

嗜热脂肪芽孢杆菌高温中性蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的表达、纯化及其酶学性质的研究

张敏^{①②}, 赵丛^①, 杜连祥^①, 路福平^{①*}, 高晨^③

① 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457;

② 沈阳农业大学 工程学院, 沈阳 110161;

③ 南开大学 生命科学学院, 天津 300071

* 联系人, E-mail: lfp@tust.edu.cn

收稿日期: 2007-07-08; 接受日期: 2007-10-13

国家高技术研究发展计划(批准号: 2007AA02Z212)资助项目

摘要 本文中嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)的高温中性蛋白酶基因在 *sacB* 基因启动子的调控下, 以蛋白酶自身或 *sacB* 基因的序列为信号肽, 分别实现了在枯草芽孢杆菌 DB104 中的高效表达. 表达产物经纯化后, 酶的比活力可达 16530 U/mg, 纯化倍数达到 3.8 倍, 分子量约为 35 kD. 对酶学性质的研究表明, 此酶的最适反应温度为 65℃, 最适作用 pH 为 7.5, 在 65℃ 下反应 1 h 后, 仍可保留约 80% 的活力.

关键词

枯草芽孢杆菌
(*Bacillus subtilis*)
高温中性蛋白酶
表达
纯化
酶学性质

工业用酶约占世界酶总量的 60%, 而蛋白酶是工业用酶中最重要的组成部分^[1], 它能够催化蛋白质水解. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可以分泌大量的胞外酶, 这些酶被广泛地应用于洗涤剂、食品、制药、皮革和化工等行业^[2,3].

许多种嗜热菌可以产生热稳定性高的胞外蛋白酶, 例如 *Bacillus stearothermophilus*^[4], *Thermos aquaticus*^[5], *Bacillus licheniformis*^[6], *Bacillus pumilus*^[7] 和 *Thermoanaerobacter yonseiensis*^[8] 等, 其中有些种类在工业生产中具有非常重要的作用. 由于它们具有高的反应温度和良好的热稳定性, 因此能够加快催化反应速率, 提高非气态底物和产物的溶解性, 从而降低染菌的几率. 在嗜热蛋白酶中, 高温中性蛋白酶得到了广泛地研究^[9~11]. 例如, Fujii 等人^[12]报道了嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)高温中性蛋白

酶基因的克隆与表达, 实验表明蛋白酶的作用 pH 呈中性, 于 65℃ 下反应 30 min 后仍可保留约 80% 的活力. 同时, Huang 等人^[13]也报道了对嗜热枯草杆菌 HS08 高温中性蛋白酶的纯化及酶学性质的研究, 所得蛋白酶在 40~65℃ 间均具有较好的热稳定性, 于 65℃ 下反应 1 h 后仍可保留 75% 的酶活力.

本研究室从土壤中得到了一株高产高温中性蛋白酶的 *B. stearothermophilus*, 将该菌于 46℃ 下培养 60 h 并纯化后, 蛋白酶的比活力可达 11240 U/mg, 蛋白酶表达产物的分子量约为 35 kD, 最适作用温度和 pH 分别为 65℃ 和 7.5, 将该酶于 65℃ 下反应 1 h 后仍可保留 80% 的酶活力. 但是, 由于 *B. stearothermophilus* 的培养温度较高, 限制了其大规模的生产, 因此有必要来构建一个能够在中温下进行表达的系统. 同时, 枯草芽孢杆菌表达系统是一种较为理想的异

源蛋白表达系统^[14], 其优点在于可以高效地表达具有生物学活性的异源蛋白并将其分泌至培养基中^[15], 而且枯草芽孢杆菌也具有较高的生物安全性。

因此, 本文将高温中性蛋白酶基因克隆入 *B. subtilis*, 来构建一个对高温中性蛋白酶基因进行诱导表达的系统, 使该基因处于 *sacB* 基因启动子的调控下, 并分别以自身或 *sacB* 基因的序列作为信号肽。同时, 对高温中性蛋白酶的纯化及酶学性质也进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和培养条件

