



УДК 577.156.2.07

МНОЖЕСТВЕННОСТЬ СУБТИЛИЗИНОВ ТИПА *NOVO*

Стронгин А. Я., Абрамов З. Т., Левин Е. Д.,
Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

В препаратах субтилизина типа *Novo* фирм «Serva» (ФРГ) и «Nagase» (Япония), а также в субтилизине, выделенном из штамма А-50 *Bac. subtilis*, с помощью изоэлектрофокусирования в диапазоне рН 7—9 и диск-электрофореза в полиакриламидном геле показано присутствие трех компонентов (главного с pI 8,0—8,15 и минорных с pI 7,6—7,65 и 7,0). С целью предотвращения автолиза, имеющего место при изоэлектрофокусировании активных препаратов, исследования проводили с субтилизинами, ингибированными фенилметилсульфонилфторидом и полностью реактивированными (после разделения) формгидроксамовой кислотой. Предполагается, что причиной множественности субтилизинов может быть наличие трех структурных генов субтилизина в геноме *Bac. subtilis* или же посттрансляционная модификация субтилизина.

Субтилизинами называются внеклеточные щелочные протеиназы, продуцируемые различными штаммами *Bacillus subtilis*, а также некоторыми родственными видами бактерий. В настоящее время описано четыре типа субтилизинов, отличающихся первичной структурой, физико-химическими свойствами и некоторыми энзимологическими характеристиками. В соответствии с названиями продуцентов они обозначаются как субтилизины *Novo* (идентичен субтилизину ВРН¹), *Carlsberg*, *Amylosacchariticus* и 221 [1—4]. Весьма значительная вариабельность субтилизинов, отвечающая необычно высокому темпу эволюционной изменчивости их структур, давно привлекала внимание исследователей. Однако до последнего времени не была известна множественность субтилизинов, относящихся к одному и тому же типу. Данная работа посвящена изучению множественности субтилизинов, принадлежащих к типу *Novo*.

Основным методом, использованным нами для разделения форм субтилизинов типа *Novo*, является изоэлектрофокусирование в градиенте рН, основанное на различии их изоэлектрических точек (pI). Субтилизины обычно приписывают высокие значения pI — от 7,0 до 9,4. Однако данные об изоэлектрических точках субтилизинов, в том числе относящихся к одному типу, весьма противоречивы. Так, при исследовании нативной субтилопептидазы (субтилизин *Carlsberg*) изоэлектрофокусированием в полиакриламидном геле было установлено, что в зависимости от места нанесения образца pI может изменяться в пределах 7,0—9,0 [5]. Методом электрофореза для субтилизина типа *Novo* найдена pI 7,8 [6], а изоэлектрофокусированием для фермента того же типа, ингибированного фенилметилсульфонилфторидом, — 8,3 [7]. По-видимому, неоднозначность и противоречивость этих результатов обусловлена склонностью субтилизинов к автолизу. Ввиду этого следует особое внимание уделять подавлению автолитических процессов.

Мы поставили своей целью выделение и первичную характеристику субтилизина, продуцируемого штаммом *Bac. subtilis* A-50. Весьма эффективным приемом очистки субтилизина оказалась гель-фильтрация на сефадексах. При этом следовало подобрать оптимальные условия, которые обеспечивали бы отделение фермента как от высокомолекулярных белковых примесей, так и от пигментов небольшого молекулярного веса. Хроматография на сефадексах G-100 и G-75 не дала удовлетворительного решения этих задач. Наилучшие результаты были получены при хромато-

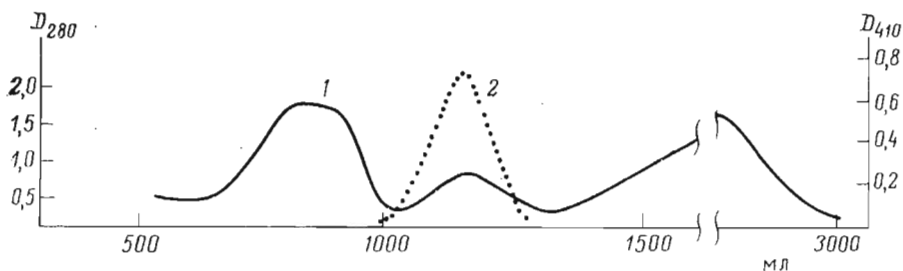


Рис. 1. Разделение белков культуральной жидкости *Bac. subtilis* A-50 на колонках с сефадексом G-50 и G-75. Анализ элюата по белку (1) и по активности (2)

