

响应面模型分析高温蛋白酶菌株增殖和产酶关系

朱泓^{1,2,3} 王一明¹ 林先贵^{1*}

- (1. 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 江苏 南京 210008)
(2. 江苏省中国科学院植物研究所 江苏 南京 210018)
(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要:【目的】【方法】采用 Box-Behnken 法设计三因素三水平响应面实验, 对比分析了高温蛋白酶高产菌株枯草芽孢杆菌 BY25 发酵过程中细菌生长与产酶之间的关系。【结果】实验表明, 细菌生长与产酶的关系在各因素交互影响下变化显著。在中低水平的有机氮源添加条件下, 细菌的大量繁殖显著抑制了蛋白酶产量, 而在高水平的有机氮源添加条件下, 细菌量的增长对产酶的作用由抑制转为促进。【结论】该结果表明, 产酶诱导物有机氮源豆制品废渣的添加很可能显著提高了枯草芽孢杆菌群体中产酶菌的比率, 而在没有合适诱导物的情况下通过增加细菌量并不能有效提高蛋白酶产量。

关键词: 高温蛋白酶, 菌体干重, 发酵优化, Box-Behnken 设计, 响应曲面

Effect of substrate on protease yield of thermophilic *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, Jiangsu 210008, China)
(2. Institute of Botany Jiangsu and Chinese Academy of Science, Nanjing, Jiangsu 210018, China)
(3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective][Methods] Box-Behnken design combining with response surface modeling was used to study the relationships between cell growth of a moderate thermophilic *Bacillus subtilis* BY25 and its thermostable protease yield under different carbon (glucose) and/or nitrogen (soybean waste powder) sources as well as pH values. [Results] The higher values of the coefficients of determination, lack-of-fit <4 and P value <0.05 were in good agreement with the optimum combination of process parameters, which proved the fitness of the selected model for analyzing the experimental data. Data revealed that both low and medium nitrogen applications greatly contributed to the growth of *Bacillus subtilis*, which however inhibited the yield of thermostable protease; under high nitrogen application both bacterial growth and protease yield were stimulated. Contour plots displayed the

基金项目: 江苏省产学研联合创新资金项目(No. BY2011166); 948 工程项目(No. 2011-G25); 云南中烟工业公司科技项目(No. 2011YL 01); 国家十二五科技支撑项目(No. 2013BAD11B01)

*通讯作者: Tel: 86-25-86881589; 信箱: xglin@issas.ac.cn

收稿日期: 2013-03-26; 接受日期: 2013-05-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

maximal enzyme yield was accompanied with 47.3% and 61.4% maximal biomass under low and medium nitrogen applications, but with 96.3% maximal biomass under high nitrogen application. **[Conclusion]** The higher nitrogen concentration could increase the specific enzyme productivity, and soybean product waste could contain a better inducer for protease synthesis in *Bacillus subtilis*.

Keywords: Thermostable protease, Dry cell weight, Fermentation condition optimization, Box-Behnken design, Response surface

微生物蛋白酶是一种重要的蛋白水解酶,也是工业用蛋白酶的重要来源之一。其产量占工业酶总产量的 40%^[1], 广泛应用于食品、纺织、医药、化工、环保等行业。与普通微生物蛋白酶相比,高温蛋白酶具有热稳定性强的特点,更适合工业化应用中的高温催化过程,具有广阔的应用前景。迄今为止,多种高温蛋白酶从微生物中被筛选获得,其中一些已经应用于工业生产,如嗜热菌蛋白酶被用来生产二肽甜味剂阿斯巴甜^[2]。尽管微生物高温蛋白酶前景广阔,但仍存在产量较低、成本较高等缺点。国内关于高温蛋白酶高产菌株产酶优化研究仅有少量报道,如唐兵等 2000 年报道以蛋白胨为氮源发酵嗜热脂肪芽孢杆菌 WF146 得到 600 U/mL 粗酶液活力,活泼 2003 年报道以豆饼粉为唯一氮源发酵耐热芽孢杆菌 XJT9503 得到 5 000 U/mL 粗酶液活力,舒丹等 2004 年报道以豆饼粉和麸皮为混合氮源发酵耐热芽孢杆菌 SD-142 得到 650 U/mL 粗酶液活力,彭素萍等 2010 年报道以豆饼粉和麸皮为混合氮源发酵耐热芽孢杆菌 BY25 得到 4 170 U/mL 粗酶液活力^[3-6]。因此菌株产酶能力的提升一直是微生物高温蛋白酶应用研究中的热点问题。

