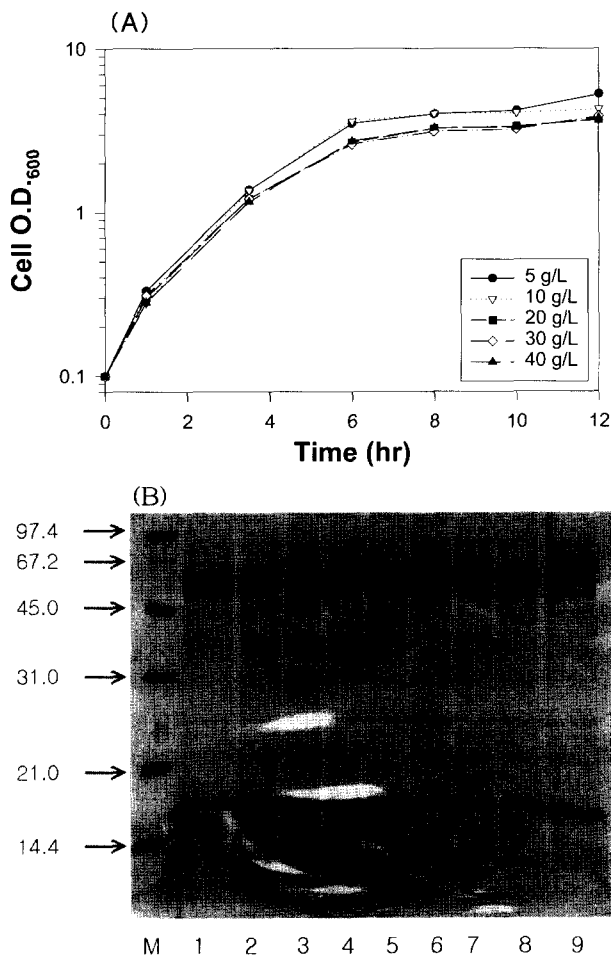


Figure 3. Effect of glucose concentration on the cell growth and SAK production. (A) Time course of the cell growth of different glucose concentration. (B) Effect of glucose concentration and culture time on SAK production. M; standard marker, 1-5 were sampled at 8 hr and 6-9 were sampled at 24 hr. 1,6; 5 g/L, 2,7; 10 g/L, 3; 20 g/L, 4,8; 40 g/L, 5,9; 50 g/L.

조절함으로써 이미 발현된 SAK의 분해를 방지할 수 있는 것으로 SDS-PAGE 결과에서 알 수 있었다.

또한 단백질 발현 균주의 성장과 발현에 큰 영향을 주는 인자중 한가지는 pH이다. 플라스크 배양 수준에서 초기 pH를 6.7, 7.0, 7.3로 변화시킨 후 재조합 균주의 성장 및 SAK 발현을 관찰한 결과, 24시간이 지났을 때 최종 pH는 각각 6.3, 6.5, 6.6으로 변했으며, pH 7.3 일때 재조합 균주의 성장 및 SAK 발현이 가장 높았다 (data not shown).

유기식 배양

앞의 실험 결과를 토대로 하여 유기식 배양에 사용한 배지 조성은 SR 배지 중에서 tryptose 대신에 tryptone으로 바꾼 것을 사용하였으며 이것을 Modified Super Rich (MSR) 배지라 명명하였다. 외부에서 첨가해 주는 배지는 농축 포도당(200 g/L)을 이용하여 공급하였다. 유기식 발효를 위한 배지내의 포도당 (200 g/L 용액) 공급은 New Brunswick BIOFLO IIc 발효기 내에 장착된 AFS 프로그램을 이용하여 DO가 30% 이상일 때 농축 포도당을 공급하고 (평균유속 0.355 g/min), DO가 30% 이하