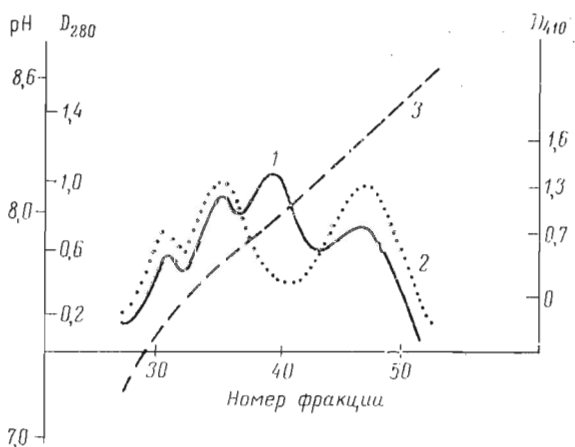


Рис. 2. Изоэлектрофокусирование активного субтилизина *Nagarse*. Анализ-фракций по белку (1), по активности (2). Кривая 3 — градиент pH

графии на последовательно соединенных колонках с сефадексами G-50 и G-75 (рис. 1, табл. 1), которая позволила получить препарат субтилизина, содержащий, по данным диск-электрофореза, примесь 5 белков и практически свободный от пигментов.

Для дальнейшей очистки фермента было использовано изоэлектрофокусирование в градиенте pH. При изоэлектрофокусировании имевшихся в нашем распоряжении активных субтилизинов типа *Novo* в градиенте pH 7—9 мы обнаружили присутствие двух или трех активных форм фермента. Так, субтилизин A-50 дает одну неактивную фракцию с pI 7,9 (главный компонент смеси) и три активные фракции с pI 7,65, 7,75 и 8,15. Диск-электрофорез этих фракций подтвердил их различие. Субтилизин *Nagarse*, также относящийся к типу *Novo*, дает при изоэлектрофокусировании в тех же условиях активные фракции с pI 7,53, 8,00 и 8,35 и неактивную фракцию с pI 7,75 (рис. 2). В ходе опыта происходит снижение суммарной активности фермента до 30—50% от исходной. Субтилопептидаза А (субтилизин типа *Novo*) фирмы «Serva» (ФРГ) также разделяется на две активные фракции с pI 7,65 и 8,05 и неактивный компонент с pI 7,83. Общая активность и в этом случае падает в 2—3 раза. Наблюдается также снижение удельной активности. Фракция с pI 8,05 сохраняет ~75% удельной активности по отношению к исходной, фракция с pI 7,65 — 45%.

Таким образом, при изоэлектрофокусировании субтилизинов происходит существенное падение активности и появляются неактивные белки. Очевидно, это является результатом автолитических процессов, которым благоприятствуют условия опыта. Действительно, амфолины, применяющиеся для получения градиента рН, являются хорошими комплекссообразователями и эффективно связывают ионы кальция, необходимые для стабильности субтилизинов. рН разделения благоприятен для ферментативного действия субтилизинов; автолизу способствует и длительность опыта — около 60—70 ч. Пока не вполне ясно, являются ли активные фракции, получаемые в этих опытах, только лишь результатом автолиза. Вполне возможно, что они в какой-то мере отражают множественность субтилизинов, присутствующих уже в исходной смеси, однако строгий анализ их происхождения крайне труден. Ясно лишь, что ферментативная активность субтилизинов не связана с одной уникальной структурой, а может принадлежать семейству сходных структур.

Несколько активных компонентов были также обнаружены некоторыми авторами при изоэлектрофокусировании субтилопептидазы А типа *Novo* [8], а также при исследовании субтилизина типа *Carlsberg* электрофорезом в геле агарозы и иммуноэлектрофорезом [9].

