

미생물을 이용한 트립신 과대 생산 연구 - *Streptomyces* 용 숙주 벡터계를 이용한 트립신 유전자의 대량발현 최적화 -

김종희 · 홍순광^{1*}

서울대학 식품영양학과, ¹명지대학교 생명과학정보학부 · 생명공학연구소

Overproduction of Bacterial Trypsin in *Streptomyces* - Optimization for *Streptomyces griseus* Trypsin Production by Recombinant *Streptomyces*. Kim, Jong-Hee and Soon-Kwang Hong^{1*}. Department of Food and Nutrition, Seoil College, Seoul 131-208, Korea, ¹Department of Biological Science & Institute of Bioscience and Biotechnology, Myongji University, Yongin 449-728, Korea - The expression vector (pWHM3-TR1R2) for *sprT* gene encoding *Streptomyces griseus* trypsin (SGT) followed by two regulatory genes, *sgtR1* and *sgtR2*, was introduced into *Streptomyces lividans* TK24 and *Streptomyces griseus* IFO 13350. Various media with different compositions were used to maximize the productivity of SGT in the recombinant strains. The SGT productivity was best when the transformant of *S. lividans* TK24 was cultivated in R2YE medium (0.74 unit/mL) at 5 days of cultivation. C5/L (0.66 unit/mL) medium also gave a good productivity, but Livid (0.08 unit/mL) and NDSK (0.06 unit/mL) yielded poor productivities. *S. griseus* IFO 13350/pWHM3-TR1R2 produced SGT by 1.518 unit/mL (C5/L), 1.284 unit/mL (R2YE), 0.932 unit/mL (NDSK), and 0.295 unit/mL (Livid) at 7 days of cultivation, which was much higher than those from *S. lividans* TK24/TR1R2. The SGT protein was purified from the culture broth of *S. griseus* IFO 13350/pWHM3-TR1R2 in C5/L to homogeneity via ammonium sulfate fractionation, and CM-sepharose and SP-sepharose column chromatographies. The specific activity of purified SGT was 69,252 unit/mg, and the final purification fold and recovery yield were 6.5 and 1.4%, respectively.

Key words: *Streptomyces griseus*, bacterial trypsin, *sprT*, *sgtR1*, *sgtR2*

서 론

단백질분해효소는 소염제, 소화제 등의 의약품, 제빵, 치즈, 고기연화제 등의 식품산업, 세제 및 공업용 등으로 다양하게 이용된다. 이 중 많은 기질에 대하여 정확한 부위를 인식하고 효소반응을 매개하는 트립신은 소염제 및 소화제와 같은 산업적 분야는 물론 proteomics 등의 연구용으로도 활용되고 있다[21].

본 연구진은 다양한 단백질 분해효소를 생산하는 것으로 알려진 방선균 *Streptomyces griseus*에서 유용한 protease의 생산 연구를 실시하여 왔다. 이중 chymotrypsin 계열의 *Streptomyces griseus* protease A, B, C, D를 코드 하는 유전자 *sprA*, *sprB*, *sprC*, *sprD*를 클로닝하여, 이중 균주인 *S. lividans*에서 대량발현에 성공하였다[5-7, 15]. 또한, 동일 균주로부터 *Streptomyces griseus* trypsin (SGT)을 코드하는 유전자 *sprT* 및 *sprU* 유전자를 클로닝 하였고, 이들 유전자의 대량 발현 연구도 실시하였다[3, 22]. 흥미롭게도 이러한

protease 유전자의 발현이 *sprC* 유전자를 제외하고는 공통적으로 미생물 호르몬으로 불리는 A-factor (2-isocaprolyl-3-R-hydroxy-methyl- α -butyrolactone)에 의해 positive하게 조절되며, 따라서 AdpA (A-factor dependent activator protein A)에 의해 전사가 유도되는 AdpA regulon을 구성하고 있음이 밝혀졌다[6, 12, 20]. A-factor는 아주 낮은 농도에서 AdpA의 발현을 유도하고, 발현된 AdpA 단백질이 다양한 목표유전자의 promoter에 결합하여 전사를 유도함으로써, 방선균의 형태분화, 포자형성, 항생물질이나 색소형성과 같은 이차대사를 조절하는 것으로 알려져 있다[9, 10].