菌株发酵产酶量和菌体浓度紧密相关。近年来,研究者通过高密度细胞培养技术显著提高了产酶菌、特别是产酶工程菌的蛋白酶产量^[7]。与常见产酶工程菌株受单一诱导剂调控不同,野生枯草芽孢杆菌在产酶过程中受到了更加错综复杂的调控^[8-13]。而到目前为止,对野生菌产酶过程中菌量与产量关系的研究仍有待深入。

本文以豆制品废渣为有机氮源,采用响应面法对一株高温蛋白酶高产菌株枯草芽孢杆菌 BY25 进行产酶优化的同时,比较分析了菌体得率和产酶

量对发酵培养基中不同营养因子响应的相关性,以期为系统揭示细菌发酵过程中菌体浓度与蛋白酶得率的关系提供数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株: 高温蛋白酶高产菌株 BY25 由本实验室筛选于河南农田土样,经中国科学院微生物研究所鉴定确认为枯草芽孢杆菌,菌株保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC No.4439)。

1.1.2 培养基: LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 加去离子水定容至 1 L 后调 pH 到 7.0; 发酵培养基(g/L): 豆制品废渣 60, 葡萄糖 60, Na₂HPO₄ 4, CaCl₂ 0.5, 加去离子水定容至 1 L 后调 pH 到 8.0。

1.2 方 法

1.2.1 菌株活化及培养: 于 LB 固体平板上活化, 50 °C 恒温培养 24 h。

1.2.2 种子发酵: 取 250 mL 三角瓶分装 LB 液体培养基 50 mL, 接种于平板上活化的 BY25 后, 于摇床 40 °C、180 r/min 振荡培养 12 h 作为种子液。

1.2.3 高温蛋白酶产酶条件的响应面优化: 将种子液转接到 25 mL 产酶培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 76 h。以碳源、氮源及初始 pH 值为自变量设计响应面发酵实验。本实验采用的响应面设计方法为 Box-Behnken 设计, 如表 1 所示: 共设置三因素三水平实验。实验设置 3 个中心点, 共 15 个处理。因素 1 为碳源葡萄糖(A), 水平设置为 10、35、60 g/L; 因素 2 为氮源豆制品废渣(B), 水平设置为 10、35、60 g/L; 因素 3 为初始 pH 值, 水平设置为 7.0、7.5、8.0。

表1 Box-Behnken 响应面实验设计
Table 1 Experimental range and levels of independent variables

因素 Variables	水平 Levels		
	-1	0	1
A 葡萄糖 Glucose (%)	1.0	3.5	6.0
B 豆制品废渣 Tofu waste (%)	1.0	3.5	6.0
C 初始 pH 值 pH value	7.0	7.5	8.0

1.2.4 粗酶液获取: 发酵结束后取 1 mL 培养液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 所得上清即为粗酶液。

1.2.5 蛋白酶活力的测定: 该酶最佳反应温度为 55 °C, 因此采用福林酚显色法于该温度测定蛋白酶活力。将培养液 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 °C 水浴预热 1 min, 加入 200 μ L 2%酪素溶液, 55 °C 水浴保温 10 min, 迅速加入 600 μ L 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 0.4 mol/L 碳酸钠溶液及

500 μ L 福林酚工作液, 混匀, 40 °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, 其余反应条件相同。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。