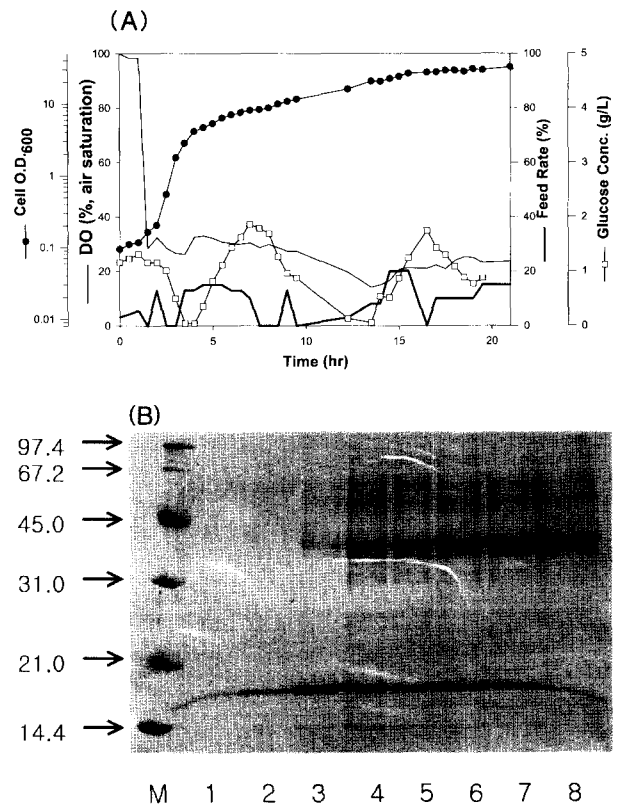


Figure 4. Fed-Batch fermentation (A) Time course of cell O.D., DO, glucose concentration, and glucose feed rate. (B) Time course of SAK production. M; standard marker. 1-8; 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18, 21 hr.

일 때는 공급속도를 줄이거나 중지하는 방식으로 포도당을 공급하는 유기식 배양을 수행하였다. 이러한 운전방식을 채택한 이유는 발효조 안의 포도당 농도가 1-2 g/L로 유지되면서 재조합 균주의 성장은 저해를 받지 않고, P43 promoter의 발현능이 최적인 되는 대수증식기 말기와 같은 상태를 유지시켜 줌으로서 SAK 생산을 높은 상태로 유지할 수 있게 함과 동시에 포도당이 고갈됨으로 인한 포자형성을 억제하기 위해서이다. Figure 4 (A)는 DO 농도를 30% 정도로 유지함으로써 균주가 포자로 전환되지 않고, 21 hr 동안 계속해서 성장함을 보여주고 있다. 그러나, DO 농도에 따른 매우 정밀한 포도당 공급속도 조절이 되지 않음으로 인하여 4 hr 부근과 14시간 부근에 배지 내의 포도당 농도가 고갈되고, 이로 인한 스트레스를 받음으로써 SAK 발현 균주의 대수 증식과정이 종결됨을 알 수 있다. Figure 4 (B)는 유기식배양시 시간에 따른 SAK 발현정도를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 3번 lane의 경우 가장 많은 SAK가 배지 내에 존재함을 알 수 있었다. 그 후 시간이 지남에 따라 이미 발현된 SAK가 오히려 감소함을 보이는데, 이러한 이유는 40 kDa정도 크기의 단백질 농도가 상대적으로 증가함과 관련이 있어 보인다. 이것은 이미 제거된 7가지 주요 프로테아제 이외에 이전상태에서는 잘 발현되지 않던 다른 프로테아제가 균주의 성장조건이 나빠짐에 따라 과발현됨으로써 나타나는 현상으로 사료된다. 이러한 현상은 자연계 내에서 흔히 발생하는 현상으로 평상시에 잘 사용하지 않던 대사과정이 생활환경이 바뀌거나 공급되는 영양분의 변화 등에 의하여 발현되는 효소의 종류

가 바뀌는 현상 등과 일맥상통하는 현상이라 하겠다. 그러나, 외래 단백질을 대량으로 발현하고자 하는 입장에서는 이러한 현상을 극복하여야 하는데, 첫째로는 7가지 주요 프로테아제 이외에 나머지 비주류 프로테아제를 모두 제거하는 방법과 둘째로서 배양조건이 균주에게 적당하지 않을 경우 이러한 현상이 벌어지기 때문에 좀더 정밀하고 최적화된 운전조건을 찾아내는 것이라 할 수 있겠다.

앞에서 최적화된 배지인 MSR 배지를 이용하여 회분식 배양과 유가식 배양을 한 결과 분비된 총 단백질 중에서 SAK 단백질이 차지하는 농도와 이때의 활성을 비교한 것을 Figure 5에 나타내었다. 그림에서 알 수 있듯이 우리의 예상과는 달리 회분식 배양의 경우가 오히려 유가식 배양의 경우보다 1.5배 가량 높은 SAK 활성과 농도를 나타내고 있다. 이러한 이유는 SAK을 발현시키기 위하여 사용한 P43 promoter의 특징(12)과 더불어, MSR 배지를 사용한 경우는 유가식배양을 통해 회분식배양과 비교해서 한층 높은 세포농도를 얻을 수 없었던 것이 주요 원인이라고 생각한다. 이를 정밀하지 못한 on-line feeding 시스템의 문제로 야기된 결과로 볼 수도 있지만, 세포 농도를 높이기 위해 순수 산소만을 이용하여 배양한 경우에도 공기만을 이용하여 배양한 경우보다 높은 세포 농도를 얻을 수 없었으며, MSR배지보다 1.5-2배 정도의 yeast extract, 질소원, 탄소원 등을 변화시켜도 역시 같은 결과를 얻게되었다(data not shown). 질소원이나 yeast extract 농도를 낮추면서 유가식 배양을 한 경우는 세포농도는 물론 SAK농도도 낮았으며, 탄소원 공급 유속을 변화시키며 배양한 결과도 회분식 배양에서보다 높은 세포농도를 얻을 수 없었다. 이를 종합해보면, *B. subtilis*에서 P43 promoter를 사용하여 SAK를 생산할 경우는, 이 promoter가 대수증식기 중반부터 시작하여 후반에 이르러 최고의 발현능을 보이는 promoter이기 때문에(12) 회분식에서 적절한 시간까지만 배양을 한 후 생성물을 분리해 낸다면 단백질의 분해를 최소화한 고농도의 SAK을 얻을 수 있으리라 사료된다.

