

Streptomyces griseus IFO13350 유래 sprA 및 sprB 유전자를 이용한 Protease 생산균주 개발

황지환 · 이창권¹ · 이강무 · 조병기 · 박해룡 · 황용일*

경남대학교 식품생명공학부, ¹건국대학교 바이오 식·의학 연구센터

방선균 *Streptomyces griseus*에서 상업적 목적으로 생산되는 protease인 pronase는 serine protease, alkaline protease, aminopeptidase 및 carboxypeptidase로 구성되어 있는 복합체로서 의약품 소염제로 널리 사용되어지고 있다. 본 연구에서는 기존에 개발되어 있는 방선균용 integration vector인 pSET152로부터 목적산물의 대량발현을 위해 방선균용 promoter *ermE*가 cloning된 새로운 integration vector인 pHJ101을 개발하였고, protease의 생산량 증대에 사용하였다. 새로 개발된 integration vector에 *S. griseus* protease A를 코딩하고 있는 유전자, *sprA*와 *S. griseus* protease B 유전자, *sprB*를 각각 cloning하여 plasmid pHJ201과 pHJ202를 구축하였다. 이들 plasmid들을 *S. griseus* IFO13350에 형질전환하여 발현용 plasmid가 chromosome에 integration된 재조합 균주 *S. griseus* HA와 *S. griseus* HB를 얻었다. 이들 재조합균주로부터 전체 protease의 생산량을 확인한 결과, 모균주 보다 각각 *S. griseus* HA는 약 5.3 배, *S. griseus* HB는 약 5 배 정도 생산량이 증대되었다. 이들 결과로부터 특정유전자의 고발현용 integration vector의 제작이 확인되었으며, 전체 protease의 생산량 증대의 가능성이 시사되었다.

Key words □ integration vector, pronase, *sprA*, *sprB*, *Streptomyces griseus*

토양 미생물인 방선균 *Streptomyces griseus*에서 상업적으로 생산되는 단백질 가수분해 효소인 pronase [EC 3. 4. group]는 serine protease, alkaline protease, aminopeptidase 및 carboxypeptidase 등 총 11종의 protease로 구성되어 있는 복합체(10, 16)로서 의약품 소염제로 널리 사용되어지고 있다. *S. griseus*로부터 이들 효소의 산업화를 위한 균주 개량방법으로 단세포 분리법과 UV 및 X선 조사 그리고, 돌연변이 유도물질에 의한 고생산능 변이주의 획득법 등이 널리 이용되고 있다. 실제로 일본 Kaken Chemical Co.에서는 이들 방법을 이용하여 pronase 고생산능 변이주 *S. griseus* K1이 보고되어 있으며(18, 19, 20) 현재 산업적으로 중요한 미생물로 상업화 되어있다. 그러나 이들 방법들은 무작위적인 고생산능 변이주의 선별방법으로 많은 시간과 노력이 필요하며 생산성 향상에도 한계가 있다. 최근 분자생물학적 지식을 근거로 한 유전자 재조합기술의 발달로 유용물질의 고생산능 균주의 개발은 과거의 무작위적인 고생산능 균주선별방법의 문제점들을 보완한 유전자 조작방법들이 이용되어지고 있다. 보고된 자료에 따르면 *S. griseus*에서 protease의 생산량을 증대시키기 위하여 serine protease (1, 2)에 속하는 구조유전자 *sprA*로부터 코딩되는 *S. griseus* protease A(S.G.P.A.; 이하 SGPA) (1, 4, 5), *sprB*로부터 코딩되는 *S. griseus* protease B (S.G.P.B.; 이하 SGPB) (1, 4, 6), *sprC*로부터 코딩되는 *S. griseus* protease C (S.G.P.C.; 이하 SGPC) (9, 15), *sprD*로부터 코딩되는 *S. griseus*