1.2.6 枯草芽孢杆菌细胞干重测定: 本实验中培养基中含有大量豆制品废渣颗粒, 无法用常用的滤膜法进行菌体收集。因此我们采用差速离心法来分离菌体和培养基中的难溶固体成分。将发酵液 4 °C 低温 1 000–2 000 r/min 离心 10 min 去除杂质后, 将上清液转移至已称重的烘干离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min 后去上清液, 60 °C 烘至恒重后称菌体干重, 每个实验组设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 菌体干重回归模型建立及数据分析

实验结果如表 2 所示, 测定的单位发酵液中菌体干重与蛋白酶产量并非呈线性相关。通过多元回归分析得到优化后的菌体干重二次多项式方程为: $Y=1.589+0.129A-0.145B-0.143C-0.016AC+0.017BC+0.0004B^2$; Y 是菌体干重, A 是葡萄糖, B 是豆制品废渣, C 是初始 pH 值。

表2 Box-Behnken 实验设计及其结果
Table 2 Box-Behnken design matrix with three independent variables expressed in coded

实验处理 Run	A	B	C	蛋白酶产量 Observed yield by proteolytic activity (U/mL)	菌体干重 Dry cell weight (g/L)
1	0	0	0	11 450	0.81
2	0	1	1	18 253	1.63
3	0	-1	-1	4 843	0.68
4	0	0	0	10 999	0.68
5	1	0	1	8 834	0.37
6	-1	0	-1	8 434	0.56
7	0	0	0	10 599	1.00
8	1	1	0	15 328	1.50
9	1	-1	0	3 447	1.00
10	0	-1	1	4 381	0.44
11	1	0	-1	9 521	1.19
12	-1	1	0	15 000	1.38
13	0	1	-1	14 405	1.00
14	-1	-1	0	6 679	0.38
15	-1	0	1	9 747	0.56

Sen 和 Swaminathan^[14]报道了显著性 ANOVA 分析对测定模型显著的必要性。由回归系数的显著性分析(表 3)可知该模型是显著的, 回归方程中 B 和 B²对 Y 值影响显著, 其他项的系数均不显著, 表明有机氮源豆制品废渣是影响菌体生长的最重要因子。由方程分析结果可知, 该模型决定系数为 0.835, 调整决定系数为 0.711, 失拟项值为 2.14, 信噪比为 7.924。失拟项 P 值为 0.352, 没有显著性影响, 说明二次回归方程拟合度较好, 该模型可以用于分析本次实验数据。

在假定误差是正态分布且相互独立, 同时所有实验处理的误差方差相同时, 残差百分比概率图能有效判定并解释系统性背离。如图 1 所示, 内部学生化残差的正态概率分布图中的样点均紧密围绕在中心线周围, 没有明显的背离。该正态分布图的结果证明了此前假设的正确以及残差相互之间的独立, 同时表明本实验所建立模型有较高的可靠性。

2.2 响应曲面等高线分析 BY25 细菌生长与产酶的关系

将表 2 的实验结果经 Design-Expert 7.16 分析软件处理, 分别绘制蛋白酶产量及菌体干重的响应曲面等高线图, 见图 2 和图 3。可以发现蛋白酶发酵过程中, 观测的各个因子之间普遍存在交互作

用。在不同因素的作用下, 细菌生长对蛋白酶生产的促进作用有显著差异。

2.2.1 不同豆制品废渣添加水平下的细菌生长与产酶的关系: 图 2 表明, 当豆制品废渣(B)添加量处于某一确定水平时, 葡萄糖和初始 pH 值对蛋白酶活力和细菌干重的影响表现出明显的交互作用。等高线图中代表蛋白酶活力的响应面成封闭椭圆形曲面, 椭圆形的中心区域活力最高。豆制品废渣添加量为 10 g/L 时, 产酶高活力区域中心点在葡萄糖添加量 22.8 g/L、初始 pH 值 7.4 处。随着豆制品废渣添加量的增加, 高活力区域的位置向葡萄糖添加量更高、初始 pH 值更高的坐标移动。当豆制品废渣添加量达到实验中最高添加量 60 g/L 时, 高活力区域中心点移动到葡萄糖添加量 35.6 g/L、初始 pH 8.0。同时发现, 细菌生长最优区域位置与高活力区域并不临近。当有机氮源添加量较低时, 细菌生长最优区域集中在葡萄糖添加量 60 g/L、初始 pH 值 7.0 附近, 而该区域蛋白酶活力与高活力中心区域相比降低了 50%。直到豆制品废渣添加量达到 60 g/L 时, 细菌生长的最优区域才一分为二, 分散到坐标为葡萄糖添加量 60 g/L、初始 pH 值 7.0 以及葡萄糖添加量 10 g/L、初始 pH 值 8.0 两个点周围, 其中后者所在区域与高活力区域位置重合。