SGT는 bacterial serine protease로 포유동물이 생산하는 트립신과 유사하다 [21]. 이를 코드하는 *sprT* 유전자(Genebank accession No. M64471)는 *S. griseus* ATCC 10137의 유전자 library로부터 클로닝되어 보고되었다[14]. 이후, *sprT* 유전자의 *S. lividans* TK24에서의 대량 발현 조건에 대한 연구 및 정제된 SGT의 효소학적 특성 연구가 보고된 바 있다[16, 17]. *sprT* 유전자의 도입은 *S. lividans*의 이차대사 산물 생산에는 영향을 주지 않았으나, 형태분화에는 큰 영향을 나타낸다[2]. 또한, SGT는 강력한 gelatinase 활성을 갖고 있으며, manganese에 의해 SGT 활성이 2.6배 증가하는 것으로 밝혀 졌다[4]. 본 연구진은 *sprT* 유전자를 포함

*Corresponding author

Tel: 82-31-330-6198, Fax: 82-31-335-8249

E-mail: skhong@mju.ac.kr

하는 염색체 DNA 6.4 kb (GenBank accession no. AY588948)를 *S. griseus* IFO 13350으로부터 클로닝하여 분석한 결과, *sprT* 유전자 바로 하류에 존재하는 두 유전자가 많은 생물체에서 보고된 조절 유전자들과 큰 상동성이 있음을 알게 되었다[3]. *sprT* 유전자와 두 개의 조절유전자 *sgtR1*, *sgtR2*의 관계를 분자생물학적인 방법으로 연구한 결과, 두 조절 유전자에 의하여 트립신의 발현량이 트립신 유전자의 단독 발현시에 비해 약 20-30배 증가함을 확인하였다[18]. 또한, 이러한 발현량의 증가는 조절 유전자에 의해 *sprT* 유전자의 전사량이 증가하는 것에서 기인하며, 이는 AdpA와는 무관하게 독립적으로 일어나는 현상임을 밝힌 바 있다.

이러한 배경 하에 본 연구에서는 재조합 방선균에서 트립신 생산을 극대화하기 위해 재조합 균주의 배양조건을 탐색하고, 생산된 방선균 트립신의 분리정제 조건을 개선 하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 조건

고체배양은 Benedict's 배지 (yeast extract 1 g, meat extract 1 g, casein hydrolysate 2 g, glucose 10 g, agar 15 g)에 방선균을 도말하여 27°C에서 배양하였다. 방선균 배양에 사용한 액체배지는 Table 1에 표시하였다. 우선 *Streptomyces* 균주들을 10 mL의 R2YE 배지로 28°C에서 2일 배양 하여 seed culture를 실시하였고, 이를 각각의 액체 배지 50 mL를 분주한 250 mL baffled flask에 2차 접종하고 진탕배양기에서 200 rpm으로 28°C에서 배양하였다.

Protoplast 형질전환

*S. griseus*와 *S. lividans* TK24의 protoplast는 Kieser 등의 방법[13]을 약간 변형해서 준비하였다. *Streptomyces* 균주들을 10 mL의 R2YE 배지에서 28°C에서 2일 배양한 후 250 mL baffled flask에서 0.5% glycine을 포함한 50 mL의 R2YE에 접종해서 2일 배양하였다. Lysozyme (1 mg/mL)을 포함한 20 mL의 P buffer (sucrose, 103 g; K₂SO₄, 0.25 g; MgCl₂·H₂O, 2.03 g; trace elements, 2 mL를 800 mL의 증류수에 녹여서 멸균한 후, 0.5% KH₂PO₄, 10 mL; 3.68% CaCl₂·H₂O, 100 mL; 5.73% TES (pH 7.2), 100 mL를 혼합)를 넣고 30°C에서 15-60분 정도 처리하면서 반응중간에 protoplast 형성 정도를 현미경으로 확인하였다. protoplast (10⁸⁻⁹ cells)에 plasmid DNA (1 µg)를 pipette으로 섞어준 다음 1분 후에 1 mL의 P buffer (25% PEG 1,000 포함)를 첨가하였다. 5 mL의 P buffer로 세척해 주고 다시 1 mL의 P buffer에 현탁한 후, 330 µL씩 분주해서 각 sample에 2.5 mL의 0.6% soft R2YE agar를 잘 섞은 후 R2YE 재배지에 균일하게 도말하였다. 28°C에서 24-48시간 배양 후에 thiostrepton을 최종 25 µg/mL 농도로 평판배지 위에 도말한 후 28°C에서 3-5일 동안 배양하여 형질전환체를 선별하였다. 한편, shuttle 벡터를 대장균에서 분리하는 방법은 Sambrook 등의 방법으로 수행하였다[19].