protease D (S.G.P.D.; 이하 SGPD) (2) 등의 유전자를 plasmid 형태로 도입하여 생산성이 향상된 균주들이 개발되어 있으며, 이들 효소 및 유전자의 특성이 잘 연구되어 있다. 특히 11종의 protease들 중 주요구성성분 중의 하나로 알려져 있는 SGPB (6)는 amino acid에 근거하여 SGPA와 약 61%의 상동성을 가지고 있다(4, 6). 특이적으로, SGPB는 urea와 guanidine hydrochloride 농축용액에서 변성되지 않으며 이것은 SGPA와 다른 큰 특징 중에 하나이기 때문에 이의 대량생산을 목적으로 유전자 재조합 균주들이 많이 개발되어 있다(6). 그렇지만 이들 plasmid를 이용한 생산성 향상균주의 개발방법은 plasmid의 안정성 확보를 위한 항생제의 사용 및 생산성의 변화 등의 많은 문제점들이 대두되어지고 있다(8). 이러한 문제점들을 극복하기 위해서 본 연구에서는 현재까지 보고가 미비한 *S. griseus*의 염색체 DNA에 이들 유전자를 직접 integration하여 고생산능 균주를 개발하고자 하였다. 따라서 신규 방선균용 유용 integration vector를 개발하여, protease 유전자, *sprA* 및 *sprB*의 대량발현을 통한 전체 pronase 고생산능 균주의 개발 및 생산성 검토로 진행되었다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에서 protease 생산 균주로 *S. griseus* IFO13350을 사용하였다. *E. coli* ET12567/pUZ8002 (7)는 *S. griseus* IFO13350의 접합전달용 공여균주로 이용되었고 plasmid DNA의 제작 및 대량회수를 위해서는 *E. coli* DH5α가 사용되었다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-249-2685 Fax: 055-249-2995
E-mail: yihwang@kyungnam.ac.kr

pIJ4090은 *ermE* promoter를 얻기 위한 PCR의 template DNA로 사용되었고, pIJ8606은 thiostrepton 내성 유전자를 얻기 위해 사용되었다(7). pSET152 (21)는 목적 유전자를 cloning하여 *S. griseus* IFO13350에 도입할 수 있는 integration vector를 구축하기 위해 사용되었다. 또한 방선균용 integration vector pHJ201 및 pHJ202는 protease 생산을 위한 plasmid로 본 실험에서 제조하였다.

배지 및 배양조건

S. griseus IFO13350의 포자회수를 위하여 SFM (mannitol 20 g/l, soy flour 20 g/l, agar 20 g/l) 한천배지를 사용하였고, *S. griseus*와 공여균주간의 접합전달을 위한 배지는 10 mM MgCl₂가 함유된 SFM 한천배지를 사용하였다. Protease 생산용 배지로는 GSS (glucose 10 g/l, soy flour 15 g/l, NaCl 5 g/l) 배지를 사용하였고, 실험에서 이용한 모든 방선균의 염색체 DNA 추출을 위한 액체배양은 TSB (pancreatic digest of casein 17 g/l, papaic digest of soybean meal 3 g/l, NaCl 5 g/l, K₂HPO₄ 2.5 g/l, glucose 2.5 g/l) 배지를 이용하였다. *E. coli* 및 공여균주의 일반 배양 및 형질전환에는 Luria Bertani (LB) 배지를 이용하였다.

Protease 생산을 위하여 100 ml의 GSS 배지에 포자현탁액을 1 × 10⁴ CFU/ml이 되도록 접종하고, 28°C에서 180 rpm으로 진탕배양하였다. *E. coli* 및 공여균주의 액체배양은 37°C에서 180 rpm으로 각각 진탕배양하였다.

DNA 조작 및 분리

*E. coli*로부터 plasmid의 분리 정제는 알칼리 추출법(13)을 사용하였으며, 방선균의 염색체 DNA 및 plasmid의 추출은 Hopwood(7)등의 방법을 따랐다. 그 외, 각종 제한효소의 처리, plasmid의 해석 등의 DNA 조작과 일반적인 *E. coli* competent cell 제조 및 형질전환은 Sambrook(13)등의 방법을 따랐다.

접합전달에 의한 방선균의 형질전환

*E. coli*에서 *S. griseus* IFO13350으로 plasmid의 접합전달은 Simon(7)등이 확립한 방법에 따라 수행하였다. Kanamycin (25 µg/ml; 이하 Km)과 chloramphenicol (25 µg/ml; 이하 Cm)이 함유된 LB 배지에 *E. coli* ET12567/pUZ8002균주의 competent cell을 TSS법(7)에 의해 조제하고, 목적의 integration plasmid를 형질전환시켰다. 항생물질이 함유된 배지에서 선발된 형질전환체를 Km과 Cm 및 plasmid 유래의 apramycin (25 µg/ml; 이하 Apr)이 첨가된 10ml의 LB 배지에 접종하여 약 15시간 동안 전 배양하고, 동일 조건의 100 ml의 LB 배지에 전배양액을 1% 접종한 후, 600 nm에서 흡광도가 0.4~0.6이 될 때까지 37°C에서 180 rpm으로 진탕배양하였다. *S. griseus* IFO13350의 생육에 저해가 되는 항생제를 제거하기 위하여 동량의 신선한 LB 배지로 균체를 두 번 세척한 후, 0.1 배의 LB 배지로 재현탁하여 *S. griseus* IFO13350와의 접합전달을 위한 공여균주로 이용하였다.