B. subtilis DB104 是双蛋白酶缺陷型菌株, 作为蛋白酶的表达宿主^[16]; 大肠杆菌(*E. coli*) JM109 是基因操作的克隆宿主^[17], 2 个菌株均于 37℃ 下 LB 培养基中进行培养。重组大肠杆菌用 LB 培养基(含 30 μg/mL 氯霉素(Cm))进行培养和筛选, 而重组枯草芽孢杆菌用 LB 培养基(含 5 μg/mL 红霉素(Em))进行培养和筛选。

pBSAT 质粒上含有 *sacB* 基因, 由本研究室构建。质粒 pHP13PS 是由 pHP13 载体(*E. coli*-*B. subtilis* 穿梭载体)构建而来的, 其上含有 *sacB* 基因的启动子和信号肽序列; 质粒 pHP13P 也是由 pHP13 载体构建而来的, 但其仅含有 *sacB* 基因的启动子序列。

1.2 DNA 的操作

本实验所采用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 TaqDNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; DNA 片段的分离纯化、酶切反应、琼脂糖凝胶电泳、DNA 连接以及对大肠杆菌的转化等操作均参照分子克隆实验指南^[17]。

1.3 高温中性蛋白酶序列的克隆

根据已发表的高温中性蛋白酶基因的全序列, 设计用于扩增高温中性蛋白酶基因(*nprT*)的一对引物, 此基因包括信号肽、前肽和成熟肽序列。两个引物序列分别为 5'-CCGGTTCGACGGGAAAATTGGAAAA-TGAAAAGG-3'(Sal I) 和 5'-CCGAATTCACATCAGTGGAGGAAAAATCCCCCA-3'(EcoR I)。PCR 反应条件: 94℃, 5 min; 94℃, 1 min, 55℃, 1 min, 72℃, 2 min, 35 个循环; 72℃, 10 min。

根据 *nprT* 基因序列, 设计用于扩增 *nprT* 的 2 个引物, *nprT* 基因不包含信号肽序列。2 个引物序列分别为: 5'-CCCCCGGGGCCCAAGTATTTTACCTTAC-AAT-3'(Sma I) 和 5'-CCGAATTCACATCAGTGGAG-GAAAAATCCCCCA-3'(EcoR I)。扩增的产物利用琼脂糖凝胶进行分离纯化, 并通过 DNA 测序进行验证。

1.4 诱导型表达载体的构建

将用 Sal I 和 EcoR I 双酶切后大小为 1725 bp 的 *nprT* 基因片段, 克隆入同样用 Sal I 和 EcoR I 双酶切的 pHP13P 载体上, 得到质粒 pHP13PN, 该质粒上 *nprT* 基因处于 *sacB* 基因的启动子和自身信号肽序列的调控下(图 1(a)); 将用 Sma I 和 EcoR I 双酶切后大小为 1651 bp 的 *nprT* 基因片段, 克隆入同样用 Sma I 和 EcoR I 双酶切的 pHP13PS 载体上, 得到质粒 pHP13PSN, 该质粒上 *nprT* 基因处于 *sacB* 基因的启动子和信号肽序列的调控下(图 1(b))。

1.5 高温中性蛋白酶基因的诱导表达

将质粒 pHP13PN 和 pHP13PSN 按照 Chang 等人^[18]的方法转化入 *B. subtilis* DB104 中, 分别得到重组子 DB104/pHP13PN 和 DB104/pHP13PSN。再将重组子接入 LB 培养基(含 5 μg/mL 红霉素(Em))中, 于 37℃, 200 r/min 的条件下培养 2 h 后, 加入 2% 的蔗糖溶液诱导高温中性蛋白酶基因的表达, 以未加蔗糖溶液的作为对照; 继续培养 50 h, 将培养液于 4℃, 14000×g 离心 15 min 后收集上清以测定其酶活力。同时, 用 SDS-PAGE 法来检测高温中性蛋白酶基因的表达情况。