表 3 响应面模型方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) response surface model for the prediction of cell yield

项 Factor	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	1.945	6	0.324	6.735	0.008 ^a
A	0.174	1	0.174	3.617	0.094
B	1.133	1	1.133	23.534	0.001 ^a
C	0.023	1	0.023	0.480	0.508
AC	0.168	1	0.168	3.493	0.099
BC	0.189	1	0.189	3.932	0.083
B ²	0.258	1	0.258	5.353	0.049 ^a
残差 Residual	0.385	8	0.048		
失拟 Lack of fit	0.333	6	0.056	2.144	0.352
纯误差 Pure error	0.052	2	0.026		
合计 Cor total	2.330	14			

$R^2=0.835$, 调整 $R^2=0.711$, 信噪比=7.924

注: ^a: $P < 0.05$ 为显著。

Note: ^a: $P < 0.05$ is significant.

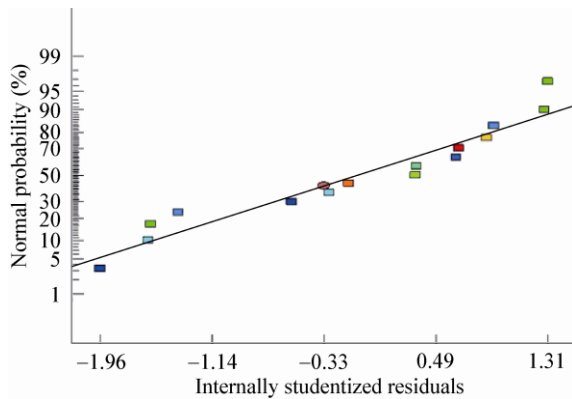


图 1 细胞干重得率的正态概率分布图

Figure 1 The normal probability of the dry cell weight yield

当豆制品废渣添加量为 10 g/L 时, 细菌最高产酶活力为 6 060 U/mL, 所需葡萄糖为 22.8 g/L; 当豆制品废渣添加量增加 2.5 倍达到 35 g/L 时, 细菌最高产酶活力增加 86.5% 达到 11 300 U/mL, 细菌所需的葡萄糖量增至 28.8 g/L, 仅提升 26.3%, 而当豆制品废渣添加量增加 5 倍达到 60 g/L, 细菌最高产酶活力增加 1.9 倍达到 17 400 U/mL, 细菌所需的葡萄糖量增加到 35.6 g/L, 仅提高了 56.1%。该结果表明, 发酵液中酶活力大幅提高需要消耗大量的有机氮源, 但只需消耗少量的葡萄糖。进一步研究细菌干重等高线图可以发现, 菌体干重在 pH 7.0、

