

[文章编号] 1003-4684(2020)05-0065-06

# 变温控制策略促进地衣芽胞杆菌合成杆菌肽

宋 昭<sup>1</sup>, 戴 航<sup>1</sup>, 黄雪松<sup>1</sup>, 陈 雄<sup>1</sup>, 陈守文<sup>2</sup>, 李俊辉<sup>3</sup>, 王 志<sup>1</sup>

(1 湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室, 湖北省工业发酵协同创新中心,

湖北省工业微生物重点实验室, 湖北 武汉 430068;

2 湖北大学省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062;

3 绿康生化股份有限公司, 福建 浦城 353400)

**[摘 要]** 地衣芽胞杆菌发酵产杆菌肽的过程中, 菌体前期生长和代谢的强度会影响杆菌肽的合成。为了提高效价, 在 20 L 发酵罐水平研究变温控制策略对效价合成的影响, 发现: 37℃ 发酵温度(对照)下的效价在 21 h 到达最高点(962 U/mL), 平均效价合成速率为 45.33 U/(mL·h)。通过降低发酵培养温度(35.5℃、34℃、32.5℃和 31℃), 可以降低菌体生长速率和糖耗速率, 虽然会降低平均效价合成速率, 但延长了效价合成时间。在 34℃ 发酵温度下以 37.66 U/(mL·h) 的平均效价合成速率至 29 h 到达效价最高点(1092 U/mL), 比 37℃ 条件下提高了 13.5%。基于降温控制策略进行 18 h 前后分别 34℃ 和 37℃ 的变温策略研究, 其平均效价合成速率为 41.14 U/(mL·h), 效价在 29 h 到达最高点(1193 U/mL), 比对照(37℃ 培养)合成周期延长了 8 h, 效价提高了 24%, 也比全程 34℃ 培养提高了 9.2%。该策略增产效果显著, 便于工艺控制。

**[关键词]** 地衣芽胞杆菌; 杆菌肽; 效价; 温度

**[中图分类号]** S816.7 **[文献标识码]** A

地衣芽胞杆菌是一种常见的 G<sup>+</sup> 兼性厌氧菌<sup>[1]</sup>, 可代谢合成部分多肽类抗生素<sup>[2]</sup>。杆菌肽是一种带有噻唑环的多肽复合物, 一般利用非核糖体合成酶系以 Orn、Cys、Ile 等 12 个氨基酸为反应前体进行合成<sup>[3-5]</sup>。其在国内主要通过发酵方式获得<sup>[6]</sup>, 通常在次级代谢过程中大量合成, 而菌体一般在指数生长期结束或平稳期才进入次级代谢过程<sup>[7]</sup>。杆菌肽发酵期间伴有碳分解代谢物阻遏现象(CCR), 即作为速效碳源被消耗的葡萄糖, 会阻止其他碳源的吸收<sup>[8-10]</sup>, 利用一定量葡萄糖后菌体生长速率减慢, 继而由生长转向次级代谢阶段合成产物<sup>[11-12]</sup>。但大量的葡萄糖会诱发菌株发酵期间产生 CCR 效应, 以及产生乙酸等初级代谢副产物<sup>[13]</sup>, 进而抑制次级代谢产物-杆菌肽的合成<sup>[14-16]</sup>。另外, 枯草芽胞杆菌中阻遏 *gapB* 和 *pckA* 的调控因子 CcpN<sup>[17]</sup> 的敲除, 使糖异生途径在对数期运转<sup>[18]</sup>, 细胞的生长速率降低了一半<sup>[19]</sup>。同时, 敲除地衣芽胞杆菌 *ccpN* 能供应更多 NADPH<sup>[17,20]</sup>, 效价合成效率提高 16.06%<sup>[21]</sup>。因此, 效价合成效率与细胞生长速率之间有着紧密的联系。而细胞的生长效率涉