Skim milk plate를 이용한 protease 활성 비교

Skim milk 배지 (skim milk 0.5%, peptone 0.5%, glucose 0.1%, agar 1.5%)로 만든 평판 배지 위에 pWHM3 또는 pWHM3-TR1R2를 형질 전환 시킨 방선균주를 접종하고, 28°C에서 3-5일 배양한 후 protease에 의해 skim milk가 분해되어 나타난 투명환을 관찰하였다.

Table 1. Proteinase production media used in this study.

Medium	Ingredient	Amount (g/L)	Medium	Ingredient	Amounts (g/L)
NDSK [16]	NaNO ₃	4.28	C5L(GYE) [8]	glucose	12.5
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.23		yeast extract	5.0
	HEPES	4.77		CaCO ₃	8.0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12		NaCl	5.3
	trace element	2 mL		pH 7.2	
	skim milk	10			
	maltose	45.04			
Livid [11]	MOPS	1.49	R2YE [13]	sucrose	103
	Nutrient broth	1.0		K ₂ SO ₄	0.25
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.735		MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.12
	KH ₂ PO ₄	0.5		glucose	10
	K ₂ HPO ₄	0.5		casamino acid	0.1
	fructose	0.25		yeast extract	5
	skim milk	20		K ₂ HPO ₄ (0.5%)	10 mL
	pH 7.2			CaCl ₂ ·2H ₂ O (3.68%)	80 mL
				L-proline (20%)	15 mL
				TES (5.73%, pH 7.2)	100 mL
		trace element	2 mL		

세포배양액 준비 및 트립신 정제

각각의 배지에서 균주를 배양한 후, 원심분리(7,000 × g, 10 min)하여 균체를 제거하였다. 상층액을 25%~60% ammonium sulfate로 침전시키고(20,000 X g, 60 min), 침전물을 buffer A (10 mM sodium acetate [pH 8.0], 10% glycerol, 1 mM EDTA)에 용해하였다. 상기 단백질을 용액에 buffer A에서 투석시켜 염을 제거하고, 이를 buffer A로 평형화 시킨 CM column (HiPrep 16/10 Sepharose CM FF, Amersham Biosciences Inc.) 또는 SP column (HiPrep 16/10 Sepharose™ FF IEX Column, ID 1.6 × 10 cm, Amersham Biosciences Inc.)에 loading하였다. 단백질의 용출은 buffer A 100%부터 buffer B (buffer A + 0.5 M KCl) 100%까지 30분에 걸쳐 유속 2.5 mL/min로 gradient elution을 실시 하였다. 용출된 분획은 2.5 mL씩 분취하였고 트립신 역가 측정, 단백질 정량, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 분석 등에 사용하였다. 단백질의 정량은 Bradford 방법을 사용하였고, standard로는 bovine serum albumin (BSA)을 이용하였다[1].

BANP를 이용한 trypsin 활성 측정

Trypsin activity는 효소분해 작용에 의하여 N- α -benzoyl-DL-arginine- ρ -nitroanilide 에서 ρ -nitroanilide가 유리되는 것에 대한 흡광도를 측정함으로써 분석하였다[16]. 먼저 reaction buffer (50 mM Tris-Cl [pH 8.0], 20 mM CaCl₂) 와 BANP solution (50 mM BANP in dimethyl sulfoxide [DMSO])를 37°C water bath에서 5분 이상 방치한 후 사용하였다. 반응은 reaction buffer 890 μ L와 BANP solution 10 μ L를 넣은 다음, sample solution 100 μ L (negative control은 증류수 100 μ L 사용)를 첨가하여 빨리 혼합한 후 37°C water bath에서 30분 동안 반응시켰다. 30분 후 30% acetic acid (in dioxane) 400 μ L씩을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 측정 결과, 흡광도를 0.1만큼 증가시키는 효소의 활성을 1 unit로 정의하였다.