1.6 高温中性蛋白酶(NprT)的纯化

将培养物上清液用饱和度为 80% 的硫酸铵溶液进行沉淀后, 再加入 20 mL 的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 溶解沉淀, 并于 4℃ 下用同样的缓冲液透析 12 h, 透析得到的溶液经 DEAE-Sephadex A25 柱层析后收集含有 NprT 的部分, 再次用 80% 饱和度的硫酸铵溶液进行沉淀后, 以 0.3 mL/min 的速率用 DEAE-Sephadex A50 柱进行洗脱。

1.7 蛋白酶 NprT 酶活力的测定

蛋白酶活力的测定是将 1 mL 1% 的酪素溶液(pH 7.5)与 1 mL 的酶稀释液混匀, 于 65℃ 下反应 10 min

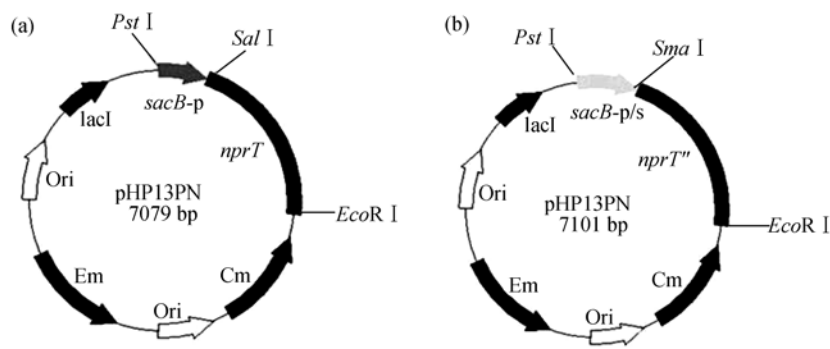


图 1 质粒的构建图谱

(a) 质粒 pHP13PN 包含由 *sacB* 基因启动子和自身信号肽序列调控的 *nprT* 基因; (b) 质粒 pHP13PSN 包含由 *sacB* 基因启动子和信号肽序列调控的 *nprT''* 基因. Cm 和 Em 分别为 *E. coli* 和 *B. subtilis* 中的筛选标记

后, 加入 2 mL 10% 的三氯乙酸溶液(TCA), 充分振荡后于 14000×g 下离心 20 min, 取 1 mL 上清液采用 Folin 酚法测定酪氨酸的含量 [19]. 蛋白酶活力单位定义为: 1 mL 液体酶在 65℃ 和 pH 7.5 的条件下, 1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位.

1.8 温度和 pH 对 NprT 酶活力的影响

将溶于 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.5) 的 NprT 分别于 40~75℃ 下进行反应, 以测定纯化后 NprT 的最适反应温度. 纯化 NprT 的最适作用 pH 于 65℃ 下分别在不同的缓冲体系中进行测定, 3 种缓冲液分别为 50 mmol/L 乙酸钠溶液(pH 4.0~5.5)、50 mmol/L 磷酸钠溶液(pH 6.0~7.0)和 50 mmol/L Tris-HCl 溶液(pH 7.5~9.0). 为测定 NprT 的热稳定性, 将溶于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)的纯酶于 65℃ 下作用不同的时间后, 测定其剩余的酶活力.

2 结果与分析

2.1 质粒 pHP13PSN 和 pHP13PN 的构建

通过 PCR 扩增分别得到 *nprT* 和 *nprT''* 基因, *nprT* 基因包括信号肽序列(1~57 bp)、前肽序列(58~708 bp)和成熟肽序列(709~1656 bp)(图 2) [20]. 为研究高温中性蛋白酶基因在 *B. subtilis* DB104 中的表达, 构建了 2 个不同的表达载体. 其中, 质粒 pHP13PN 包含 *sacB* 基因的启动子和 *nprT* 基因的信号肽序列(图 1(a)), 而质粒 pHP13PSN 包含 *nprT''* 基因以及位于其上游的 *sacB*

基因的启动子和信号肽序列(图 1(b)). 利用含 Em 的 LB 平板来筛选重组子, 每次筛选大约有 20~30 个转化子, 然后通过酶切和 PCR 扩增来验证插入基因片段的正确性.