S. griseus IFO13350에 효율적인 접합전달을 위하여 1 × 10⁸의 *S. griseus* 포자에 2 × YT broth 0.5 ml를 첨가한 후, 50°C에서

10분 동안 열처리하여 포자를 발아시킨 후, 0°C에서 10분간 급 냉시켰다. 열처리한 포자 0.5 ml와 상기에서 조제한 접합전달을 위한 공여균주 0.5 ml를 잘 혼합한 다음, 10,000 × g로 3분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 얻어진 pellet을 재현탁하여, 10 mM의 MgCl₂가 함유된 SFM 한천배지에 도말하여 28°C에서 16~20시간동안 정지배양하였다. 형질전환체의 선별을 위하여 nalidixic acid (50 µg/ml; 이하 Nal)와 Apr (100 µg/ml)이 함유된 1 ml의 항생제 혼합용액을 배지위에 중첩시킨 후, 28°C에서 계속 배양하였다. 선발된 접합전달체를 Nal (25 µg/ml) 및 Apr (25 µg/ml)이 함유된 선택 배지에 계대배양하여 얻어진 균주들의 염색체 DNA를 추출하고 PCR에 의해 형질전환 유무를 확인한 후, protease 생산을 위한 생산 균주로 사용하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR) 및 protease 유전자의 cloning

Protease 생산성 향상 유전자 재조합 균주의 개발을 위해 protease 유전자, *sprA* (Genebank accession No. A24972), *sprB* (Genebank accession No. A24973)와 이들 유전자들의 고발현을 위한 *ermE* promoter (14)의 특이적인 primer를 DNA database의 자료를 근거로 Table 1과 같이 제작하였다. 이들 primer를 이용하여 thermal cycler DNA 증폭장치(GeneAmp PCR system 2400, Applied Biosystems, USA)에 의해 PCR을 수행하였다.

Southern blot analysis

*sprA*와 *sprB* 유전자가 각각 integration 되어있는 재조합균주들의 염색체 DNA를 추출하여 *SalI*과 *EcoRI*로 각각 분해한 후, 1% agarose gel에 전기영동하고 이것을 변성용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 30분, 중화용액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.2)에 15분씩 2번 처리하였다. 이후 agarose gel의 DNA를 nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, UK)로 transfer하고 UV illuminator 하에서 5분 정도 조사하여 DNA를 고정하였다.

Probe는 signal의 특이성을 높이기 위하여 목적유전자인 *sprA*를 *HincII*로(A probe), *sprB*를 *BamHI-EcoRI*으로(B probe) 각각 절단한 다음, Random Primer DNA Labeling Kit, version 2 (Takara Shuzo Co., Japan)를 사용하여 방사성 동위원소인 [³²P] dCTP로 labeling시켰다. Hybrid bag에 Rapid-hyb buffer

Table 1. Design of PCR primers for cloning of *S. griseus sprA* and *sprB* coding regions and *ermE* promoter

Primer	Sequence	Tm (°C)
<i>sprA</i> -F	5'-ATACCTCGGAGGATCTCGTGACC-3'	61
<i>sprA</i> -R	5'-GTTGAGTGAGGGCTTCCCCAG-3'	
<i>sprB</i> -F	5'-CGGGATCC ^{a)} CTCGGAGGAACCCGAAGTGAG-3'	61
<i>sprB</i> -R	5'-CGACATCCTCTCAAGAGCTCCC-3'	
<i>ermE</i> -F	5'-GCTCTAGA ^{b)} TCTGGGGAATTCGAGC-3'	60
<i>ermE</i> -R	5'-CGGGATCC ^{a)} TCAGATCTGCAGCCAAGC-3'	

^{a)}*BamHI* restriction enzyme site

^{b)}*XbaI* restriction enzyme site

(Amersham Pharmacia Biotech, UK) 25 ml와 membrane을 넣고 15분간 prehybridization을 실시하였다. 이후 방사선 동위원소 [α - 32 P] dCTP로 표지된 probe를 넣고 65°C에서 2시간 hybridization을 실시하였으며 hybridization이 끝난 membrane은 비특이적인 signal을 제거하기위해 충분히 washing 한 후, X-ray film (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)에 노출하여 현상하였다.

