

高温蛋白酶生产菌 BY25 不同培养基下产酶差异研究^①

朱 泓^{1,2,3}, 王—明¹, 林先贵^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008 ;

2 江苏省中科院植物研究所, 南京 210016 ; 3 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要：枯草芽孢杆菌是一种广泛存在于土壤中的产酶细菌，在环境领域也具有广阔的应用前景。本文以一株产高温蛋白酶枯草芽孢杆菌 BY25 为研究对象，比较添加不同有机氮源的产酶培养基进行发酵时，各处理中枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶的组成和产量的差异；并对不同培养基发酵液的粗酶液组分进行酶学性质分析和明胶酶谱检测。结果表明，枯草芽孢杆菌 BY25 在不同培养基条件下会出现差异性产酶，产酶培养基中添加麸皮有利于中性金属蛋白酶(Npr)的产生，而添加豆饼粉则有利于枯草菌素(Apr)的产生。

关键词：明胶酶谱；产酶培养基；酶学性质；丝氨酸蛋白酶

中图分类号：Q939.96

微生物蛋白酶特别是胞外蛋白酶易大规模发酵制备，广泛应用于食品、洗涤、纺织、丝绸、皮革、医药、酿造、化工、环保等行业^[1-3]。迄今为止，全球每年的微生物蛋白酶产量约占所有工业用酶产量的 40%^[4]，其中芽孢杆菌生产的蛋白酶应用最为广泛^[5-6]。枯草芽孢杆菌是一种重要的蛋白酶生产菌，其遗传背景清楚、生长迅速、生物安全性好，在饲料添加剂、污水处理、生物农药等环保制剂领域有广阔的发展前景^[7-9]。在有机氮源存在的条件下，该菌能在平台期向胞外分泌多种蛋白酶^[10]；主要的蛋白酶组分包括：在中性及碱性条件下均有较高活力的丝氨酸蛋白酶枯草菌素(Apr)和中性金属蛋白酶(Npr)^[11]，以及少量的胞外金属蛋白酶 Epr, Mpr, 细胞壁相关丝氨酸蛋白酶 Wpr, 胞外丝氨酸蛋白酶 Bpr, Vpr, HtrA, YytA 等。枯草芽孢杆菌中性金属蛋白酶和枯草菌素由于其性质的不同被广泛应用在不同的领域。而研究表明^[12-17]，这两种蛋白酶受到相同调控因子(degU 及 spo0A)的调控，因此在获得其中一种蛋白酶的时候需要通过纯化步骤去除另一种，费时费力。如能使枯草杆菌只高效分泌其中一种蛋白酶组分，则可以明显降低生产成本，提高该菌的应用价值。本文以一株产高温蛋白酶枯草杆菌 BY25 为研究对象，比较添加不同有机氮源的产酶培养基进行发酵时，各处理

中枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶的组成和产量的差异；并对不同培养基发酵液的粗酶液组分进行酶学性质分析和明胶酶谱检测，旨在得到该菌差异性产酶的分析证据，为枯草芽孢杆菌蛋白酶制剂的开发和产酶菌株的利用提供理论依据和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 BY25(CGMCC No.4439)，由本实验室彭素萍硕士从河南农田土样中分离获得的一株产高温蛋白酶菌株，是中等嗜热菌^[18]。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 10，pH 7.0；蒸馏水 1 L。

F5M 培养基^[19](g/L)：蛋白胨 5，酵母膏 1，NaCl₂，MgSO₄·7H₂O 0.5，K₂HPO₄ 0.01，FeSO₄·7H₂O 0.01，pH 8.0；蒸馏水 1 L。

J 培养基(g/L)^[20]：麸皮 30，豆饼粉 30，葡萄糖 60，Na₂HPO₄ 4，CaCl₂ 0.2，pH 8.0；蒸馏水 1 L。

YH 培养基 (g/L)：豆饼粉 60，葡萄糖 60，Na₂HPO₄ 4，CaCl₂ 0.5，pH 8.0；蒸馏水 1 L。

1.3 蛋白酶活力的测定

蛋白酶活力的测定采用福林酚显色法。将培养液

①基金项目：中科院知识创新项目(KSCX2-EW-N-08)、948 工程项目(2011-G25)和江苏省产学研联合创新资金项目(BY2011166)资助。

* 通讯作者(xglin@issas.ac.cn)