及营养和环境条件的综合作用, 其中, 发酵温度是关键因素之一。

基于以上分析, 本文研究了变温控制策略对地衣芽胞杆菌生长、代谢和杆菌肽合成效率的影响, 建立了有效的变温发酵策略以提高效价。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

地衣芽胞杆菌 DW2 (*Bacillus licheniformis* DW2, DW2 菌株), 湖北大学绿康生物工程研究所提供。

### 1.2 培养基

茄子瓶斜面培养基: 酵母浸膏 20 g/L, NaCl 5 g/L, 琼脂 20 g/L, 调 pH 7.5, 每个茄子瓶装入 60 mL。

种子培养基: 豆粕 30 g/L, 玉米淀粉 20 g/L, 轻质碳酸钙 2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, 每个 250 mL 摇瓶装入 50 mL。

发酵培养基: 豆粕 50 g/L, 玉米淀粉 30 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 轻质碳酸钙 3 g/L, 硫酸铵 0.75 g/L。

[收稿日期] 2020-03-24

[基金项目] 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室开放课题(SKL BEE2018005)

[第一作者] 宋 昭(1996-), 男, 湖北黄石人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为微生物发酵

[通信作者] 王 志(1971-), 男, 山东招远人, 湖北工业大学教授, 研究方向为微生物发酵

### 1.3 培养方法

**1.3.1 种子活化** 用无菌接种环刮取 $-80^{\circ}\text{C}$ 甘油管中的菌液,均匀涂抹至茄子瓶后, $37^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

**1.3.2 种子培养** 准备好无菌竹签和50 mL水,用竹签和水刮洗长满菌苔的茄子瓶后将菌悬液转入灭菌的250 mL摇瓶,接种量8%,即将4 mL菌悬液接于种子瓶中(接种后50 mL)。 $37^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min培养24 h,得到种子液。

**1.3.3 20 L发酵罐培养** 20 L罐上接种量为5%(接种后10 L),在通风量 $1.0\text{ m}^3/\text{h}$ 、温度 $37^{\circ}\text{C}$ 、罐压 $0.03\text{ MPa}$ 、转速500 r/min条件下发酵培养。

**1.3.4 20 L罐发酵策略控制** 发酵1:发酵温度为 $37^{\circ}\text{C}$ ,以发酵培养基进行培养;发酵2:发酵温度 $35.5^{\circ}\text{C}$ ,其他保持不变;发酵3:发酵温度 $34^{\circ}\text{C}$ ,其他保持不变;发酵4:发酵温度 $32.5^{\circ}\text{C}$ ,其他保持不变;发酵5:发酵温度 $31^{\circ}\text{C}$ ,其他保持不变;发酵6:阶段变温实验A,0—18 h设定在 $37^{\circ}\text{C}$ ,18—30 h设定在 $34^{\circ}\text{C}$ ;发酵7:阶段变温实验B,0—18 h设定在 $34^{\circ}\text{C}$ ,18—30 h设定在 $37^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.4 分析方法