Таким образом, изоэлектрофокусирование активных субтилизинов сопровождается автолитическими процессами. Это осложняет использование метода в препаративных целях и затрудняет трактовку результатов опыта.

Значительно проще протекает изоэлектрофокусирование субтилизинов, предварительно инактивированных ингибиторами. Такой прием уже применялся для изоэлектрофокусирования субтилизина *Novo* [7], однако автор ограничился лишь выделением ингибированного фермента, не проведя его реактивации. По нашему мнению, необходимо проводить реактивацию препарата, полученного изоэлектрофокусированием ингибированного фермента, так как только в этом случае можно удостовериться, что выделенный белок обладает всеми свойствами субтилизина. Для химических исследований можно, а во многих отношениях даже удобнее использовать ингибированный субтилизин.

От ингибирования диизопропилфторфосфатом мы отказались не только из-за токсичности реагента, но и из-за того, что ингибированные им субтилизины выпадают в осадок в процессе изоэлектрофокусирования и не поддаются реактивации. Поэтому мы использовали ингибирование фенолметилсульфонилфторидом. Присоединяющаяся при этом к гидроксилу серина в активном центре субтилизина фенолметилсульфонильная группа сравнительно легко отщепляется при инкубации производного с формгидроксамовой кислотой при рН 8,0 с восстановлением активности [10].

Изоэлектрофокусирование ингибированного препарата субтилизина А-50 дает главную фракцию с pI 8,15, обнаруживающую после обработки формгидроксамовой кислотой 80—85% всей активности, появляющейся после реактивации (см. табл. 1). Кроме нее, есть еще две фракции, реактивирующиеся формгидроксамовой кислотой: с pI 7,6—7,65 (15% активного белка) и с pI 7,00—7,05 (около 1% активного белка) (рис. 3).

Полученный изоэлектрофокусированием субтилизин А-50 с pI 8,15 является высокоочищенным белком. Он обнаруживает одну зону при электрофорезе в полиакриламидном геле (как до, так и после реактивации). По данным диск-электрофореза белок с pI 7,6 является индивидуальным. Сходные результаты были получены и при разделении других субтилизинов типа *Novo*. Во всех случаях обнаруживаются три активных компонента — главный и два минорных (табл. 2 и рис. 4). Реактивация приводит к полному восстановлению ферментативной активности. Следует отметить, что три активных компонента субтилизинов обнаруживаются также и при диск-электрофорезе. Препаративно выделенные и реактивированные ком-

Таблица 1

Выделение субтилизина А-50 из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* А-50

Стадия	Выход, %	Степень очистки	Удельная активность, ед/мг·10 ³
Исходный продукт	100	1	1
Гель-фильтрация на сефадексах G-50, G-75	90	60	60
Ингибирование фенолметилсульфонилфторидом, изоэлектрофокусирование, реактивация главной фракции с рI 8,15	50	150	150

Таблица 2

Характеристика множественных форм субтилизинов типа *Novo*

Показатель	Субтилопептидаза А с рI			Субтилизин <i>Nagarse</i> с рI			Субтилизин А-50 с рI		
	8,0	7,6	7,0	8,1	7,0	7,0	8,15	7,6	7,0
R _f при диск-электрофорезе	0,10	0,20	0,33	0,10	0,20	0,33	0,10	0,20	0,33
Содержание, %	80	15—20	3—5	90	10—	1	80—85	15	1
Относительная уд. акт., %	100	75—80	—	85—90	65—70	—	90	67—70	—
Число аминокислотных остатков на молекулу:									
лизина	11	—	—	11	—	—	11	11	—
гистидина	6	—	—	6	—	—	6	6	—
аргинина	2	—	—	2	—	—	2	2	—

Таблица 3

Аминокислотный состав субтилизинов (число остатков)