SDS-PAGE를 이용한 단백질의 분석

Sample 용액 30 μ L을 4×SDS loading buffer (20% SDS 1 mL, β -mercaptoethanol 0.5 mL, 1 M Tris-Cl [pH 6.8] 0.5 mL, glycerol 1 mL, 0.5% bromophenol blue 0.5 mL) 10 μ L와 혼합하여 끓는 물에 5분간 증탕하여 만든 단백질 sample을 15% SDS polyacrylamide gel에 30 μ L씩 loading하여 10 mA, 300 V의 전압으로 단백질을 전개하였다. 전기영동이 끝난 gel은 staining solution (Coomassie brilliant blue R 0.05%, methanol 50%, acetic acid 10%, 물 40%)에서 30분 동안 염색하고 destaining solution (methanol 10%, 물 90%)에서 30분 이상 탈색시켜 단백질의 band를 확인하였다[19].

결과 및 고찰

재조합 방선균에 적합한 트립신(SGT) 생산 배지 선정

이전의 연구에서 *sprT*와 두 개의 조절 유전자인 *sgtR1* 및 *sgtR2*를 동시에 갖고 있는 재조합 벡터 pWHM3-TR1R2를 *S. lividans* TK24 및 *S. griseus* IFO 13350에 도입하여 R2YE 배지에서 배양했을 때, *sprT* 유전자의 전사량이 가장 많고 trypsin의 생산성도 최대임을 보고한 바 있다[18]. 따라서 본 연구에서는 대조군으로는 pWHM3벡터의 형질전환체를 사용하고, 생산 균주로는 pWHM3-TR1R2가 도입된 형질전환체를 사용하여 트립신의 생산성을 더욱 증대시킬 수 있는 배지를 조사하였다.

우선 각 형질전환체가 protease 활성을 어느 정도 나타내는지를 상대적으로 비교하기 위해 skim milk hydrolysis

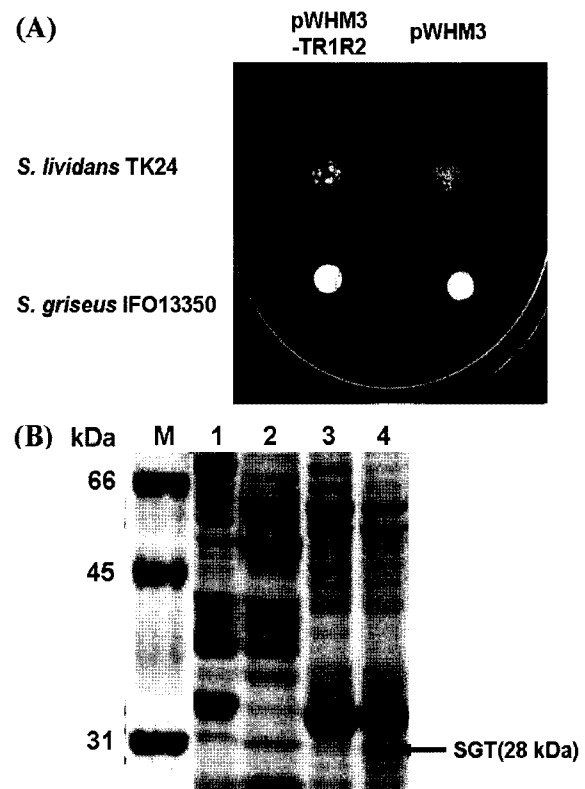


Fig. 1. Detection of expressed SGT by skim milk plate assay (A) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (B). (A) The extracellular protease activities of *S. lividans* TK24 and *S. griseus* IFO 13350 transformed with pWHM3-TR1R2 were compared on the agar plate containing 0.5% skim milk after 3 days of cultivation. The diameters of the clear skim milk hydrolyzed zones around the colony were bigger than those of control (pWHM3 transformants). (B) The extracellular protein in culture broth of transformants was precipitated with 100% ammonium sulfate at 5 days of cultivation in R2YE and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Lane M, molecular weight standards; lane 1, *S. lividans* TK24/pWHM3; lane 2, *S. lividans* TK24/pWHM3-TR1R2; lane 3, *S. griseus* IFO 13350/pWHM3; lane 4, *S. griseus* IFO 13350/pWHM3-TR1R2. The SGT protein with a molecular weight of 28 kDa is indicated by an arrow.