**1.4.1 葡萄糖的测定** DNS法测定葡萄糖的含量<sup>[22]</sup>。

**1.4.2 杆菌肽效价测定** 使用Ultimate 3000高效液相色谱测量杆菌肽效价<sup>[16]</sup>,杆菌肽标品 $68.5\text{ U}/\text{mg}$ 。

**1.4.3 生物量的测定** 取发酵液进行平板稀释涂布,得到CFU/mL结果。

**1.4.4 数据处理** 数据结果为最少3组平行试验的均值,通过origin 9.0对数据作图分析。

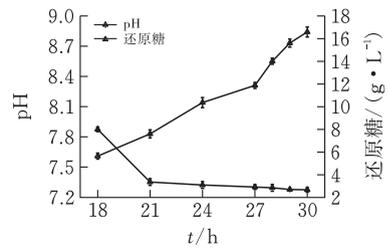
## 2 结果与分析

### 2.1 $37^{\circ}\text{C}$ 对DW2菌体生长和效价合成的影响

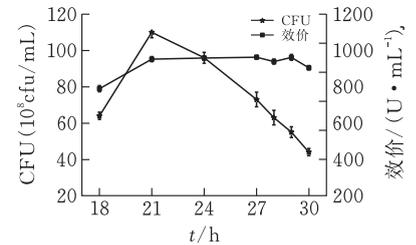
在 $37^{\circ}\text{C}$ 发酵培养条件下,21 h之前处于指数生长期,生物量增长迅猛,并在21 h到达最高点( $110 \times 10^8\text{ CFU}/\text{mL}$ )后自溶,18 h取样pH为7.61,之后一直处于上升的趋势,至30 h发酵结束放罐pH为8.84。18 h杆菌肽效价为 $790\text{ U}/\text{mL}$ ,21 h到达效价最高点( $952\text{ U}/\text{mL}$ ),平均效价合成速率为 $45.33\text{ U}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ 。效价维持稳定6 h后开始降解。18 h残留还原糖 $8\text{ g}/\text{L}$ ,18~21 h还原糖基本耗完,后期还原糖平稳保持在 $3\text{ g}/\text{L}$ 左右,平均糖耗速率为 $1.9\text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。

### 2.2 $35.5^{\circ}\text{C}$ 对DW2菌体生长和效价合成的影响

敲除糖异生途径调控因子CcpN对菌体生长和杆菌肽合成的影响<sup>[19]</sup>,由此可以看出杆菌肽的合成效率与细胞生长速率有紧密的联系。而细胞的生长



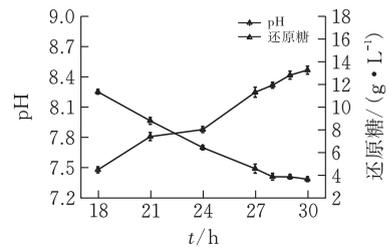
(a) 菌体生长



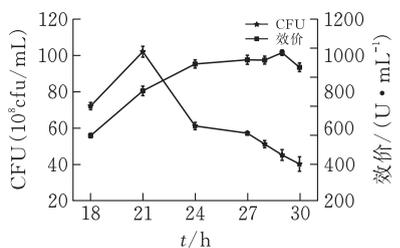
(b) 效价合成

图1  $37^{\circ}\text{C}$ 对DW2的影响(数据为平均值±标准偏差)

效率涉及营养和环境条件的综合作用,其中,发酵温度是关键因素之一。因此,为了降低生长速率和糖耗速率,考虑调低温度进行发酵培养,形成发酵策略2, $35.5^{\circ}\text{C}$ 培养条件下的发酵过程相关参数变化如图2所示。



(a) 菌体生长



(b) 效价合成

图2  $35.5^{\circ}\text{C}$ 对DW2的影响(数据为平均值±标准偏差)

$35.5^{\circ}\text{C}$ 发酵条件下生物量在21 h到达最高点( $102 \times 10^8\text{ CFU}/\text{mL}$ ),只有发酵1生物量最高点的93%,21 h后菌体发生了自溶。18 h取样pH为7.48,一直上升至30 h发酵结束放罐pH为8.47,各取样点的pH值都低于发酵1。18 h残留还原糖 $11.37\text{ g}/\text{L}$ ,比发酵1多出42%,即降温降低了糖耗速率,18~28 h期间,还原糖基本耗完,平均糖耗速率为 $1.43\text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。另外,18~21 h是效价合成效率最高的阶段,18 h效价为 $557\text{ U}/\text{mL}$ ,低于发酵

1 的起步效价,到达效价最高点时间比发酵 1 推迟了 8 h,29 h 效价最高点为 1014 U/mL,比发酵 1 提高了 5.4%,最终发酵 2 的平均效价合成速率只有 34.97 U/(mL·h)。说明通过降温会降低效价合成效率,但是延长了效价的合成时间,因此最终效价提高了 5.4%。