요 약

Bacillus subtilis WB700에서 P43 프로모터를 사용하여 staphylokinase를 생산하기 위하여 배지 최적화 및 회분식 배양과 유가식 배양 두가지 시스템을 비교하였다. 여러 가지 질소원 중에서는 tryptone이 가장 좋은 질소원 이었으며, MSR 배지를 사용한 경우 tryptone 15 g/L일 경우에 최적조건임을 알아내었다. MSR 배지에서 포도당을 제한 기질로 사용할 경우는 5 g/L일 때가 SAK의 발현에 최적 조건이었다. MSR 배지를 기본으로 이용하여 포도당 공급을 조절함으로써 발효조 내의 DO를 30%로 유지한 결과 오히려 MSR 배지를 이용하여 회분식 발효를 한 경우보다 좋지 못한 결과를 얻었으며, 이는 *B. subtilis* 숙주의 영양요구적 특이성과 P43 promoter의 stress 발생시 주 발현되는 특성 등에 기인한 것이라고 사료된다. MSR 배지를 이용하여 회분식 발효를 하였을 때 SAK 활성은 2880 unit이었고, 이때 배지 내로 분비된 SAK 농도는 455 mg/L이었다.

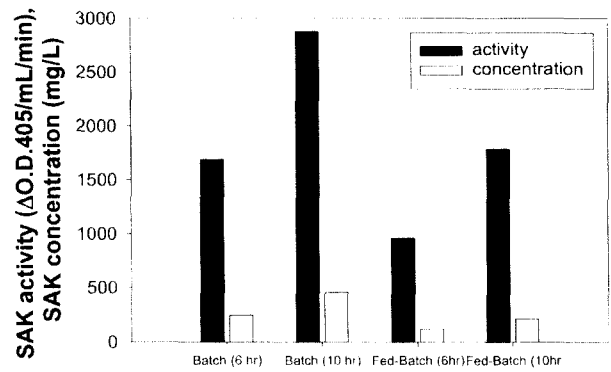


Figure 5. Comparison of batch and fed-batch fermentation for SAK activity and concentration.

REFERENCES

- Robbins, K. C. (1991), Fibrinolytic: Biochemical Mechanism, *Seminars in thrombosis and hemostasis*, **17**, 1-6.
- Collen, D. and H. R. Lijnen (1994), Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential, *Blood*, **84**, 680-686.
- Collen, D., F. De Cock, and J-M. Stassen (1993), Comparative immunogenicity and thrombolytic properties towards arterial and veous thrombi of streptokinase and recombinant staphylokinase in baboons, *Circulation*, **87**, 996-1006
- Schlott, B., M. Hartmann, K-H. Guhrs, E. Birch-Hirschfeld, H-D. pohl, S. Vanderschueren, F. V. D. Werf, A. Micoel, D. Collen, and D. Behnke (1994), High Yield Production and purification of recombinant staphylokinase for thrombolytic therapy, *Bio/Technology*, **12**, 185-189
- Vanderschueren, S., L. Stockx, G. Wilms, H. Lacroix, R. Verhaeghe, J. Vermeylen, and D. Collen (1995), Thrombolytic therapy of peripheral arterial occlusion with recombinant staphylokinase, *Circulation*, **92**, 2050-2057
- Sako, T. (1985), Overproduction of staphylokinase in *Escherichia coli*, *Eur.J. Biochem.*, **149**, 557-563
- Behnke, D. and D. Gerlach (1987), Cloning and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus sanguis* of a gene for staphylokinase - A bacterial plasminogen activator, *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 528-534
- Gerlach, D., R. Kraft, and D. Behnke (1988), Purification and characterization of the bacterial plasminogen activator staphylokinase secreted by a recombinant *Bacillus subtilis*, *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A.*, **269**, 314-322
- Ye, R., J. H. Kim, B. G. Kim, S. Szarka, E. Sihota, and S. L. Wong (1999), High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*, *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 87-96
- Oh, M. G., S. H. PARK, and B. G. Kim (1994), Development and characterization of sporulation mutants for overexpression of recombinant protein of *Bacillus subtilis*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 16-25
- Unpublished data
- Wang, P. Z. and R. H. Doi (1984), Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* σ^{55} and σ^{37} RNA polymerase holoenzyme during growth and stationary phases, *J. Biol. Chem.* **259**, 8619-8625