Аминокислоты	Субтилизин А-50					Субтилизин <i>Novo</i>					
	А-50 *	<i>Novo</i> [2]	221 [4]	<i>Carlsberg</i> [2]	<i>Amylosaccariticus</i> [3]	Аминокислоты	А-50 *	<i>Novo</i> [2]	221 [4]	<i>Carlsberg</i> [2]	<i>Amylosaccariticus</i> [3]
Lys	11	11	6	9	8	Ala	38	37	45	41	35
His	6	6	8	5	6	Val	29—30	30	27	31	25
Arg	2	2	8	4	4	Met	—	5	4	5	4
Asx	28	28	29	28	25	Ile	12—13	13	9	10	16
Thr	13	13	18	19	17	Leu	15—16	15	22	16	15
Ser	35	37	23	32	41	Tyr	9	10	9	13	12
Glx	15	15	16	12	15	Phe	3	3	2	4	3
Pro	14—15	14	16	9	13	Trp	—	3	3	1	3
Gly	32	33	39	35	33						

* Наши данные для фракции с рI 8,15.

поненты дают при диск-электрофорезе только одну соответствующую данному компоненту зону (рис. 5).

Удельная активность главной фракции субтилизина А-50 близка к удельной активности коммерческих препаратов субтилизинов типа *Novo*, к которым он очень близок и по аминокислотному составу (табл. 2). Напротив, как видно из табл. 3, субтилизин А-50 по аминокислотному составу, особенно по содержанию основных аминокислот, существенно отличается от субтилизинов типа *Carlsberg*, *Amylosaccariticus* и 221.

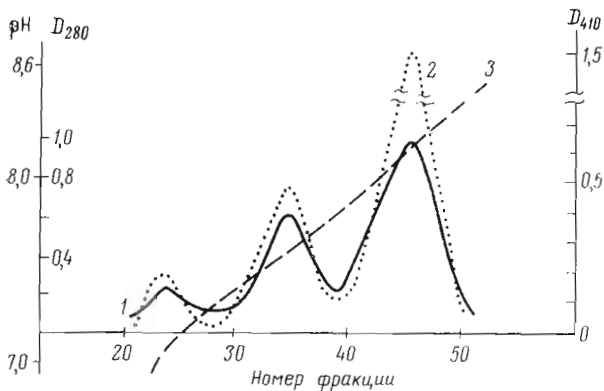


Рис. 3. Изоэлектрофокусирование субтилизина А-50, ингибированного фенолметилсульфонилфторидом. Анализ фракций по белку (1) и по активности после реактивации (2). Кривая 3 — градиент рН

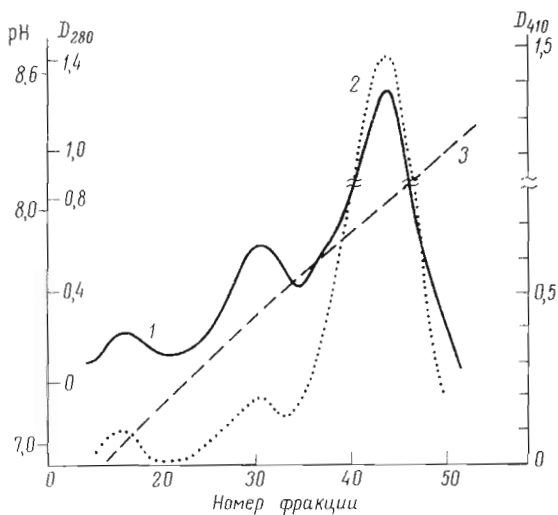


Рис. 4. Изоэлектрофокусирование субтилизина А (субтилопептидазы А), ингибированного фенолметилсульфонилфторидом. Обозначения на рис. 3

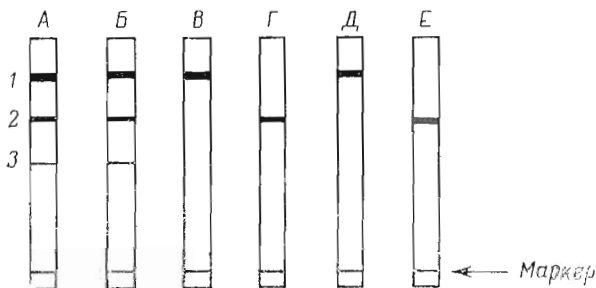


Рис. 5. Диск-электрофорез препаратов субтилизина А (субтилопептидазы А). А, В — Е — окраска кумасси голубым; Б — локализация по активности; А — 1, 2, 3 — соответственно места локализации фракций с рI 8,0; 7,6 и 7,0, В — исходные препараты до изоэлектрофокусирования и ингибирования; В и Г — ингибированные фракции изоэлектрофокусирования с рI 8,0 и 7,6; Д и Е — реактивированные фракции с рI 8,0 и 7,6

Однако было бы преждевременным утверждать, что он идентичен субтилизину *Novo*, поскольку могут иметь место небольшие изменения в последовательности.