### 2.3 34℃对 DW2 菌体生长和效价合成的影响

降温至 35.5℃发酵提高了效价,因而考察了进一步降低发酵温度至 34℃对有关发酵参数的影响(图 3)。

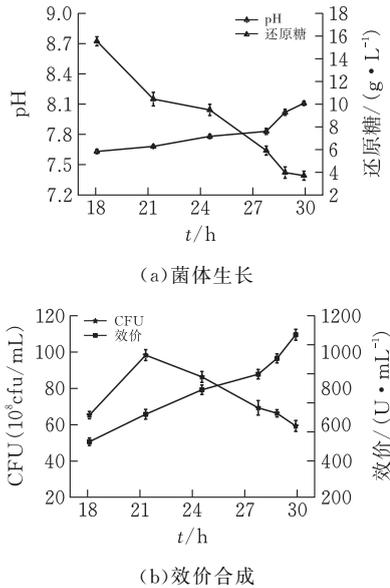


图 3 34℃对 DW2 的影响  
(数据为平均值±标准偏差)

在 34℃发酵条件下,菌体生长周期和之前保持一致,pH 也一直处于上升趋势,18h 的 pH 为 7.63,发酵结束时 pH 为 8.11,pH 增长趋势比发酵 1 和 2 缓慢,21 h 到达生物量最高点(98×10<sup>8</sup>CFU/mL),比发酵 2 生物量降低 3.9%,21 h 后菌体仍然自溶。18h 还原糖浓度 15.58g/L,比发酵 2 还原糖多出 37%,平均糖耗速率为 1.4g/(L·h)。说明:降温 34℃培养进一步减少了糖耗和生长速率。同时,18h 的效价为 503U/mL,比发酵 2 降低了 9.7%,但 18~27 h 维持效价平稳增长,27~29 h 的效价合成效率甚至更高,到 29 h 效价最高点 1092 U/mL。由于此时 pH 处于碱性且菌体持续自溶,不利于继续合成效价,另外,还原糖数据显示在 28~29 h 碳源已然供应不足,说明之后杆菌肽合成缺乏能量供应,故未检测 30 h 样品,虽未出现效价拐点,但结合碳源消耗和菌体自溶情况可知,34℃培养 29 h 已接近效价最最高点,平均效价合成速率为 37.66 U/(mL·h),发酵期间效价合成速率稳定持久。降温培养降低了对数期的糖耗和生长速率,有利于后期杆菌肽的合成,最终对比发酵 2 提高了

7.7%。

### 2.4 32.5℃对 DW2 菌体生长和效价合成的影响

34℃培养条件下,效价最高点相比 35.5℃又有了进一步的提高,因此,继续考察了 32.5℃发酵条件对发酵期间相关参数的影响(图 4)。

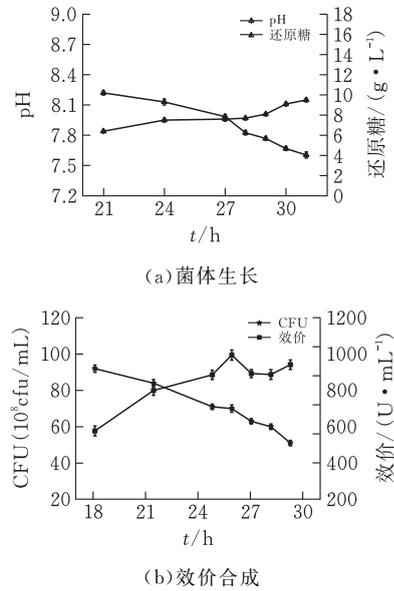


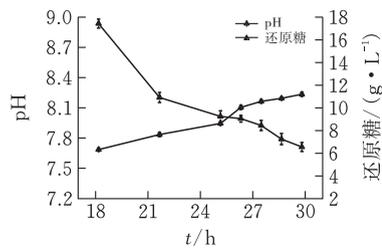
图 4 32.5℃对 DW2 的影响  
(数据为平均值±标准偏差)