为确认质粒 pHP13PSN 和 pHP13PN 中 *sacB* 基因序列与高温中性蛋白酶基因序列之间的可读框连接正确, 我们分别测定了整个基因序列. 结果表明, 两个连接处的读码框均正确, 并且本实验克隆的高温中性蛋白酶基因序列与已报道的基因序列有 99% 的同源性(GenBank 登录号: M21663).

2.2 高温中性蛋白酶基因在 *B. subtilis* DB104 中的表达

将构建的重组质粒 pHP13PSN 和 pHP13PN 分别转化 *B. subtilis* DB104 后, 向培养液中分别加入蔗糖溶液来诱导高温中性蛋白酶基因的表达, 利用 12% SDS-PAGE 来进行检测. 电泳结果表明, NprT 存在于培养物上清液中, 同时也表明 NprT 被成功地分泌到胞外(图 3).

在培养过程中, 定时取样测定上清液中 NprT 的酶活力(图 4). 结果显示, 重组子 pHP13PN/DB104 培养物上清液中的 NprT 酶活力达 7020 U/mL, 而重组子 pHP13PSN/DB104 培养物上清液中的 NprT 酶活力高达 13580 U/mL, 表明 *sacB* 基因的信号肽序列对于 *nprT* 基因的表达效果更显著. 对含有 NprT 的粗酶液进行纯化(表 1), 当纯化倍数为 3.8 时, 其比活力可达

```

1 ATGAAAAGGAAAATGAAAATGAAATTACGATCGTTTGGTGTTCAGCAGGACTAGCGGCC
1 M K R K M K M K L R S F G V A A G L A A
61 CAAGTATTTTACCTTACAATCGGCTGGCTTCATCGGAACACGTTACATGGAAACAA
21 Q V F L P Y N R L A S S E H V T W N Q Q
121 TTCAAACCCCTCTATTCTCCGGTGATCTGCTGAAAGTGAATGGCACATCCCCAGAA
41 F Q T P L F I S G D L L K V N G T S P E
181 GAACCTGCTATCAATATGTTGAAAAAACGAAAAACAGTTTAAATTTTCATGAAACGCT
61 E L V Y Q Y V E K N E N K F K F H E N A
241 AAGGATACTCTACAATTGAAAGAAACGAAAAATGATAACCTTGGTATTACGTTTATGCGC
81 K D T L Q L K E T K N D N L G I T F M R
301 TTCCACCAACGTATAAAGGGATTCCTGTGTTGGACAGGTAGTAACTGCCGACGTGAAA
101 F H Q T Y K G I P V F G Q V V T A H V K
361 GATGGCAGCTGACGGCGCTATCAGGGACACTGATTCCAATTCCGAATTGGACACGAAA
121 D G S L T A L S G T L I P I P N L D T K
421 GGATCCTTAAAAAGCGGGAAGAAATTGAGTGAGAAACAGCGCGTGACATTGCTGAAAA
141 G S L K S G K K L S E K Q A R D I A E K
481 GATTTAGTGGCAATGTAACAAAGGAAGTACCGGAATATGAACAGGAAAAAGACACCGAG
161 D L V A N V T K E V P E Y E Q G K D T E
541 TTTGTTGTTTATGTCAATGGGGACGAGGCTTCTTAGCGTACGTTGTCAATTTAACTTT
181 F V V Y V N G D E A S L A Y V V N L N F
601 TTAACCTCGAACCAGGAACTGGCTGTATGTCAATTGATGCCGTAGACGGAATAATTTA
201 L T P E P G N W L Y V I D A V D G K I L
661 AATAAAATTAACCACTTGACGCCGAAAACAGGTGATGTGAAGTCGATAACAGGAACA