Множественность, характерная для субтилизинов типа *Novo*, обуславливается двумя возможными причинами: существованием у *Bac. subtilis* в одном геноме по меньшей мере трех генов, кодирующих несколько отличающиеся аминокислотные последовательности, и посттрансляционной модификации одной и той же аминокислотной последовательности, приводящей к некоторым отличиям физико-химических свойств фермента.

Оценивая предположение о существовании трех структурных генов субтилизина в одном геноме, следует иметь в виду, что главный и минорные белки, безусловно, принадлежат (по данным аминокислотного анализа) к одному и тому же типу субтилизина *Novo*. Можно допустить наличие лишь единичных замен или небольших перестановок аминокислот в последовательности. Обращает на себя внимание и большая разница в уровне синтеза субтилизинов, соответствующих трем гипотетическим генам, хотя такому различию нетрудно дать объяснение.

В литературе нет каких-либо данных о посттрансляционной модификации субтилизинов, однако известно, что такого рода процессы широко распространены. Можно указать на два типа модификаций, согласующихся с полученными данными о множественности субтилизинов. Первый из них — ограниченный протеолиз пептидной цепи с сохранением активности фермента. На возможность такого процесса косвенно указывают наши данные об образовании ряда форм субтилизинов при изоэлектрофокусировании активных ферментов. Хорошо известно образование ряда активных форм при ограниченном протеолизе ряда протеиназ, например трипсина и химотрипсина. Продукты ограниченного протеолиза субтилизина могут несколько отличаться по pI из-за несбалансированности зарядов карбоксильной и аминной групп, образующихся при расщеплении пептидной связи, и должны иметь близкий или одинаковый аминокислотный состав. Другой возможный тип модификации — частичный гидролиз амидных групп глутамина и аспарагина. Недавно высказано предположение, что именно такой процесс, катализируемый специфическим ферментом, обуславливает микрогетерогенность энтеротоксина В стафилококков [11]. Продукты такой модификации должны иметь одинаковый состав и будут несколько отличаться по значениям изоэлектрических точек. По имеющимся в нашем распоряжении данным мы пока не можем сделать выбор между этими альтернативами. Решение вопроса о причинах множественности субтилизинов потребует более подробного изучения структурных и энзимологических характеристик выделенных нами ферментов.

Экспериментальная часть

Реагенты. Использовали амфолины («LKB», Швеция), сефадексы («Farmacia», Швеция), акриламид («Koch-Light», Англия), трис, метиленбисакриламид, тетраметилэтилендиамин, глицин («Reanal», ВНР), сахарозу («BDH», Англия), кумасси голубой GL, фенолметилсульфонилфторид, диизопропилфторфосфат («Serva», ФРГ). Формгидроксамовую кислоту синтезировали по методике, описанной в работе [12].

Субтилизин А-50, полученный нами по приведенной ниже схеме, сравнивали с коммерческими препаратами субтилизинов типа *Novo* — субтилопептидазой А («Serva», ФРГ) и субтилизином *Nagarse* («Nagase», Япония). Принадлежность этих препаратов к субтилизинам типа *Novo* подтверждается результатами аминокислотного анализа.

Диск-электрофорез в 7,5%-ном полиакриламидном геле (соотношение акриламид : метиленбисакриламид, 30 : 1) проводили в приборе «Canalco-Eufore» (Голландия) в стеклянных трубках 6×80 мм, используя трис-глициновую систему буферов с pH разделения 9,5 [13], в течение 1,5—2 ч при силе тока 3 мА на трубку при 10° . Опыт заканчивали когда маркер —

бромфеноловый синий — оказывался в 5 мм от нижнего конца геля и измеряли R_f белка относительно маркера. Окрашивание гелей проводили в 0,5%-ном растворе кумасси голубого в 30%-ной трихлоруксусной кислоте 30 мин, избыток красителя удаляли 7,5%-ной уксусной кислотой.