在 32.5℃发酵温度下,pH 变化趋势与发酵 3 一致,21 h 起步 pH 比发酵 3 较高,31 h 放罐 pH 为 8.15,pH 增长速率比发酵 3 低。发酵 21 h 生物量到达最高点(92×10<sup>8</sup>CFU/mL),比发酵 3 生物量降低 6.1%,21 h 之后菌体自溶;21 h 还残留还原糖 12.2 g/L,比发酵 3 的 21h 残糖多出 16.6%;21~31 h 期间,还原糖基本耗完,平均糖耗速率为 1.29 g/(L·h)。杆菌肽效价在 21~28 h 还是保持增长,在 28 h 到达最高点 995 U/mL,效价虽然比发酵 1 只提高 3.4%,与发酵 2、3 的结果相比却降低了 1.9% 和 8.9%,平均效价合成速率为 35.54 U/(mL·h),说明进一步降温虽然降低了糖耗和生长速率、延长了杆菌肽合成时长,但同样影响了杆菌肽合成效率。

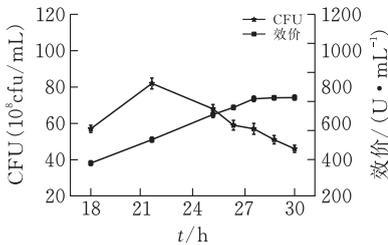
### 2.5 31℃对 DW2 菌体生长和效价合成的影响

为了确证继续降温批发酵会进一步降低杆菌肽效价合成效率,考察 31℃批发酵条件下有关发酵参数的影响(图 4)。

在 31℃发酵条件下,菌体生长周期明显延长,pH 增长趋势和发酵 4 一致,差异不大。菌体 21~24 h 处在对数生长期,生物量在 24 h 到达最高点 82×10<sup>8</sup>CFU/mL,比发酵 4 生物量降低了 10.87%,之后依然存在自溶现象。效价在生长期至自溶期保持了稳定的增长速率,21 h 起步效价 381 U/mL,29 h 到达最高点 735 U/mL,比发酵 4 降低了



(a) 菌体生长



(b) 效价合成

图5 31°C对DW2的影响(数据为平均值±标准偏差)

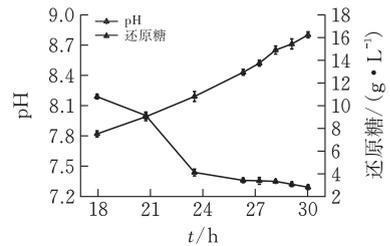
26.1%。21 h 还残留还原糖 17.4 g/L, 比发酵 4 的残糖多出 42.4%, 直到发酵结束 31 h 还有还原糖 6.5 g/L, 平均糖耗速率为 1.2 g/(L·h), 平均效价合成速率仅为 25.34 U/(mL·h)。因此, 34°C 培养是杆菌肽的合成最适条件。

## 2.6 阶段变温 A 对 DW2 菌体生长和效价合成的影响

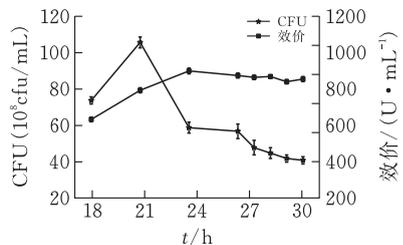
对比发酵策略 1 的结果发现, 在 34°C 发酵条件下, 单位菌体杆菌肽合成速率最高, 效价比对照(发酵 1)提高了 13.5%; 随着发酵温度的降低, 糖耗速率也逐渐降低, 生物量也逐渐减少。考虑到前期主要是菌体生长繁殖, 杆菌肽主要是中后期次级代谢合成, 尝试 0—18h 温度控制在 37°C, 18 h 至发酵结束控制在 34°C, 以此降低生长速率, 减少糖耗, 使更多的碳、氮源用于合成杆菌肽, 形成了发酵策略 6。发酵过程中有关发酵参数的变化如图 6 所示。