作者简介：朱泓(1982—)，男，江苏南京人，博士研究生，主要从事环境微生物学方向研究。E-mail: gogen@yeah.net

于 10 000 r/min 离心取上清,以适当 pH 缓冲液稀释后,取 200 μ l 加入 2 ml 离心管中,55 $^{\circ}$ C 水浴预热 1 min,加入 200 μ l 的 2% 酪素溶液,55 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 min,迅速加入 600 μ l 的 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应,室温静置 15 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清 500 μ l,置于试管中,加入 2 500 μ l 的 0.4 mol/L 碳酸钠溶液及 500 μ l 福林酚工作液,混匀,40 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后,测定 680 nm 吸光度。对照在加入酪素溶液前先加入三氯乙酸,其余条件相同。同时制作酪氨酸标准曲线,将每分钟水解酪素释放 1 μ g 酪氨酸的酶量定义为一个蛋白酶活力单位。

1.4 不同种类培养基对高温蛋白酶生产的诱导

将 BY25 接种于 LB 中 40 $^{\circ}$ C 培养 12 h 作为接种液。

将 BY25 转接于 LB 培养基、F5M 培养基、J 培养基、YH 发酵培养基中,30 $^{\circ}$ C、180 r/min,培养 48 h,55 $^{\circ}$ C 测定蛋白酶活力。

1.5 粗酶液酶学性质研究

1.5.1 温度对粗酶液活力的影响 将粗酶液用 pH 7.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释到合适浓度,加入相应 pH 的 2% 酪素溶液分别于 35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 测定蛋白酶活力。

1.5.2 pH 对粗酶液活力的影响 将粗酶液分别用 pH 2~12 的缓冲液稀释到合适浓度,加入相应 pH 的 2% 酪素溶液于 55 $^{\circ}$ C 测定蛋白酶活力。

1.5.3 丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)对粗酶液活力的影响 粗酶液分别加入 5、10 mmol/L PMSF 后,室温孵育 30 min,用 pH 7.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释,再加入相同 pH 的 2% 酪素溶液,分别于 55 $^{\circ}$ C 测定蛋白酶活力。

1.5.4 钙离子螯合剂乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)对粗酶液活力的影响 粗酶液中分别加入 1、5 mmol/L EGTA 后,用 pH 7.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释,加入相同 pH 的 2% 酪素溶液分别于 55 $^{\circ}$ C 测定蛋白酶活力。

1.6 粗酶液明胶酶谱检测

等量的粗酶液样品载入含明胶的聚丙烯酰胺凝胶进行明胶酶谱检测,该方法基于 Heussen 和 Dowdle^[21]建立的明胶酶谱方案,并根据粗酶液的特性加以改进。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对 BY25 产酶的影响

在相同的培养条件下,考察 J 和 YH 培养基对 BY25 产酶的影响。J 培养基的氮源组成为豆饼粉与麸皮混合物(1:1),YH 培养基是在 J 培养基的基础上去除麸皮,并将豆饼粉添加量增加为 J 培养基的 2 倍。实验结果如图 1 所示。我们将粗酶液直接测定得到的蛋白酶活力定义为培养基粗酶液活力,同时将粗酶液活力除以粗酶液的总蛋白质含量得到的数值定义为粗酶液比活力。YH 培养基粗酶液活力达到 4 043 U/ml,比 J 培养基提高 65%;比活力为 2 643 U/mg,较 J 培养基提高 42.6%;同时,YH 培养基粗酶液蛋白浓度达到 1 530 μ g/ml,与 J 培养基相比仅增加了 16%。可以发现:与 J 培养基相比,YH 培养基既提高了粗酶液的活力,又增加了粗酶液的比活力;同时粗酶液酶活的增加量明显高于蛋白含量增加量,表明在不同的产酶培养基中,BY25 粗酶液活力的差异不仅仅表现在酶蛋白产量,同时酶蛋白种类也可能有所不同。