221 N K F N Q L D A A K P G D V K S I T G T
721 TCAACTGTCGGAGTGGGAAGAGGAGTACTTGGTGATCAAAAAATATTAATACAACTAC
241 S T V G V G R G V L G D Q K N I N T T Y
781 TCTAGCTACTACTATTTACAAGATAATACGCGTGGAAATGGGATTTTACGTATGATCGG
261 S S Y Y Y L Q D N T R G N G I F T Y D A
841 AAATACCGTACGACATTGCCGGGAAGCTTATGGGCAGATGCAGATAACCAATTTTTGCG
281 K Y R T T L P G S L W A D A D N Q F F A
901 AGCTATGATGCTCCAGCGTTGATGCTCATTATTACGCTGGTGTGACATATGACTACTAT
301 S Y D A P A V D A H Y Y A G V T Y D Y Y
961 AAAAATGTTTCATAACCGTCTCAGTTACGACGGAATAATGCAGCTATTAGATCATCCGTT
321 K N V H N R L S Y D G N N A A I R S S V
1021 CATTATAGCCAAGGCTATAATAACGCATTTTGAACGGTTCGCAATGGTGTATGGCGAT
341 H Y S Q G Y N N A F W N G S Q M V Y G D
1081 GGTGATGGTCAACATTTATCCACTTTCTGGTGGTATTGATGTGGTCGCTCATGAGTTA
361 G D G Q T F I P L S G G I D V V A H E L
1141 ACGCATGCCGTAACCGATTATACAGCCGACTCATTATCAAAACGAATCTGGTGCAATT
381 T H A V T D Y T A G L I Y Q N E S G A I
1201 AATGAGGCAATATCTGATATTTTGAACGTTAGTCGAATTTACGCTAACAAAAATCCA
401 N E A I S D I F G T L V E F Y A N K N P
1261 GATTGGGAAATTGGAGAGGATGTGTATACACCTGGTATTTCAGGGGATTCCGTCCTCGTTCG
421 D W E I G E D V Y T P G I S G D S L R S
1321 ATGTCCGATCCGGCAAAGTATGGTGATCCAGATCACTATTCAAAGCGCTATACAGGCACG
441 M S D P A K Y G D P D H Y S K R Y T G T
1381 CAAGATAATGCCGGGGTTCATATCAATAGCGGAATTATCAACAAAGCCGCTTATTGATT
461 Q D N A G V H I N S G I I N K A A Y L I
1441 AGCCAAGGCGGTACGCATTACGGTGTGAGTGTGTCGGAATCGACGCGATAAATGGGG
481 S Q G G T H Y G V S V V G I G R D K L G
1501 AAAATTTTCTATCGTGCTTAACGCAATATTTAACACCAACGTCCTCACTTTAGCCAATT
501 K I F Y R A L T Q Y L T P T S N F S Q L
1561 CGTGCTGCGGTGTCAATCAGCCACTGACTTGTACGGTTCGACAAAGCCAGGAAGTCGCT
521 R A A A V Q S A T D L Y G S T S Q E V A
1621 TCTGTGAAGCAGGCCTTTGATGCGGTAGGGGTGAAATAAAGTGGTATCTCATCAGTGGG
541 S V K Q A F D A V G V K
1681 GATTTTGTCTCACTGATGTTTGTGTGATCAATGATGTCAG