Protease 활성 측정

Protease assay는 Nomoto와 Narahashi 방법(11)을 변형하여 측정하였다. 1 ml의 조효소액과 2% casein 용액(pH 7.4) 1 ml를 잘 섞은 다음 30°C에서 10분간 반응시킨 후, 단백질을 침전용액(0.1 M trichloroacetate, 0.2 M acetic acid, 0.2 M sodium acetate)을 2 ml 첨가하여 30°C에서 20분 동안 정치하였다. 침전된 침전물을 filtration에 의해 제거하고, 여액 1 ml에 0.4 M sodium carbonate 5 ml와 1/5 Folin-Ciocalteu's 시약 1 ml를 첨가한 다음 30°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 670 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 unit(이하 PU)는 30°C에서 1분 동안에 효소용액 1 ml에 의하여 tyrosine 1.0 μ g이 유리되는 것으로 정의하였다.

결과 및 고찰

Protease 고생산능 균주개발을 위한 모균주 선발

Protease 고생산능 유전자 재조합 균주 개발을 위한 모균주를 선별하기 위하여 기존의 pronase 생산균주로 알려진 *S. griseus* IFO13689와 *S. griseus* IFO13350의 protease 생산능을 검토하였다. Protease 생산 및 균체 생육을 위하여 일반적인 방선균 배지 R2YE, SFM 및 GSS배지에서 예비실험을 실시하였다. 실험결과, *S. griseus*의 항생물질 생산 등에 이용되는 GSS배지에서 균체생육과 포자형성능, protease activity 등이 상대적으로 우수하였으며 배지성분도 간단하여 향후 이를 생산용 배지로 사용하기로 하였다.

Fig. 1에서와 같이 *S. griseus* IFO13689와 *S. griseus* IFO13350의 protease 활성은 각각 배양 6일째에 5.3×10^5 PU/ml였고, 배양 5일째에 1.1×10^4 PU/ml로 약 2배 이상의 차이를 나타내었다. 전체적인 균의 생육도 역시 *S. griseus* IFO13350이 우수하였으며, 이를 근거로 하여 protease 고생산능 균주 개발을 위한 모균주로 *S. griseus* IFO13350을 사용하기로 하였다.

Protease 생산성 향상을 위한 새로운 integration vector의 개발

기존에 개발되어 있는 방선균용 integration vector pSET152는 attP site를 보유하고 있어 숙주균주의 염색체 상에 있는 attB site와의 상호작용에 의해 유용유전자들을 염색체 상에 도입할 수 있으며 효율적인 형질전환체의 선별을 위한 apramycin 약제내성 유전자를 보유하고 있다(21).

Protease 유전자들의 대량발현을 위하여 방선균에서 유전자의 대량발현에 보편적으로 이용되며 constitutive하게 발현하는 promoter로 알려져 산업적 유전자발현에 이용되는 *Saccharopolyspora*

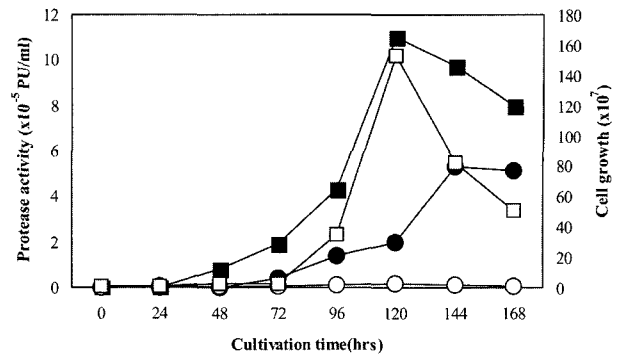


Fig. 1. Comparison of protease activities produced by *S. griseus* IFO13689 and *S. griseus* IFO13350. Each strain was cultivated at 28 °C in GSS medium. Symbols : ● - ● ; protease activity produced by *S. griseus* IFO13689, ○ - ○ ; cell growth of *S. griseus* IFO13689, ■ - ■ ; protease activity produced by *S. griseus* IFO13350, □ - □ ; cell growth of *S. griseus* IFO13350.

*erythraea*유래의 erythromycin 내성유전자의 promoter *ermE*를 선택하여 이용하기로 하였다(7). 먼저 *ermE* promoter를 보유하고 있는 plasmid pIJ4090을 주형 DNA로 하여 *ermE* promoter의 cloning을 위한 특이적인 primer(Table 1)와 PCR 조건으로 약 300 bp의 DNA 산물을 획득하였다(결과 미제시). Fig. 2에서와 같이 *ermE* promoter의 효율적인 cloning 및 방향성을 주기 위해 primer 단계에서 각 말단에 제한효소 *Xba*I과 *Bam*HI site가 도입되어 있으므로(Table 1) 이들 제한효소들을 이용하여 PCR 산물들을 절단한 후, pSET152의 *Xba*I-*Bam*HI site에 cloning하여 pHI101로 명명하고 이후, protease의 생산성 향상을 위한 integration vector로 활용하고자 하였다.