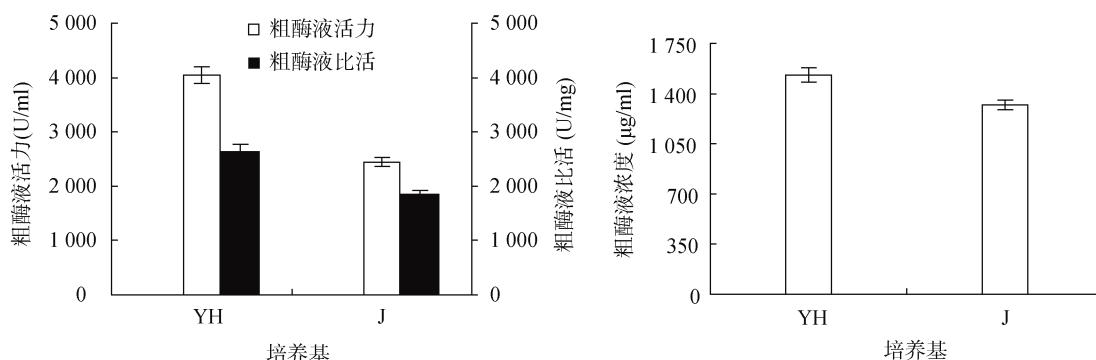


图 1 不同培养基中蛋白酶酶活
Fig. 1 Effects of different media on enzyme production

2.2 温度和 pH 对粗酶液活力的影响

如图 2 所示,两种粗酶液在不同温度时的变化趋势基本一致,并均在 55 $^{\circ}$ C 时活力最高,65 $^{\circ}$ C 时仍维持较高活力。YH 培养基和 J 培养基粗酶液 65 $^{\circ}$ C 蛋

白酶活力分别为 55 $^{\circ}$ C 时的 85% 与 79%,较 50 $^{\circ}$ C 时分别提高 73% 与 86%,表明两种培养基粗酶液均为高温蛋白酶。pH 对酶活力的影响如图 2 所示,两种粗酶液的酶活力都是从 pH 5.0 开始活性逐渐增高,

在 pH 7.0 达到顶峰,并在 pH 6.0~8.0 之间均有较高活力;表明粗酶液中主要成分是中性蛋白酶。(当 pH 偏碱后,YH 培养基粗酶液活力保持稳定,pH 8.0 时酶活力为 pH 7.0 时的 99%,pH 9.0 时酶活力为 pH 7.0 时的 88%,且在高碱性环境(pH 10.0~11.0)依然能保持较高的活性(为 pH 7.0 时的 66% 与 61.5%)。而 J 培养基粗酶液在碱性条件下活力下降明显,pH 8.0 时酶活力仍保持稳定,为 pH 7.0 时的 91%,pH 9.0 时酶活力则迅速下降,为 pH 7.0 时的 59%,且在高碱性环境(pH 10.0~11.0)仅能残留 pH 7.0 时蛋白酶活力的 31% 与 28%)。该结果表明 YH 培养基粗酶液和 J 培养基粗酶液中均含有大量的高温蛋白酶,但两

种粗酶液的高温蛋白酶组成并不相同。高温中性金属蛋白酶是一类在中性条件下有最优反应活力的蛋白酶,其 pH 稳定范围较窄。而枯草菌素(高温中性丝氨酸蛋白酶)则是一类在中性和碱性条件下均能表现出高活力的蛋白酶。YH 培养基粗酶液与 J 培养基相比在高碱性条件下稳定性明显提高,表明 YH 培养基粗酶液中含有较多在中性和碱性环境下表现出高活性的枯草菌素。而 J 培养基粗酶液则具有较窄的 pH 稳定范围,彭素萍等^[18]对 J 培养基的研究结果表明,J 培养基粗酶液中高温中性金属蛋白酶含量较高,活力受金属离子螯合剂 EDTA 强烈抑制,在 10 mmol/L 的 EDTA 溶液中室温孵育 30 min,酶活力仅剩 5.2%。