Изоэлектрофокусирование в градиенте плотности сахарозы 60—0% проводили при 4° в приборе «ЛКВ» (Швеция), используя колонки объемом 110 (аналитический вариант) или 440 мл [14]. Градиент pH создавали при помощи амфолинов pH 3—10 или pH 7—9, конечная концентрация которых составляла 1%. Исследуемый образец фермента (40—50 и 250—275 мг соответственно на колонки объемом 110 и 440 мл) вносили в весь объем легкого градиентного раствора. Опыт вели при 400—1000 В и мощности не более 2 Вт на колонке объемом 110 мл или 4 Вт на колонке объемом 440 мл 65—70 ч. После окончания опыта содержимое колонки сливали со скоростью 0,5 мл/мин, собирая фракции по 2—5 мл и измеряя поглощение при 280 нм при помощи проточного денситометра «Uvicord» («ЛКВ», Швеция). pH фракций определяли pH-метром «Radiometer» ТТТ-2 (Дания) при 10°.

Полученные фракции отделяли от сахарозы и амфолинов на сефадексе G-50 («тонкий»), уравновешенном 0,01 М трис-НСI буфером pH 7,0, содержащим 1 мМ Ca^{2+} .

Активность субтилизинов определяли по расщеплению *p*-нитроанилида карбобензоксиглицил-глицил-*L*-лейцина. Этот же субстрат использовали для локализации субтилизинов в геле после проведения диск-электрофореза [15]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое в стандартных условиях за 1 мин расщепляет 1 мкмоль субстрата.

Ингибирование субтилизинов фенилметилсульфонилфторидом проводили при 25° следующим образом [10]. К раствору субтилизина в 0,01 М трис-НСI буфере (pH 8,0), содержащем 5 мМ Ca^{2+} , прибавляли 6-кратный молярный избыток 1%-ного раствора фенилметилсульфонилфторида в абсолютном диоксане. Через 30 мин повторяли обработку таким же количеством ингибитора; смесь выдерживали еще 30 мин, затем пропускали через колонку с сефадексом G-25 («тонкий»), промытую водой, и белковую фракцию лиофилизировали. Полученный препарат имел не более 0,10—0,15% исходной активности. После ингибирования субтилизина диизопропилфторфосфатом [16] избыток последнего отделяли от белка на колонке с сефадексом G-25 («тонкий»).

Реактивация субтилизина, ингибированного фенилметилсульфонилфторидом, достигалась обработкой 0,5 М формгидроксамовой кислотой * [10]. К раствору ингибированного белка прибавляли равный объем 1 М раствора формгидроксамовой кислоты в 0,5 М трис-НСI буфере (pH 9,0), содержащем 10 мМ Ca^{2+} , и инкубировали смесь 2—8 ч при 25°, после чего отбирали пробы для определения активности субтилизина. Указанного времени достаточно для надежного обнаружения активности субтилизина во фракциях, полученных при изоэлектрофокусировании ингибированного фермента. Более высокий выход реактивированного фермента (до 95—100%) достигается при инкубации в течение 20 ч.

Определение белка проводили по поглощению при 280 нм или по методу Лоури [17].

Выращивание культуры ** *Bac. subtilis* (штамм А-50) проводили на полноценной среде, состоящей из пивного суслу 7 БМ и бульона Хоттингера в соотношении 1 : 1 (pH 7,6), в круговых качалках (120 об/мин) в течение 60 ч [18].

Выделение субтилизина. 2 л культуральной жидкости *Bac. subtilis* А-50 центрифугировали для отделения клеток, после чего надосадочную

* Авторы благодарны Г. Л. Муратовой за получение формгидроксамовой кислоты.