```

图 2 *nprT* 基因的核苷酸和氨基酸序列

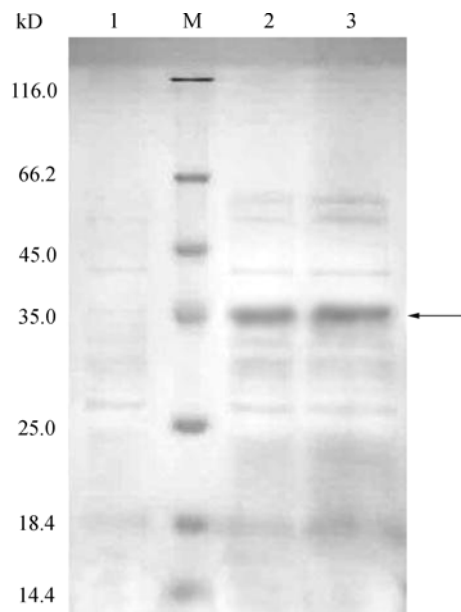


图3 高温中性蛋白酶基因在 *B. subtilis* DB104 中表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

M: 分子量标记; 1: pHP13/DB104 培养物的上清液(对照组); 2: pHP13PN/DB104 培养物的上清液; 3: pHP13PSN/DB104 培养物的上清液

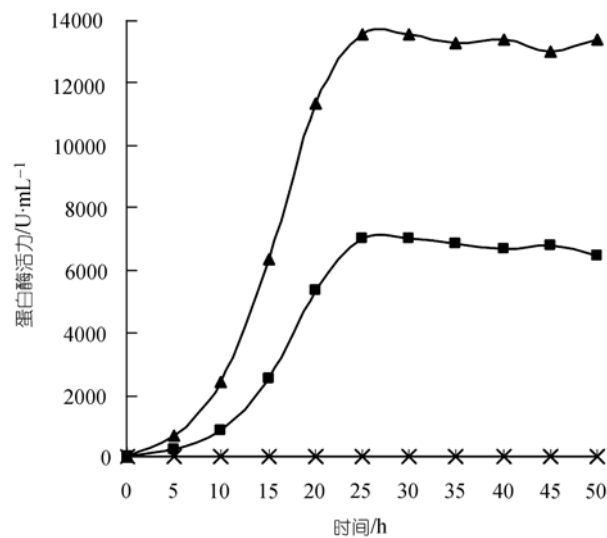


图4 高温中性蛋白酶基因在 *B. subtilis* DB104 中表达情况的比较

■: 质粒 pHP13PN 上含有 *nprT* 基因和自身的信号肽序列; ▲: 质粒 pHP13PSN 上含有 *nprT* 基因和 *sacB* 基因的信号肽序列; ×: 质粒 pHP13 上未插入外源基因

16530 U/mg, 提高了 13.4%, 而Huang等人 [13] 的研究

表明NprT的比活力仅为 13172 U/mg, 提高 5.1%. SDS-PAGE分析的结果表明(图 5), 有一分子量约为 35 kD的特征蛋白带出现, 大小与出发菌株的一致.

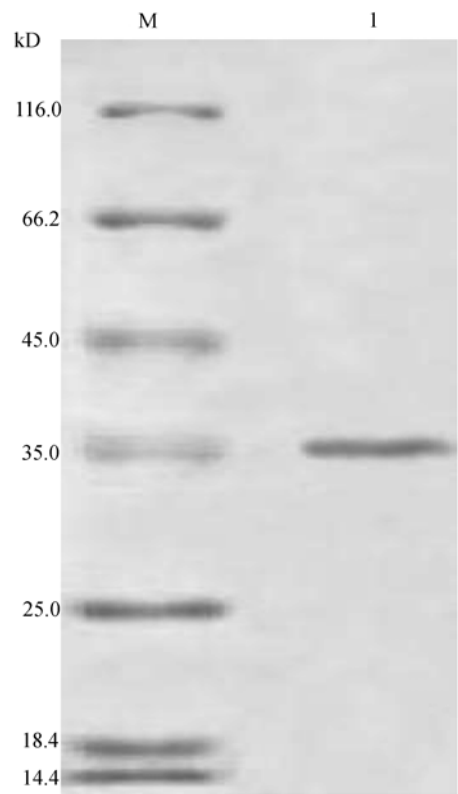


图5 NprT 纯化的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

M: 分子量标记; 1: 纯化 NprT

2.3 温度和 pH 对 NprT 酶活力的影响

将纯化的 NprT 分别于 40~75℃温度下反应, 测定 NprT 酶活力. 结果表明(图 6(a)), 酶的最适反应温度为 65℃, 当反应温度超过 65℃以后, 酶活力迅速下降; NprT 的作用温度范围较宽, 为 55~75℃, 并且在 40~ 65℃之间, NprT 具有较好的热稳定性; 在 65℃下反应 1 h 后仍可保留约 80%的酶活力, 因此, NprT 可被定义为嗜热酶. 研究不同 pH 对 NprT 酶活力的影响, 结果表明(图 6(b)), 当 pH<5.5 时, 酶活力较低, 当 pH>5.5 时, 酶活力迅速升高; NprT 作用的最适 pH 为 7.5, 在 pH 6.5~9.0 范围内均有较高的酶活力.