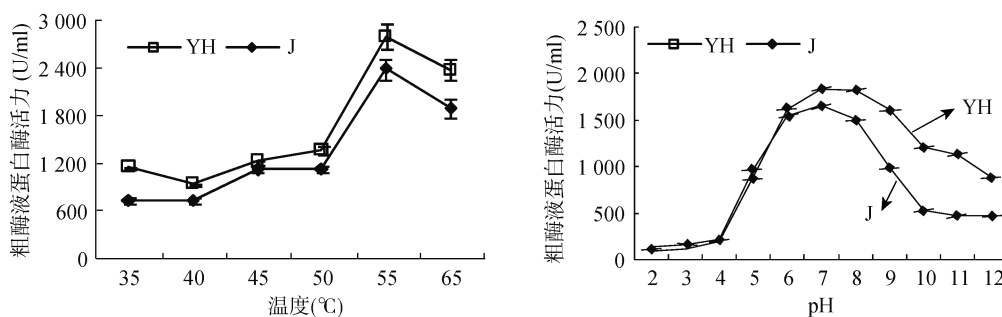


图2 温度和 pH 对粗酶液酶活力的影响

Fig. 2 Effects of temperature and pH on protease activity

2.3 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对粗酶液活性的影响

为了确认两种培养基粗酶液中枯草菌素含量的差异,进一步开展了酶学性质研究。将丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 按不同浓度添加到反应体系中室温培育 30 min,测定两种粗酶液的活力变化。结果如图 3 所示,随着 PMSF 浓度的增加,YH 培养基粗酶液的活力明显下降,当 PMSF 添加量达 10 mmol/L 时,J 培养基粗酶液活力残留了 33%,而 YH 培养基粗酶液活力只残留了 19%。该结果也表明了 YH 培养基粗酶液中蛋白酶组分枯草菌素占比较大。

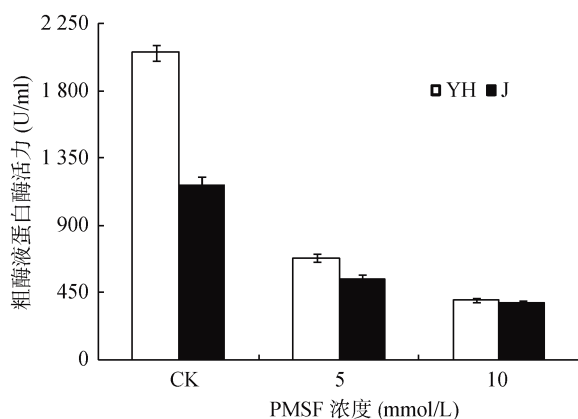


图3 PMSF 对 BY25 粗酶液活力的影响

Fig. 3 Effects of PMSF on protease activity

2.4 钙离子专性螯合剂 EGTA 对粗酶液活性的影响

枯草菌素蛋白分子上有数个钙离子结合位点,能结合钙离子稳定蛋白结构^[22-25]。EGTA 是钙离子专性螯合剂,能够螯合于枯草菌素蛋白结合的钙离子,进而导致酶分子稳定性下降,在高温条件下催化活力降低。将 EGTA 按不同浓度添加到反应体系中,考察粗酶液活力变化。如图 4 所示,添加 EGTA 后 YH 培养基粗酶液的活力明显下降,当 EGTA 添加量达 5 mmol/L 时,J 培养基粗酶液活力残留了 61%,而 YH 培养

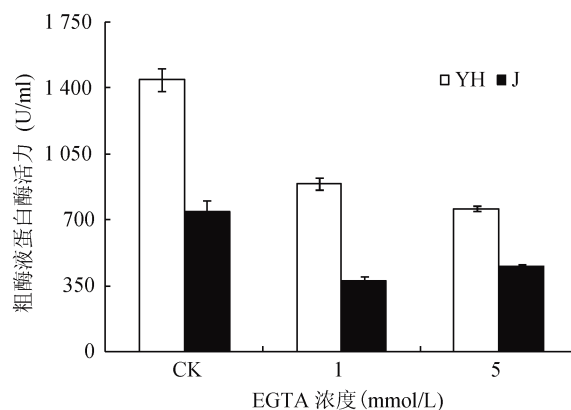


图4 EGTA 对 BY25 粗酶液活力的影响

Fig. 4 Effects of EGTA on protease activity

基粗酶液活力只残留了 52%。该实验结果显示 EGTA 对 YH 培养基粗酶液的抑制作用明显弱于 PMSF, 其原因在于 EGTA 是通过螯合钙离子降低了枯草菌素的稳定性, 间接降低了酶活力, 而 PMSF 则通过直接和枯草菌素分子结合对酶分子的催化能力造成不可逆抑制。同时, 对比两种粗酶液活力残留, 同样表明 YH 粗酶液中枯草菌素占比较高。