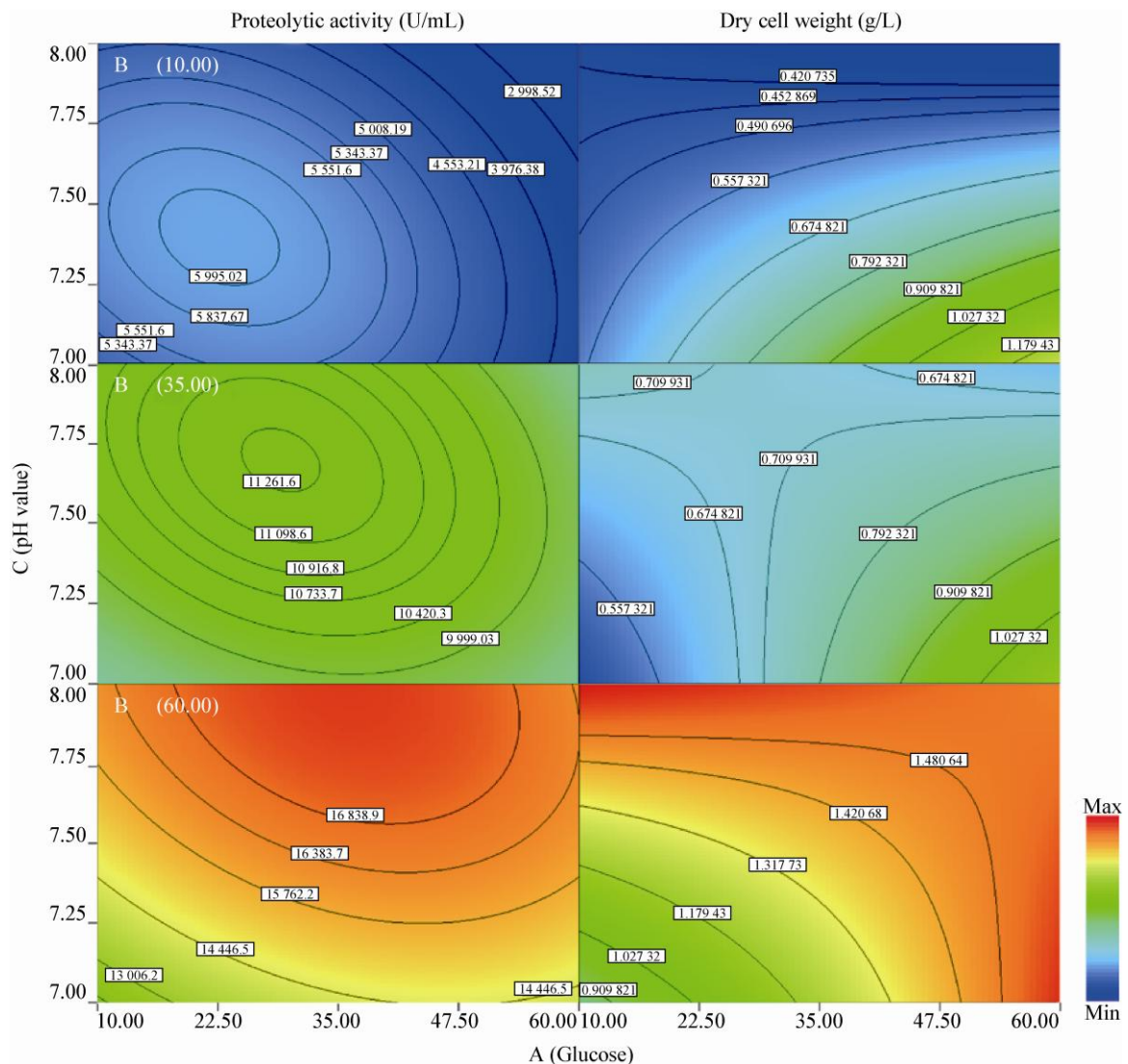


图 2 初始 pH 值与葡萄糖交互作用等高线图

Figure 2 Contour plots exhibiting the interactive effects between initial pH and glucose (other variables were held at their respective levels)