plate assay를 수행하였다. 방선균에서 분비하는 protease에 의해 배지의 단백질 성분인 skim milk가 분해되어 투명한 원을 형성하였다. 3일간 배양한 결과, 예상했던 것처럼 pWHM3 벡터만을 가진 균주보다 pWHM3-TR1R2의 형질 전환체가 더 큰 casein 분해 영역을 형성하였고, *S. lividans* TK24 균주보다는 *S. griseus* IFO13350 균주가 더 큰 분해 영역을 형성하였다(Fig. 1A). 이와 같은 결과는, BANP를 이용하여 배지에 생성된 트립신 활성을 직접 측정했던 이전의 결과와도 일치하고 있다[18]. 또한 각각의 형질전환체가 생산한 트립신은 SDS-PAGE 분석에서도 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 5일간 배양한 *S. lividans* TK24 시료의 경우 예상되는 28 kDa의 SGT 단백질이 pWHM3-TR1R2 형질전환체에서만 나타났으며, *S. griseus* IFO 13350의 경우 pWHM3-TR1R2 형질전환체가 대조균에 비해 더욱 많은 양의 SGT 단백질이 존재함을 보여주었다.

이와 같은 형질전환 방선균의 트립신 생산에 적합한 배지를 선별하기 위해 방선균배양에 널리 쓰이는 4가지 배지를 일차적으로 선정하여 생산성을 조사하였다. 각 배지의 조성은 Table 1과 같으며, 이들의 생산성을 이전의 보고에 사용했던 R2YE 배지와 비교하였다(Fig. 2). 각각의 배지에서 7일간 방선균주를 배양하여 배양일에 따른 트립신 역가를 측정 한 결과, *S. lividans* TK24/pWHM3-TR1R2의 경우 배양 5일을 기준으로 R2YE에서 가장 높은 생산성(0.74 unit/mL)을 나타냈고, C5/L (0.66 unit/mL), Livid (0.08 unit/mL), NDSK (0.06 unit/mL) 순으로 나타났다. *S. griseus* IFO 13350/pWHM3-TR1R2의 경우에는 전반적으로 배양 7일에 트립신 활성이 가장 높았으며, C5/L (1.518 unit/mL), R2YE (1.284 unit/mL), NDSK (0.932 unit/mL), Livid (0.295 unit/mL) 순으로 나타났다. 따라서, 효소 활성은 *S. lividans* TK24보다는 *S. griseus* IFO 13350 균주가 실험에 사용한 모든 배지에서 월등하게 높았으며, 최대 활성은 *S. griseus* IFO 13350 균주를 C5/L(GYE) 배지에서 배양했을 때 나타