Protease 유전자들의 cloning 및 대량발현용 plasmid의 제작

유전자 재조합에 의한 protease 고생산능 균주개발을 위하여 protease SGPA, SGPB의 구조유전자 *sprA*, *sprB*를 cloning하기로 하였다. 먼저 이들 유전자들의 단백질 코드를 cloning하기 위하여 DNA database의 염기서열을 토대로 특이적인 primer를 제작하여(Table 1), *S. griseus* IFO13350의 염색체 DNA를 주형으로 PCR에 의하여 각각 1.2 kb와 1.0 kb의 목적산물들을 얻었다. 이들 PCR 산물들을 대장균용 cloning vector인 pGEM-T easy vector에 subcloning 하였다(결과 미제시). 각각의 유전자들을 적절한 제한효소(*sprA*; *Eco*RI, *sprB*; *Bam*HI-*Pst*I)로 절단하고 T4 DNA polymerase를 이용하여 blunt end화한 후, 본 연구에서 새로이 개발한 방선균용 integration vector pHI101을 *Bam*HI로 분해하고 blunt end화하여 각각 cloning 하였다. 전체적인 plasmid의 제조 과정은 Fig. 2에서 나타내었으며, 구축되어진 plasmid들을 적절한 제한효소 및 PCR 법에 의해 완성유무를 확인한 후(결과 미제시), 각각 pHI201, pHI202로 명명하고 유전자 재조합에 의한 protease 고생산 균주개발을 위한 plasmid로 활용하기로 하였다.

제작된 plasmid들을 *E. coli* ET12567/pUZ8002에 각각 도입한

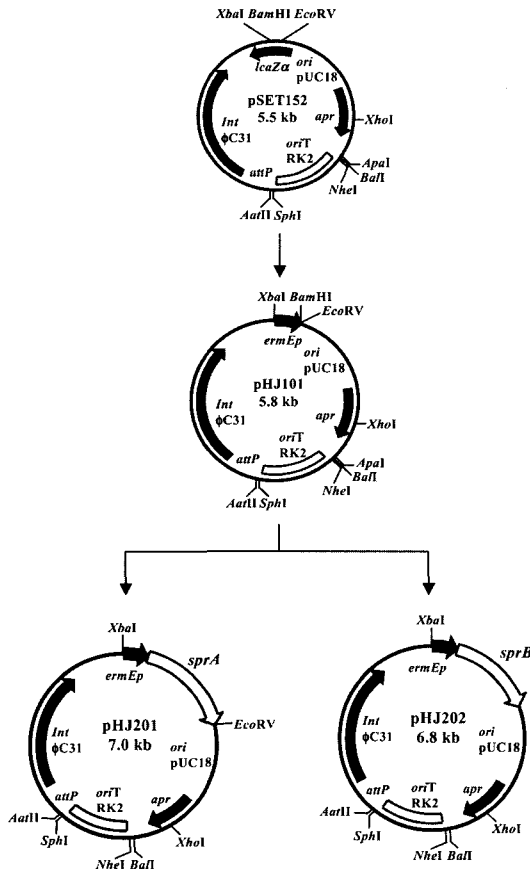


Fig. 2. Construction of pHJ201 and pHJ202 for protease production. Construction procedures are well described in the text.

후 얻어진 형질전환체를 대장균-방선균간의 접합전달법에 의해 *S. griseus* IFO13350에 형질전환하였다.

형질전환체의 확인은 Apr (25 µg/ml) 및 Nal (25 µg/ml)이 첨가된 한천배지에서 얻어진 접합전달체들의 염색체 DNA를 추출한 후, apramycin 약제내성유전자에 대하여 특이적인 primer를 이용한 PCR 법에 의해 목적의 clone들을 선별하였다(결과 미제시). 그 결과, *sprA*의 대량 발현균주인 *S. griseus* HA와 *sprB*의 대량 발현균주인 *S. griseus* HB를 얻었다. 이들 균주들의 형태학적 변화를 검토한 결과, 이들 균주들은 포자를 형성하지 않는 특징을 보였으며(결과 미제시), 이는 형태분화에 있어서 중요한 역할을 하는 peptide, phosphorylate regulatory protein 및 sigma factor 등이 protease 유전자들의 과잉발현에 의해 영향을 받기 때문이라고 생각된다(12, 17, 22).