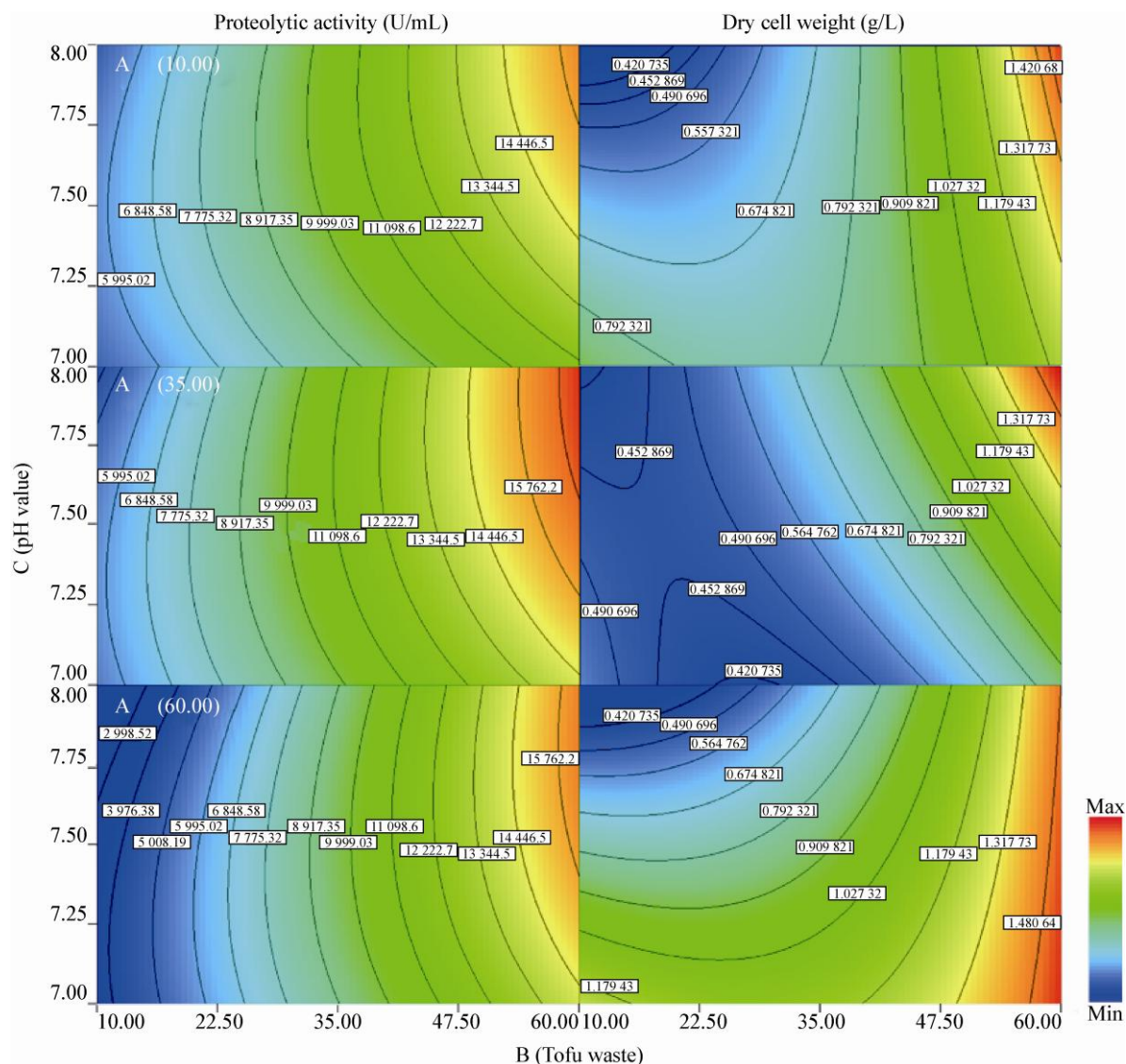


图3 初始 pH 值与豆制品废渣交互作用等高线图

Figure 3 Contour plots exhibiting the interactive effects between initial pH value and tofu waste (other variables were held at their respective levels)

葡萄糖添加量 60 g/L 时达到最大值,而此时 BY25 产酶量为最低值。高碳源中性条件为枯草芽孢杆菌 BY25 的最佳生长条件,但该条件不适合菌体产酶。此外,在豆制品废渣添加量为 10 g/L 时,发酵初始 pH 值的适当提高能促进产酶,但对细菌的生长有明显抑制作用。当豆制品废渣添加水平提高到 35 g/L 以上时,发酵初始 pH 值的升高对菌体生长的响应开始改变,随着豆制品废渣添加量的增加,