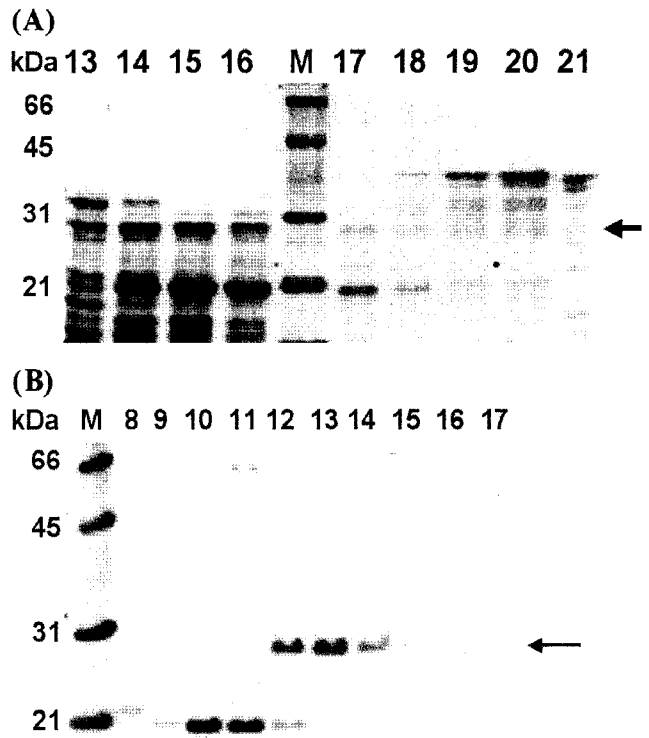


Fig. 3. Purification of SGT from *S. griseus* IFO 13350 transformed with pWHM3-TR1R2. The transformant was cultured in 2 L of C5/L broth in a 3-L jar fermenter at 28°C with agitation at 200 rpm for 7 days. The culture broth after centrifugation was used for SGT purification by ammonium sulfate fractionation, CM-sepharose, and SP-sepharose column chromatographies. (A) SDS-PAGE analysis of the samples from CM-sepharose column chromatography. Active fractions (number 14-16) were collected for further purification. (B) SDS-PAGE analysis of the samples from SP-sepharose column chromatography. Active fractions (number 13-15) were pooled and stored for measuring trypsin activity. Lane M, molecular weight standards; lane 13-21 in (A) and lane 8-17 in (B), fraction numbers from each chromatography. The SGT protein is depicted by a thick arrow.

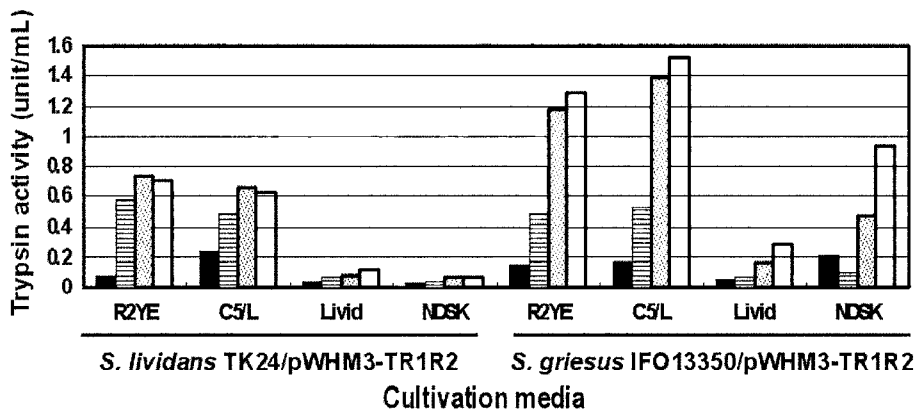


Fig. 2. Comparison of SGT activity produced in various media by *S. griseus* IFO 13350 (right) and *S. lividans* TK24 (left) transformed with pWHM3-TR1R2. The amount of enzyme produced was expressed in units/mL of cultural filtrate depending on cultivation time because of insoluble ingredient in production media. Black bars; 1 day of cultivation, dashed bars; 3 days of cultivation, dotted bars; 5 days of cultivation, white bars; 7 days of cultivation.

났다. 이에 따라 추후의 트립신 정제 실험은 *S. griseus* IFO 13350 균주를 C5/L 배지에서 배양하여 진행하였다.

재조합 트립신의 정제

S. griseus IFO 13350/pWHM3-TR1R2를 C5/L 배지에서 7일간 배양한 배양액 2 L를 25%~60% ammonium sulfate로 침전시키고, 침전물을 buffer A에 용해하였다. 상기 단백질을 용액을 buffer A로 평형화 시킨 weak cation exchanger인 CM-Sepharose™ Fast Flow column에 loading하고, column에 결합한 단백질을 0 M-0.5 M KCl로 2.5 mL/min의 유속으로 gradient elution을 실시 하였다. 이와 같은 FPLC 결과, 3개의 main peak가 관찰되었고, 그 중 3번째 peak에 해당하는 14, 15, 16번 fraction에서 높은 트립신 역가를 보였다(Fig. 3A). 그러나, SDS-PAGE 분석 결과, 여러 종류의 단백질 밴드가 섞여있는 것으로 나타났기 때문에, 고순도의 트립신을 생산하기 위해서 strong cation exchanger인 SP-sepharose로 FPLC를 수행하였다.