목적유전자의 integration 확인을 위한 Southern blot analysis

방선균 형질전환체 *S. griseus* HA 및 HB 균주에 대한 vector pHJ201 및 pHJ202의 정상적인 염색체내 integration을 southern hybridization으로 확인하고자 하였다. Fig. 3의 (A)의 2번 lane에서와 같이 *sprA*의 *HincII* probe에 의하여 vector pHJ201의 *sprA* 유전자를 포함하는 3.5 kb의 *Sall* DNA 단편이 확인되었다. 이와

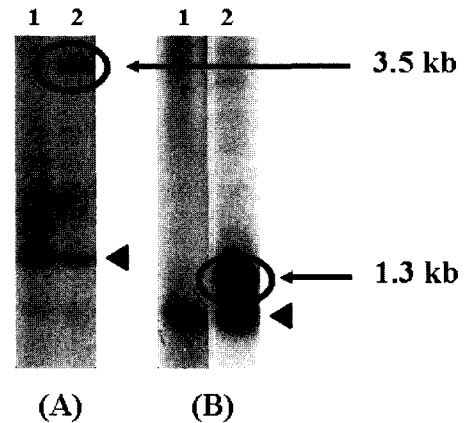


Fig. 3. Genomic southern blot analysis of *sprA* and *sprB* gene in *S. griseus* HA and *S. griseus* HB. Genomic DNAs (15 µg per lane) were digested with *Sall* and *EcoRI*, respectively, and fractioned on 1% (w/v) agarose gel and transferred to a nylon membrane. The filters were allowed to hybridize with ³²P labeled fragment of the *sprA* and *sprB*. (A) Southern blotting for *sprA*; lane 1: wild type/*Sall*, lane 2: *S. griseus* HA/*Sall*. (B) Southern blotting for *sprB*; lane 1: wild type/*EcoRI*, lane 2: *S. griseus* HB/*EcoRI*. Triangles indicate the genomic *sprA* gene(A) and *sprB* gene(B), respectively.

함께 Fig. 3의 (B)의 2번 lane에서는 *sprB*의 probe에 의하여 vector pHJ202의 *sprB* 유전자를 함유한 1.3 kb의 *EcoRI* DNA 단편이 확인되었다. 이들 결과로부터 각 방선균 형질전환체 *S. griseus* HA 및 *S. griseus* HB에는 *sprA* 발현용 vector pHJ201 및 *sprB* 발현용 vector pHJ202가 정상적으로 integration 되어있음을 확인하였다. 이후 이들 방선균 형질전환체를 이용하여 실제 전체적인 protease 효소 활성의 증가를 검토하고자 하였다.

***S. griseus* HA 및 *S. griseus* HB의 protease 효소활성**

25 µg/ml의 apramycin이 첨가된 100 mL의 GSS 배지에 *S. griseus* HA와 *S. griseus* HB의 균사를 1 × 10⁴ CFU/ml가 되도록 접종한 후, 28°C, 180 rpm에서 168시간 동안 진탕배양 하였으며, 대조구로 사용한 *S. griseus* IFO13350은 항생물질을 첨가하지 않은 100 ml의 GSS배지에 포자를 1 × 10⁶ CFU/ml가 되도록 접종한 후, 동일 조건에서 진탕배양 하였다. Fig. 4(A)의 균체증식 결과로부터 모균주인 *S. griseus* IFO13350과 본 연구에서 개발한 재조합 균주 *S. griseus* HA와 HB의 생육곡선에 대하여 검토한 결과, 모균주에 비하여 생육정도가 약간 늦어짐을 알 수 있었다. 이는 배지에 첨가된 apramycin의 영향으로 사료되어지며, 배양 132시간 이후 급격히 감소하는 균체생육은 생산된 protease의 영향으로 추정되나 상세한 추가 실험이 요구된다. 또한, 각각의 배양액으로부터 적절한 시간 별로 시료를 채취한 후, 원심분리에 의해 균체를 제거하고 상정액을 이용하여 Nomoto와 Narahashi 방법(11)에 따라 protease의 효소활성을 확인하였다. Fig. 4(B)의 결과에서 protease의 최대 활성은 *S. griseus* IFO13350가 1.3 × 10⁴ PU/ml, *S. griseus* HA가 6.9 × 10⁴ PU/ml, *S. griseus* HB가 6.4 × 10⁴ PU/ml이었다. 이는 *S. griseus* IFO13350과 비교할 때, *S.*