2.5 粗酶液在明胶酶谱中的差异

通过酶学性质研究, 基本确认 YH 培养基粗酶液中枯草菌素含量高于 J 培养基粗酶液。明胶酶谱是一种将反应底物明胶加入丙烯酰胺凝胶后, 通过蛋白电泳直接鉴定蛋白酶的电泳方法。该方法经 Heussen 和 Dowdle^[21]改进后, 通过加入十二烷基磺酸钠(SDS)处理样品, 使得同时鉴定蛋白酶的活性和分子量大小成为可能。基于该方法对 3 种培养基粗酶液进行酶谱鉴定, 将酶谱结果导入 Bio-rad Quantity one 软件进行分析。如图 5 所示, 酶谱图中蓝色、绿色、红色代表蛋白酶活性从低到高的变化。以高温蛋白酶培养基 F5M 发酵 BY25 得到的粗酶液作为实验对照, 等量的 3 种粗酶液载入点样口电泳后, 仅有 J 培养基粗酶液样品在 35 KD 位置(Npr 分子量大小)有明显蛋白酶条带, 表明 J 培养基可以促进 BY25 中 Npr 的大量生成。同时, J 和 YH 培养基粗酶液样品 45 ~ 66 KD 的 3 条蛋白酶(推测为 51 KD Wpr、58 KD Epr 和 68 KD Vpr)条带活力略高于 F5M。该结果表明在 YH 和 J 培养基中菌体活力要比 F5M 培养基中高, 因为这 3 种蛋白酶都和芽孢杆菌的不同生命活动密切相关, 其中 51 KD Wpr 与细胞壁合成有关, 而 58 KD Epr 和 68 KD Vpr 被认为促进了革兰氏阳性细菌群体感应分子 CSF 的成熟^[26]。除了泳道中的蛋白酶外, 这 3 种培养基粗酶液在分离胶顶端均有明显的活性区域, 该活性区域由枯草菌素形成^[27]。已经确认该现象是因为枯草菌

素的高等电点引起, 而并非是和分离胶顶端底物的结合, 在基于未煮沸 SDS-PAGE 的明胶酶谱中, 高等电点的枯草菌素分子无法通过电泳进入分离胶区域, 只能停滞在分离胶顶端, 并在酶反应过程中形成活性斑点, 该区域活性斑点的亮度和大小与样品中枯草菌素活力呈正比^[28-30]。由图 5 可发现, YH 培养基粗酶液在分离胶顶端的明亮区域范围最大, 亮度最高。该结果表明 YH 培养基中确实含有较多的枯草菌素。

3 结论

枯草芽孢杆菌作为一种重要的工业微生物, 在添加有机氮底物诱导的情况下会在对数期结束后向胞外大量分泌蛋白酶^[31-32]。其中主要的蛋白酶组分为中性金属蛋白酶(Npr)和在中性及碱性条件下均有较高活力的丝氨酸蛋白酶枯草菌素(Apr), 除以上两种外其余的少量枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶为胞外金属蛋白酶 Epr、Mpr, 细胞壁相关丝氨酸蛋白酶 Wpr, 胞外丝氨酸蛋白酶 Bpr、Vpr、HtrA、YytA 等。除枯草芽孢杆菌外, 分泌多种蛋白酶的现象广泛存在于芽孢杆菌间, 如在摩加夫芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*) A 21^[33]及低云芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) MIR 29 发酵粗酶液中均发现了两条蛋白酶^[34]。