상기 단백질 용액(14, 15, 16번 분획)을 buffer A에 투석시켜 염을 제거하였고, 이를 buffer A로 평형화 시킨 SP-Sepharose™ Fast Flow column에 loading하였다. SP column을 20배의 buffer A로 충분히 씻고 난 후, buffer A 100%부터 buffer B (buffer A + 0.5M KCl) 100%까지 유속 2.5 mL/min로 단백질을 gradient elution을 실시 하였고, 2.5 mL씩 분취하였다. FPLC 결과, 단일 peak를 관찰할 수 있었고, 그 peak에 해당하는 fraction (13, 14, 15)에서 트립신 역가가 높게 나타났다. SDS-PAGE 결과, 13, 14, 15번 fraction에서 깨끗한 트립신 밴드를 확인하였다(Fig. 3B). 따라서, CM-sepharose 및 SP-sepharose column을 연속적으로 사용하여 발현된 트립신을 간단하게 고순도로 정제할 수 있었다.

방선균 배양액으로부터 트립신을 정제하는 각 정제단계별 수율을 Table 2에 요약하였다. 최종 purification fold는 3.27 배였으며, 순수정제된 트립신의 specific activity는 69,252 unit/mg으로 조사되었다. 대조군으로 사용한 Sigma사에서 시판하고 있는 트립신(T1426, Trypsin from bovine pancreas)은 13,500 unit/mg으로, 순수정제한 방선균 트립신은 이보다 5배 이상의 활성을 가진 것으로 나타났다. 이는 효소 활성면에서 방선균 트립신이 동물체장에서 추출한 트립신보다 월등함을 시사하고 있다.

이전의 연구에서 트립신 유전자만을 도입한 *S. lividans* TK24/pWHM3-T 형질전환체로부터 트립신을 정제한 바 있다 [17]. 이전의 트립신 정제 단계는 supernatant를 25%-55% ammonium sulfate로 침전시킨 다음, CM-sepharose 및 Mono-S column chromatography를 실시하고 최종적으로 Superose 12 HR 10/30 gel permeation column chromatography를 실시하는 보다 복잡한 정제과정을 사용하였다. 본 연구에서는 *S. lividans* TK24/pWHM3-T보다 월등히 생산성이 높은 *S. griseus* IFO 13350/pWHM3-TR1R2 형질전환체로부터 트립신 발현을 극대화 할 수 있는 배지 조건을 수립하였고, 배양액으로부터 트립신을 정제하는 보다 개선한 방법을 수립하였다. 그러나, 최종 정제산물의 수율이 정제 전 배양액의 총 트립신 활성의 1.4% 밖에 되지 않아, 트립신의 정제 회수율이 극히 낮은 걸로 조사되었다. 배양액을 농축하기 위한 ammonium sulfate precipitation 단계에서 대부분의 loss가 발생하였는데, 추후 이를 개선하는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

Streptomyces griseus trypsin (SGT)을 코딩하는 *sprT* 유전자와 그 하류에 존재하는 두 개의 조절 유전자 *sgtR1* 및 *sgtR2*를 동시에 갖고 있는 재조합 벡터 pWHM3-TR1R2를 *S. lividans* TK24 및 *S. griseus* IFO 13350에 도입하여, 트립신의 생산성을 더욱 증대시킬 수 있는 배지를 조사하였다. *S. lividans* TK24/pWHM3-TR1R2의 경우 배양 5일을 기준으로 R2YE에서 가장 높은 생산성(0.74 unit/mL)을 나타냈고, C5/L (0.66 unit/mL), Livid (0.08 unit/mL), NDSK (0.06 unit/mL) 순으로 나타났다. *S. griseus* IFO 13350/pWHM3-TR1R2의 경우에는 전반적으로 배양 7일에 트립신 활성이 가장 높았으며, C5/L (1.518 unit/mL), R2YE (1.284 unit/mL), NDSK (0.932 unit/mL), Livid (0.295 unit/mL) 순으로 나타났다. *S. griseus* IFO 13350/pWHM3-TR1R2를 C5/L 배지에서 7일간 배양한 배양액으로부터 25%~60% ammonium sulfate 침전, CM-sepharose 및 SP-sepharose column chromatography를 통하여 트립신을 고순도로 정제할 수 있었다. 최종 purification fold는 6.5배, 순수정제된 트립신의 specific activity는 69,252 unit/mg, 회수율은 1.4%이었다.

Table 2. Summary of purification steps of SGT from *Streptomyces griseus* IFO 13350 carrying pWHM3-TR1R2.