初始 pH 值升高对细菌生长的促进作用越发明显。

随着豆制品废渣添加量的提高,细菌量和产酶量的相关性明显提高,如图 2 所示在豆制品废渣添加 10 g/L 水平下,蛋白酶活力最高的区域为葡萄糖添加量 22.8 g/L 初始 pH 7.4,该点细菌干重为 0.587 g/L,是该水平细菌最大干重值的 47.3%;在豆制品废渣添加 35 g/L 水平下,蛋白酶活力最高的区域(葡萄糖添加量 28.8 g/L,初始 pH 7.7)中心

点对应的细菌干重为 0.701 g/L, 是该水平细菌最大干重值的 61.4%; 在豆制品废渣添加 60 g/L 水平下, 蛋白酶活力最高的区域(葡萄糖添加量 35.6 g/L, 初始 pH 8.0)中心点对应的细菌干重为 1.539 g/L, 是该水平细菌最大干重值的 96.3%。综合以上结果可以得到如下结论: 菌体的生长量和产酶量并不一定具有一致性, 甚至在低有机氮源条件下, 菌体的生长反而抑制了产酶。

2.2.2 不同葡萄糖添加水平下细菌生长与产酶的关系: 如图 3 所示, 在不同葡萄糖(A)添加水平下, 菌体量和产酶量的响应较为一致, 菌体密度和蛋白酶活力最高的区域均为最高初始 pH 值和豆制品废渣添加区域, 体现出了良好的一致性。该结果表明, 在碳源添加量固定时, 同时作为有机氮源和产酶诱导剂的豆制品废渣, 能够同时促进菌体生长和产酶。

3 讨论

高温蛋白酶高产菌株 BY25 最高生长温度为 55 °C, 最适生长温度为 50 °C, 属于耐热菌^[15]。该菌所分泌的高温蛋白酶在 55 °C 有最高蛋白水解活力, 粗筛中产酶量为 304 U/mL, 经初步优化培养条件后达到 4 170 U/mL^[6]。通过产酶优化实验发现该菌最佳产酶培养基为(g/L): 葡萄糖 35.6, 豆制品废渣 60, Na₂HPO₄ 4, CaCl₂ 0.5。培养 76 h BY25 发酵上清液蛋白酶 55 °C 酪素水解活力高达 18 000 U/mL, 有较高的应用研究潜力。

研究者于 20 世纪 30 年代发现, 细菌在只添加无机氮源的情况下几乎不产生蛋白酶, 深入研究后发现在培养基中添加可以作为蛋白酶底物的有机氮源能有效促进蛋白酶的产生^[8-9], 因此认为微生物蛋白酶的产生方式为底物诱导型。大豆蛋白胨、豆饼、豆粕等大豆制品是促进微生物产蛋白酶的优选有机氮源, 基于该类有机氮源进行的高温蛋白酶培养优化实验多有报道^[3-6]。本实验以豆制品废渣为唯一氮源发酵芽孢杆菌 BY25 产酶, 同样得到了较高的蛋白酶粗酶液活力, 验证了大豆有机氮源对芽孢杆菌高温蛋白酶生产的促进作用。

枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶大量表达于细菌生

长稳定期, 要得到较高的蛋白酶产量, 是否首先要使细菌达到高密度仍然存在争议。Veening 等^[16]通过分子生物学和荧光显微技术观测了枯草芽孢杆菌生长平稳期细胞亚群的分化, 发现只有极少数细胞会分化为蛋白酶分泌型。López 和 Kolter^[17]将这些能够大量分泌蛋白酶的细胞称作“矿工”细胞, 而整个细菌群体中环境受胁迫后分化为产酶细胞的数量决定着该类枯草芽孢杆菌产酶能力的高低。该类细胞的增加与菌体受到底物诱导乃至外界环境改变的胁迫有关^[18]。在前期实验中 BY25 被发现在 30 °C, 而不是细菌最适生长温度 50 °C 有最高产酶量, 即 30 °C 发酵获得的发酵液在 55 °C 测定蛋白酶水解活力较 50 °C 获得的发酵液更强, 该结果表明枯草芽孢杆菌的菌体生长和产酶之间的关系并非线性相关。本实验发现在不同水平下细菌量对产酶的促进作用有明显差异, 且受到各种培养因素的影响, 特别是随着豆制品废渣的添加, 细菌量增加对蛋白酶产量的影响从抑制转为促进, 表明细菌中产酶菌比率可能有显著提升。这些研究成果暗示, 细菌的不同个体对产酶的贡献并不均等, 在绝对数量上提升菌量, 并不一定能提高产酶菌占菌体总量的比率。