3 讨论

由于 *B. subtilis* 向胞外分泌高浓度的蛋白酶 [21],

表 1 NprT 的纯化结果

步骤	体积/mL	总蛋白/mg	总酶活力/ $\times 10^4$ U	比活力/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	500	525.5	228.6	4350	100	1
(NH_4) $_2\text{SO}_4$ 盐析	300	387.2	195.1	5040	85.3	1.15
DEAE-Sepharose A25	167	74.4	92.6	12450	40.5	2.86
DEAE-Sepharose A50	93	18.5	30.6	16530	13.4	3.8

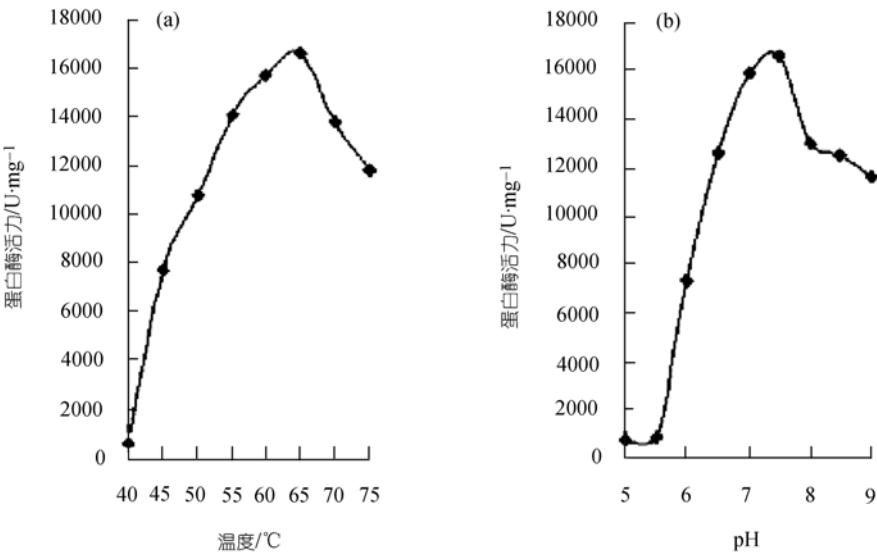


图 6 温度(a)和 pH(b)对高温中性蛋白酶活力的影响

以致影响了表达产物的稳定性, 而 *B. subtilis* DB104 是双蛋白酶缺陷型菌株, 有助于提高分泌蛋白的稳定性. 同时在枯草杆菌表达系统中使用诱导启动子系统, 可以使外源基因在加入诱导剂之前并不表达, 从而不会影响到宿主菌的生长; 当加入诱导剂后, 就可以使外源基因得到表达, 从而保证了外源蛋白的稳定性和高产量. 蔗糖诱导系统是 *B. subtilis* 两大天然诱导系统之一, 由 *sacA* 和 *sacB* 两个基因组成. 其中, *sacB* 基因编码果聚糖蔗糖酶, 是一种受蔗糖诱导的胞外酶, 既具有蔗糖诱导表达所需要的诱导区域, 也具有使蛋白有效分泌的信号肽序列.

对于中温菌 *B. subtilis* 的培养比高温菌 *B. stearothermophilus* 要容易得多, 将 *B. subtilis* 作为高温中性蛋白酶基因的表达宿主会对酶的应用提供一个很有前景的方式. 本文中高温中性蛋白酶基因在 *B. subtilis* DB104 中成功地实现了表达, 酶的比活力

较出发菌株有所提高, 可达 16530 U/mg . 实验结果表明, *sacB* 基因的信号肽序列在引导高温中性蛋白酶进行分泌时所起的作用要优于蛋白酶自身的信号肽序列. 纯化酶的最适作用 pH 和反应温度分别为 7.5 和 65 $^{\circ}\text{C}$, 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h 后, 仍可保留约 80% 的活力. 实验结果也表明, 重组酶的性质与出发菌株的相同, 有必要对高温中性蛋白酶的动力学性质进行分析, 以确定蛋白酶的种属.