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Supernatant	811	8,704,260	10,732	1	100
Ammonium sulfate precipitation (25-55%)	20	676,998	33,849	3.2	7.8
CM-Sepharose	5.3	242,485	45,752	4.3	2.8
SP-Sepharose	1.8	124,654	69,252	6.5	1.4

감사의 글

본 논문은 2006년도 서울대학 학술연구비에 의해 연구되었습니다. 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chi, W.-J., J.-M. Kim, S.-S. Choi, D.-K. Kang, and S.-K. Hong. 2001. Overexpression of SGPA and SGT induces morphological changes in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 1077-1086.
- Chi, W.-J., M.-S. Kim, J.-H. Kim, D.-K. Kang, and S.-K. Hong. 2005. Molecular cloning and analysis of the genes in the vicinity of *Streptomyces griseus* trypsin (SGT) gene from *Streptomyces griseus* ATCC 10137. *Kor. J. Microbiol.* **41**: 255-261.
- Chi, W.-J., Y.-H. Kim, J.-H. Kim, D.-K. Kang, S.-S. Kang, J.-W. Suh, and S.-K. Hong. 2003. *Streptomyces griseus* Trypsin (SGT) has gelatinase activity and its proteolytic activity is enhanced by manganese. *J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 289-294.
- Choi, S.-S., J. H. Kim, J.-H. Kim, D.-K. Kang, S.-S. Kang, and S.-K. Hong. Functional analysis of *sprD* gene encoding *Streptomyces griseus* protease D (SGPD) in *Streptomyces griseus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 312-317
- Choi, E.-Y., E.-A. Oh, J.-H. Kim, D.-K. Kang and S.-K. Hong. 2007. Distinct regulation of the *sprC* gene encoding *Streptomyces griseus* protease C from other chymotrypsin genes in *Streptomyces griseus* IFO13350. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 81-88
- 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**: 305-313.
- Gregory, D. G., D. E. Ordaz, and W. R. Strohl. 1989. Overexpression of extracellular protease activity by *Streptomyces* C5-A13 in fed-batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 119-124.
- Hong, S.-K., A. Matsumoto, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1993. Effects of protein kinase inhibitors on in vitro protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 347-354.
- Horinouchi, S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci.* **7**: 2045-2057.
- Jayant, S. A. and W. R. Strohl. 1993. Purification and properties of an extracellular aminopeptidase from *Streptomyces lividans* 1326. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 417-424.
- Kato, J., W.-J. Chi, Y. Ohnishi, S.-K. Hong, and S. Horinouchi. 2005. Transcriptional control by a-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**: 286-295.
- Kieser, H., M. J. Bibb, M. J. Buttner, F. K. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Kim, J.C., S.H. Cha, S.T. Jeong, S.K. Oh, and S.M. Byun. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 707-713.
- Kim, Y.-H., S.-S. Choi, D.-K. Kang, S.-S. Kang, B. C. Jeong and S.-K. Hong. 2004. Overexpression of *sprA* and *sprB* genes is tightly regulated in *Streptomyces griseus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1350-1355.
- 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.
- Koo, B.J., K.H. Bae, S.M. Byun, and S.-K. Hong. 1998. Purification and characterization of *Streptomyces griseus* trypsin overexpressed in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 333-340.
- Oh, E. A., M.-S. Kim, W.-J. Chi, J.-H. Kim and S.-K. Hong. 2007. Characterization of the *sgtR1* and *sgtR2* genes and their role in regulating expression of the *sprT* gene encoding *Streptomyces griseus* trypsin. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**: 75-82.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tomono A., Y. Tasi, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi. 2005. Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**: 6341-6353.
- Trop, M. and Y. Birk. 1970. The specificity of proteases from *Streptomyces griseus* (Pronase). *J. Biochem.* **116**: 19-25.
- Yang, H.-Y., S.-S. Choi, W.-J. Chi, J.-H. Kim, D.-K. Kang, J. Chun, S.-S. Kang, and S.-K. Hong. 2005. Identification of the *sprU* gene encoding an additional *sprT* homologous trypsin-type protease in *Streptomyces griseus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1125-1129.

(Received Jan. 14, 2008/Accepted Feb. 15, 2008)