Apr 和 Npr 分别适用于不同领域的工业生产。本研究表明通过在培养基中添加不同有机氮源成分能够调节两种主要胞外蛋白酶的产生比例。综合酶学性质分析及酶谱检测, 我们发现向高温蛋白酶生产菌株 BY25 培养基中添加麸皮促进中性金属蛋白酶的产生; 去除麸皮, 添加豆饼粉则能降低粗酶液中金属蛋白酶的活性, 而同时促进枯草菌素的产生并最终提高粗酶液的蛋白酶活力。该结果不仅表明通过简单的培养基优化手段能够使枯草芽孢杆菌分泌的主要胞外蛋白酶的比例发生明显改变, 同时显示在培养条件下枯草芽孢杆菌分泌的不同蛋白酶的活性可根据环境的改变而变化。

参考文献:

- [1] Outtrup H, Boyce COL. Microbial proteinases and biotechnology[A] // Fogarty WM, Kelly CT. Microbial Enzymes and Biotechnology[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1990: 227-254
- [2] Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint[J]. Biotechnology Advances, 1999, 17(7): 561-594
- [3] Kalisz MH. Microbial proteinases[J]. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 1988, 36: 17-55

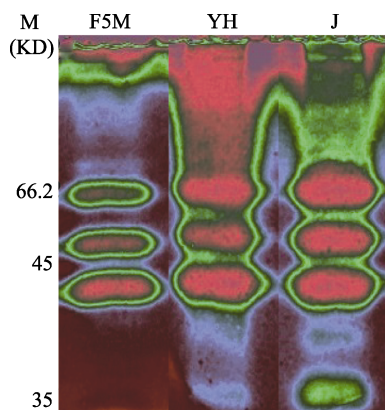


图 5 不同培养基粗酶液明胶酶谱
Fig. 5 Gelatin zymographies of different protease solutions

- [4] Sana B, Ghosh D, Saha M, Mukherjee J. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-proteobacterium isolated from the marine environment of the sundarbans[J]. *Process Biochem.*, 2006, 41(1): 208–215
- [5] Mehrota S, Pandey P, Gaur R, Darmwal N. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate[J]. *Bioresour. Technol.*, 1999, 67(2): 201–203
- [6] Beg Q, Gupta R. Purification and characterization of an oxidation stable thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*[J]. *Enzyme Microbial. Technol.*, 2003, 32(2): 294–304
- [7] 郭兴华. 益生菌-基础与应用[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002: 27–32
- [8] 汤保贵, 徐中文, 张金燕, 唐志坚, 张璐, 孙建华. 枯草芽孢杆菌的培养条件及对水质的净化作用[J]. *淡水渔业*, 2007, 37(3): 45–48
- [9] 刘永锋, 陈志谊, 张杰, 刘邮洲, 周明国. 枯草芽孢杆菌 Bs-916 胞外抗菌蛋白质的性质[J]. *江苏农业学报*, 2005, 21(4): 288–293
- [10] Fisher SH. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: Vive la difference[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(2): 223–232
- [11] Priest FG. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*[J]. *Bacteriol. Rev.*, 1977, 41(3): 711–753
- [12] Tokunaga T, Rashid MH, Kuroda A, Sekiguchi J. Effect of degS-degU mutations on the expression of sigD, encoding an alternative sigma factor and autolysin operon of *Bacillus subtilis*[J]. *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 5 177–5 180
- [13] Dod B, Balassa G. Spore control (sco) mutations of *Bacillus subtilis*. Regulation of extracellular protease synthesis in the spore control mutations scoC[J]. *Mol. Gen. Genet.*, 1978, 163: 57–63
- [14] Higerd TB, Hoch JA, Spizizen J. Hyperprotease-producing mutants of *Bacillus subtilis*[J]. *J. Bacteriol.*, 1972, 112: 1 026–1 028
- [15] Msadek T, Kunst F, Rapoport G. A signal transduction network in *Bacillus subtilis* includes the DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems[A] // Hoch JA, Silhavy TJ. Two-component Signal Transduction[M]. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995: 447–471
- [16] Ogura M, Tanaka T. Transcription of *Bacillus subtilis* degR is σ^D -dependent and suppressed by multicopy proB through σ^D [J]. *J. Bacteriol.*, 1996, 178: 216–222
- [17] Perego M, Hoch JA. Sequence analysis and regulation of the hpr locus, a regulatory gene for protease production and sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170: 2 560–2 567
- [18] 彭素萍, 林先贵, 王一明. 一株产高温蛋白酶耐热菌 BY25 的产酶条件与酶学性质研究[J]. *土壤*, 2010, 42(3): 410–414
- [19] 戴玄, 唐兵, 陈向东, 彭珍荣. 产高温蛋白酶微生物菌种资源的研究[J]. *微生物学杂志*, 1997, 17(3): 25–29
- [20] 舒丹, 李宏, 严建华, 陈金瑞, 李晖, 刘成君. 高温芽孢杆菌碱性蛋白酶发酵条件及酶学性质研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2004, 41(4): 856–860
- [21] Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates[J]. *Anal. Biochem.*, 1980, 102: 196–202