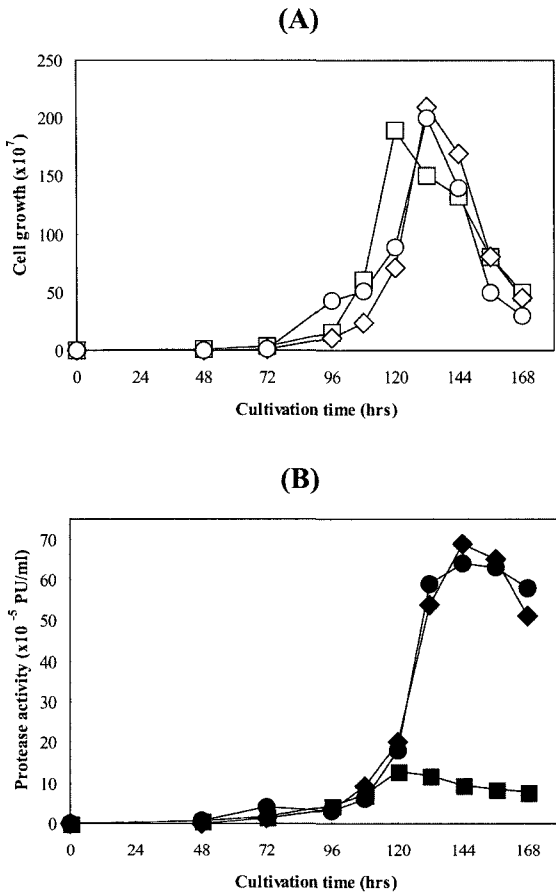


Fig. 4. Cell growths(A) and protease activities(B) of *S. griseus* IFO13350, *S. griseus* HA and *S. griseus* HB in Erlenmeyer flask containing GSS medium. These strains were cultivated for 168 hrs at 28 °C, 180 rpm. : ◇-◇, ○-○ and □-□ represent cell growths of *S. griseus* HA, HB and IFO13350, respectively. : ◆-◆, ●-● and ■-■ represent protease activities of *S. griseus* HA, HB and IFO13350, respectively.

griseus HA는 약 5.3배의, *S. griseus* HB는 약 5배의 protease의 생산성이 향상되었다.

상업적 생산을 위한 protease 생산균주 *S. griseus* K1의 발효조 배양에서 효소활성이 배양액 1 ml당 7~10 × 10⁻³ PU로 보고되어 있으며(11), 본 실험에서 개발된 균주 *S. griseus* HA의 플라스크 배양에서의 효소활성(6.9 × 10⁻⁴ PU/ml)보다 약 10배 이상의 차이가 남을 알 수 있다. *S. griseus* HA의 경우는 protease의 주요 구성성분인 serine protease의 유전자 *sprA*의 과발현용 vector가 integration된 재조합 균주이다. 따라서 protease의 상업적 생산을 위해서는 먼저, 주요구성 protease들의 유전자 *sprB*, *sprC* 및 *sprD* 등의 과발현 시스템을 구축하여 현재 개발되어진 protease 생산용 균주에 순차적으로 도입하고, 이후 적절한 배지의 선택과 배양 조건의 최적화가 이루어진다면 보다 좋은 결과가 얻어질 수 있으리라 기대된다. 아울러 본 연구에서 새로이 개발되어진 integration vector는 방선균에서의 유용 생리활성 물질들의 생산 및 생산성 향상 균주를 개발하는데 있어 산업적으로 아주 유용

하게 이용될 것이다.

감사의 글

본 연구는 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Choi, W.J., J.M. Kim, S.S. Choi, D.K. Kang, and S.K. Hong. 2001. Overproduction of *Streptomyces griseus* protease a and b induces morphological changes in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 1077-1086.
- Choi, S.S., W.J. Chi, J.H. Lee, S.S. Kang, B.C. Jeong, and S.K. Hong. 2001. Overexpression of the *sprD* gene encoding *streptomyces griseus* protease D stimulates actinorhodin production in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol.* 39, 304-313.
- Hagihara, B., H. Matsubara, M. Nakai, and K. Okunuki. 1957. Crystalline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase of *Bac. subtilis*. *J. Biochem.* 45, 185-194.
- Henderson, G, P. Krygman, C.J. Liu, C.C. Davey, and L.T. Malek. 1987. Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 169, 3778-3784.
- Johnson, P., and L.B. Smillie. 1974. The amino acid sequence and predicted structure of *Streptomyces griseus* protease A. *FEBS Letters* 47, 1-6.
- Jurasek, L., M.R. Carpenter, L.B. Smillie, A. Gertler, S. Levy, and L.H. Ericsson. 1974. Amino acid sequence of *Streptomyces griseus* protease B, a major component of pronase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 1095-1100.
- Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater, and D.A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich.
- Koo, B.J., J.M. Kim, S.M. Byun, and S.K. Hong. 1999. Optimal production conditions of *Streptomyces griseus* Trypsin (SGT) in *Streptomyces lividans*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 32, 86-91.
- Marcos, A.T., B. Diez, S. Gutierrez, F.J. Fernandez, J.A. Oguiza, and Martin, J. F. 1995. Three genes *hrdB*, *hrdD* and *hrdT* of *Streptomyces griseus* IMRU3570, encoding sigma factor-like proteins, are differentially expressed under specific nutritional conditions. *Gene* 153, 41-48.
- Narahashi, Y., K. Shibuya, and M. Yanagita. 1968. Studies on proteolytic enzymes(Pronase) of *Streptomyces griseus* K-1.II. Separation of exo- and endopeptidases of pronase. *J. Biochem.* 64, 427-437.
- Nomoto, M., and Y. Narahashi. 1959. A Proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*.I. purification of a protease of *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* 46, 653-667
- Park, U., J.W. Suh, and S.K. Hong. 2000. Genetics analysis of *absR*, a new *abs* locus of *Streptomyces coelicolor*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 169-175.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schmitt-John T., and J.W. Engels. 1992. Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividas*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 493-498.
- Sidhu, S.S., G.B. Kalmar, L.G. Willis, and T.J. Borgford. 1994.