本文首次利用 *sacB* 诱导基因来构建一个对高温中性蛋白酶基因进行高效诱导表达的系统, *sacB* 基因的表达不仅可以利用蔗糖来诱导, 其表达水平也可以通过一些多效调控基因来得到提高, 例如 *degQ*, *degU* 和 *degS* 基因 [22~24]. 目前, 本研究室正在构建含有多效调控基因的重组质粒, 这样将会使高温中性蛋白酶基因的诱导表达水平有更大的提高.

参考文献

- 1 Nascimento W C A, Martins M L L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol*, 2004, 35: 1—2 [\[DOI\]](#)
- 2 Pastor M D, Lorda G S, Balatti A. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Braz J Microbiol*, 2001, 32: 1—8 [\[DOI\]](#)
- 3 Ward O P. *Proteolytic Enzymes*. Oxford: Pergamon Press, 1985. 789—818
- 4 Sookkheo B, Sinchaikul S, Phutrakul S, et al. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expr Purif*, 2000, 20: 142—151 [\[DOI\]](#)
- 5 Oledzka G, Dabrowski S, Kur J. High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2003, 29: 223—229
- 6 Ferrero M A, Castro G R, Abate C M, et al. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45: 327—332 [\[DOI\]](#)
- 7 Kumar C G. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 34: 13—17 [\[DOI\]](#)
- 8 Hyenung J J, Byoung C K, Yu R P, et al. A novel subtilisin-like serine protease from *Thermoanaerobacter yonseiensis* KB-1: its cloning, expression, and biochemical properties. *Extremophiles*, 2002, 6: 233—243 [\[DOI\]](#)
- 9 Helmann J D. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 2351—2360 [\[DOI\]](#)
- 10 Van den Burg B, Eijssink V G H, Veltman O R, et al. Evolution reversed: engineering an enzyme to resist boiling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2056—2060 [\[DOI\]](#)
- 11 Rao M B, Tankasale A M, Ghatge M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 597—634
- 12 Fujii M, Takagi M, Imanaka T, et al. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1983, 154: 831—837
- 13 Huang G R, Ying T J, Huo P, et al. Purification and characterization of a protease from *Thermophilic bacillus* strain HS08. *Afr J Biotechnol*, 2006, 5(24): 2433—2438
- 14 Doi R H, Wong S L, Kawamura F. Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins. *Trends Biotechnol*, 1986, 4: 232—235 [\[DOI\]](#)
- 15 Goedde D V. Expression in *B. subtilis*. *Meth Enzymol*, 1990, 85: 199—228
- 16 Behnke D, Gerlach D. Cloning and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus sanguis* of a gene for staphylokinase, a bacterial plasminogen activator. *Mol Gen Genet*, 1987, 210: 528—534 [\[DOI\]](#)
- 17 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 18 Chang S, Cohen S N. High-frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. *Mol Gen Genet*, 1979, 168: 111—115
- 19 Ledoux M, Lamy F. Determination of proteins and sulfobetaine with the folin-phenol reagent. *Anal Biochem*, 1986, 157: 28—31 [\[DOI\]](#)
- 20 Kubo M, Imanaka T. Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J Gen Microbiol*, 1988, 134(7): 1883—1892
- 21 Priest F G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *J Bacteriol*, 1977, 41: 711—753
- 22 Ayusawa D, Yoneda Y, Yamane K, et al. Pleiotropic phenomena in autolytic enzyme(s) content, flagellation, and simultaneous hyperproduction of extracellular α -amylase and protease in a *Bacillus subtilis* mutant. *Bacteriol*, 1975, 124: 459—469
- 23 Jacobs M F. Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Gene*, 1995, 152: 69—74 [\[DOI\]](#)
- 24 Pan X F. Effects of degU32(Hy), degQa and degR pleiotropic regulatory genes on the growth and protease fermentation of *Bacillus Subtilis* Ki-2-132. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33: 373—380 [\[DOI\]](#)