- [22] Voordouw G, Milo C, Roche RS. Role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. Separation of intrinsic and calcium ion contributions to the kinetic thermal stability[J]. *Biochemistry*, 1976, 15(17): 3 716–3 724
- [23] Mitchinson C, Wells JA. Protein engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN'[J]. *Biochemistry*, 1989, 28(11): 4 807–4 815
- [24] Kidd RD, Yennawar HP, Sears P, Wong CH, Farber GK. A weak calcium binding site in subtilisin BPN' has a dramatic effect on protein stability[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(7): 1 645–1 650
- [25] Alexander PA, Ruan B, Strausberg SL, Bryan PN. Stabilizing mutations and calcium-dependent stability of subtilisin[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(35): 10 640–10 644
- [26] Sara LG, Alek ND, Kym FF, Beth AL. Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(5): 1 321–1 333
- [27] Chung DM, Kim KE, Ahn KH, Park CS, Kim DH, Koh HB, Chun HK, Yoon BD, Kim HJ, Kim MS, Choi NS. Silver-stained fibrin zymography: Separation of proteases and activity detection using a single substrate-containing gel[J]. *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33(8): 1 663–1 666
- [28] Choi NS, Chung DM, Ryu CH, Yoon KS, Maeng PJ, Kim SH. Identification of three extracellular proteases from *Bacillus subtilis* KCTC 3014[J]. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 16(3): 457–464
- [29] Choi NS, Yoo KH, Yoon KS, Chang KT, Maeng PJ, Kim SH. Identification of recombinant subtilisins[J]. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 15(1): 35–39
- [30] Choi NS, Ju SK, Lee EY, Yoon KS, Chang KT, Maeng PJ, Kim SH. Miniscale identification and characterization of subtilisins from *Bacillus* sp. strains[J]. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 15(3): 537–543
- [31] Wilson ED. Studies in bacterial proteases I. The relation of protease production to the culture medium[J]. *Journal of Bacteriology*, 1930, 20(1): 41–59
- [32] Semets EV, Glenn AR, May BK, Elliott WH. Accumulation of messenger ribonucleic acid specific for extracellular protease in *Bacillus subtilis* 168[J]. *Journal of Bacteriology*, 1973, 116(2): 531–534
- [33] Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, Hmidet N, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive[J]. *Bioresour. Technol.*, 2009, 100(13): 3 366–3 373
- [34] Ferrero MA, Castro GR, Abate CM, Baigorí MD, Siñeriz F. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR29: Isolation, production and characterization[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45(3): 327–332

Differences in Enzyme Production Induced by Fermentation Media of a Moderate Thermophilic Strain *Bacillus subtilis* BY25

ZHU Hong^{1, 2, 3}, WANG Yi-ming¹, LIN Xian-gui^{1*}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China; 2 Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210016, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* secret different proteolytic enzymes into culture media during stationary phase. Two major proteases are Subtilisin (Apr) and Metelloseproteinase (Npr), which account for more than 90% of total activity. Both of them are of important application on industry. In this study, these two proteases induced by different media components, soybean cake and wheat bran were observed. After *B. subtilis* BY25 fermentation, enzyme property examination showed Apr was induced by soybean cake. Gelatin zymograph was then operated and different bands were revealed among enzyme solutions. However, 35 KD Npr protein was observed only in the enzyme solution fermented with wheat bran.

Key words: Gelatin zymography, Fermentation media, Enzyme properties, Serine protease