- Streptomyces griseus* protease C-a novel enzyme of the chymotrypsin superfamily. *J. Biol. Chem.* 269, 20167-20171.
16. Trop, M., and Y. Birk. 1970. The specificity of proteases from *Streptomyces griseus*(pronase). *J. Biochem.* 116, 19-25.
 17. Ueda K., T. Umeyama, T. Beppu, and S. Horinouchi. 1996. The aerial mycelium-defective phenotype of *Streptomyces griseus* resulting from A-factor deficiency is suppressed by a Ser/Thr kinase of *S. coelicolor* A3(2). *J. Mol. Microbiol.* 169, 91-95.
 18. Vosbeck, K.D., K.F. Chow, and W.M. Awad, Jr. 1973. The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation(pronase) - Purification and characterization of the aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* 248, 6029-6034.
 19. Vosbeck, K.D., B.D. Greenberg, and W.M. Awad, Jr. 1974. The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation(pronase) - specificity and immobilization of aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 250, 3981-3987.
 20. Vosbeck, K.D., B.D. Greenberg, M.S. Ochoa, P.L. Whitney, and W. M. Awad, Jr. 1978. The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation(pronase) - Effect of pH, metal ions, and amino acids on aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 253, 257-260.
 21. Wilkinson, C.J., Z.A. Hughes-Thomas, C.J. Martin (nee Rowe), I. Bohm, T. Mironenko, M. Deacon, M. Wheatcroft, G. Wirtz, J. Staunton, and P.J. Leadlay. F. 2002. Increasing the efficiency of heterologous promoters in actinomycetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 416-26.
 22. Willy J., J. Schwedock, and R. Losick. 1993. Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* 7, 895-903.

(Received January 12, 2005/Accepted February 3, 2005)

ABSTRACT : Development of a Recombinant *Streptomyces griseus* with *sprA* and *sprB* Genes for Proteolytic Enzyme Production

Ji-Hwan Hwang, Chang-Kwon Lee¹, Kang-Mu Lee, Byoung-Kee Jo, Hae-Ryong Park, and Yong-Il Hwang* (Division of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea, ¹Bio Food and Drug Research Center, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea)

Pronase, a protease produced for commercial purpose by *Streptomyces griseus*, was composed of serine protease, alkaline protease, aminopeptidase and carboxypeptidase complex, and it has been widely used as anti-inflammatory drugs for human therapy. In this study, we developed a new integration vector, pHJ101 derived from pSET152, containing strong promoter, *ermE*, to overexpress a certain protease gene. Specific PCR primers for cloning of *sprA* (a gene for *S. griseus* protease A) and *sprB* (a gene for *S. griseus* protease B) genes were designed from the basis of nucleotide sequence in databases and amplified by PCR. Plasmid pHJ201 and pHJ202 were constructed by inserting of amplified each gene in a vector pHJ101. *S. griseus* HA and *S. griseus* HB were respectively obtained by conjugal process of a parent strain, *S. griseus* IFO13350 with the recombinant *Escherichia coli* harboring plasmid pHJ201 or pHJ202. When protease activity was measured in flask cultivation, produced protease levels of *S. griseus* HA and *S. griseus* HB increased about 5.3 times and 5 times, respectively, more than that of parent strain. And, the constructed integrating plasmid pHJ101 was applicable for overexpression of a certain gene in *Streptomyces* sp.