与单纯的提高菌量相比, 蛋白酶发酵过程中菌量和产酶量的关系则受到合适的诱导剂更加显著的影响。Cho 等和 Kwon 等分别于 2010 年和 2011 年发表了关于以蛋白胨为有机氮源, 通过分批发酵和分批补料发酵的方法进行高密度枯草芽孢杆菌培养以得到高蛋白酶产量的实验结果, 最高蛋白酶活力达到 14 500 U/mL 时, 发酵液中的枯草芽孢杆菌细胞干重高达 60 g/L^[19-20]。本实验以豆制品废渣为有机氮源进行发酵优化实验, 发现当添加量提高后, 除产酶量增加外, 菌量和产酶量的关系也显著提升。当蛋白酶活力达到 18 000 U/mL 以上时, 所对应的枯草芽孢杆菌细胞干重仅为 1.63 g/L。该结果表明, 以豆制品废渣为氮源发酵过程中营养细胞分化为产酶细胞的比率很可能远高于以蛋白胨为有机氮源的高密度发酵。相对于通过高密度培养提

高产酶量,通过优选诱导物提高产酶菌比率来提高产酶量应有更高的效率。我们下一步将在发酵罐水平上对该现象进行进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sana B, Ghosh D, Saha M, et al. 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 Biochemistry*, 2006, 41(1): 208-215.
- [2] Yagasaki M, Hashimoto S. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(1): 13-22.
- [3] 唐兵, 周林峰, 陈向东, 等. 嗜热脂肪芽孢杆菌高温蛋白酶的产生条件及酶学性质[J]. *微生物学报*, 2000, 40(2): 188-192.
- [4] 活泼. 高温中性蛋白酶及其产生菌的初步研究[J]. *工业微生物*, 2003, 33(2): 30-33.
- [5] 舒丹, 李宏, 严建华, 等. 高温芽孢杆菌碱性蛋白酶发酵条件及酶性质研究[J]. *四川大学学报*, 2004, 41(4): 856-860.
- [6] 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.
- [7] 齐士朋, 徐尔尼, 罗玉芬, 等. 细胞高密度培养技术的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(2): 139-143.
- [8] 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.
- [9] Semets EV, Glenn AR, May BK, et al. Accumulation of messenger ribonucleic acid specific for extracellular protease in *Bacillus subtilis* 168[J]. *Journal of Bacteriology*, 1973, 116(2): 531-534.
- [10] Pierce JA, Robertson CR, Leighton TJ. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology Progress*, 1992, 8: 211-218.
- [11] Fisher SH. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(2): 223-232.
- [12] Abe S, Yasumura A, Tanaka T. Regulation of *Bacillus subtilis aprE* expression by *glnA* through inhibition of *scoC* and δ^D -dependent *degR* expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(9): 3050-3058.
- [13] Kunst F, Rapoport G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(9): 2403-2407.
- [14] Sen R, Swaminathan T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 21(2): 141-148.
- [15] Madingan MT, Martinko JM, Parke J. 微生物生物学[M]. 杨文博, 译. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] Veening JW, Igoshin OA, Eijlander RT, et al. Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2008, 4: 184.
- [17] López D, Kolter R. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(2): 134-149.
- [18] Ogura M, Shimane K, Asai K, et al. Binding of response regulator *DegU* to the *aprE* promoter is inhibited by *RapG*, which is counteracted by extracellular *PhrG* in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(6): 1685-1697.
- [19] Cho YH, Song JY, Kim KM, et al. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*[J]. *New Biotechnology*, 2010, 27(4): 341-346.
- [20] Kwon EY, Kim KM, Kim MK, et al. Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(7): 789-793.