** Авторы благодарны Л. М. Ермаковой и Е. О. Добрянской за выращивание культуры.

жидкость лиофилизovali. Полученный препарат растворяли в минимальном объеме 5 мМ боратного буфера (pH 8,5), содержащего 1% изопропилового спирта. После центрифугирования при 20 000 об/мин в течение 40 мин надосадочную жидкость наносили на колонку с сефадексом G-50 («сверхтонкий») 4 × 150 см, соединенную последовательно с колонкой с сефадексом G-75 («тонкий») 4 × 150 см. Обе колонки были уравновешены 5мМ боратным буфером (pH 8,5), содержавшим 1% изопропилового спирта и 1 мМ Ca²⁺. Фракции, обнаруживающие субтилизиновую активность, объединяли, концентрировали ультрафильтрованием через мембрану «Diaflo» UM-10 в приборе «Amicon» (Голландия) и лиофилизovali. Сухой препарат растворяли в 0,01 М трис-НСl буфере (pH 8,0), ингибировали фенилметилсульфонилфторидом и подвергали изоэлектрофокусированию по описанным выше методикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Markland F. S., Smith E. L. (1971) in *Enzymes* (Boyer P. D., ed.), vol. 3, p. 561—608, 3rd edn., Academic Press, New York.
2. Dayhoff M. O., (1969) in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 4, p. D122—123, Silver Spring, Md., National Biomedical Research Foundation.
3. Kurihara M., Markland F. S., Smith E. L. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 5619—5631.
4. Nakamura K., Matsushima A., Horikoshi K. (1973) *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1261—1267.
5. Wadström T., Smyth C. J. (1973) *Science Tools*, **20**, 17—21.
6. Tsuru D., Kira H., Yamamoto T., Fukumoto J. (1967) *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 330—335.
7. Svensson B. (1973) *FEBS Lett.*, **29**, 167—169.
8. Zuidweg M. H. J., Bos C. J. K., Van Welsen H. (1972) *Biotechnol. and Bioeng.*, **14**, 685—714.
9. Verbruggen R., Duruisseau E., Baeck A. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **365**, 108—114.
10. Vemitsu N., Sugiyama M., Matsumiya H. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **258**, 562—565.
11. Spero L., Warren J. R., Metzger J. F. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **336**, 79—85.
12. Hickenbottom W. J. (1959) in *Reactions of Organic Compounds*, p. 301, Longmans, Green and Co, New York.
13. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
14. Vesterberg O., Svensson H. (1966) *Acta chem. scand.*, **20**, 820—834.
15. Lyublinskaya L. A., Belyaev S. V., Strongin A. Ya., Matyash L. F., Levin E. D., Stepanov V. M. (1974) *Anal. Biochem.*, **62**, 371—376.
16. Ottesen M., Schellman C. G. (1958) *Compt. Rend. Lab. Carlsberg*, **30**, 157—166.
17. Lowry D. H., Rosebrough N. H., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
18. Алиханян С. И., Степанов В. М., Стронгин А. Я., Ермакова Л. М., Абрамов З. Т., Ерохина Л. И., Левин Е. Д. (1974) *Генетика*, **10**, 119—122.

Поступила в редакцию
21.II.1975

THE MULTIPLE FORMS OF THE NOVO TYPE SUBTILISIN

STRONGIN A. YA., ABRAMOV Z. T., LEVIN E. D.,
STEPANOV V. M.

*Institute for Genetics and Selection of Industrial
Microorganisms, Moscow*

The presence of three components, major one with pI 8.0-8.15 and two minor ones with pI 7.6-7.65 and 7.0 was shown in the preparations of Novo type subtilisin from «Serva» (FRG) and «Nagase» (Japan) and also in subtilisin A-50 isolated from *Bacillus subtilis* A-50 by isoelectric focusing within the pH 7-9 gradient and polyacrylamide ged electrophoresis. Subtilisin preparations were inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride before isoelectric focusing to prevent autolysis and completely reactivated by formohydroxamic acid after separation. One inactive and two-three active fractions of subtilisin with pI from 7.5 to 8.3 were obtained from active non-inhibited preparations of subtilisin during isoelectric focusing. It may be explained by the autolysis of the active subtilisin under experimental conditions. The heterogeneity of Novo type subtilisin may result from post-translational modifications of subtilisin or from the presence of three structural genes for subtilisin in the genome of *Bacillus subtilis*.