阶段变温实验 A 中, 18 h 起步 pH 为 7.82, 发酵期间依旧上升, 31 h 放罐 pH 为 8.80。效价在 24 h 到达最高点 903 U/mL, 比发酵 1 降低了 6%, 比发酵 3 降低了 17.3%。生物量在 21 h 到达最高点  $106 \times 10^8$  CFU/mL, 比发酵 1 生物量最高点少 3.6%, 比发酵 3 生物量最高点多 8.2%, 21—31 h 后菌体一直自溶。18 h 残糖为 10.78 g, 比发酵 3 残糖少 30.8%, 但比发酵 1 残糖多 34.75%, 这是由于灭菌过程产生碳源损耗不同, 或装液量差异使搅拌传质效果不一样产生的糖耗差异, 发酵 6 在 0—18 h、18—21 h 的糖耗速率为 1.85、0.55 g/L, 而发酵 1 在 0—18 h、18—21 h 的糖耗速率为 2、1.55 g/L, 即 18 h 降温能有效降低糖耗速率, 延缓碳源利用。18—27 h 期间, 还原糖基本耗完; 27 h 后还原糖一直在 3 g/L 左右低位维持, 平均糖耗速率为

1.5 g/(L·h), 平均效价合成速率为 37.61 U/(mL·h)。发酵 1 结果说明 37°C 培养时耗糖最快, 同时效价合成效率最高, 降温虽能降低糖耗, 但对比发酵 1 发现 4 次降温都会使效价合成速率降低, 而发酵 6 在 18 h 的残糖稍多于发酵 1, 且后续降温成功延缓碳源消耗, 从而延长效价合成时间, 但效价合成速率的降低带来影响更大, 因此效价最高点只有发酵 1 的 94%; 与发酵 3 相比, 则是发酵前期糖耗较多, 留给中后期次级代谢过程中可利用的碳源较少, 杆菌肽合成所需能量不够, 故发酵 6 效价最高点只有发酵 3 的 83%。



(a) 菌体生长



(b) 效价合成

图6 阶段变温 A 对 DW2 的影响

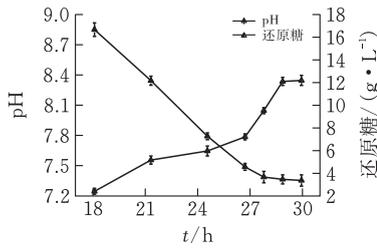
(数据为平均值±标准偏差)

## 2.7 阶段变温 B 对 DW2 菌体生长和效价合成的影响

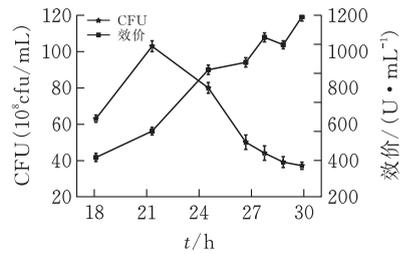
由发酵策略 3 得到启发, 尝试在细胞生长阶段降低温度减少糖耗, 以使更多的碳源用于次级代谢过程。采用了 0—18 h 控制在 34°C 培养, 18 h 至发酵过程结束控制在 37°C, 形成了发酵策略 7, 发酵过程中有关发酵参数的变化如图 7 所示。

阶段变温实验 B 中, 18 h 起步 pH 为 7.25, 上升至 29 h(放罐)的 pH 为 8.35, 同期 pH 都低于发酵 6。生物量在 21 h 到达最高点  $103 \times 10^8$  CFU/mL, 比发酵 1 生物量最高点少 6.4%, 比发酵 3 生物量最高点多 5.1%。18 h 还原糖 16.7 g/L, 是发酵 1 残糖量的 2 倍多, 比发酵 3 残糖多 7.2%; 18—27 h 期间, 还原糖基本耗完, 平均糖耗速率为 1.39 g/(L·h)。18 h 前后分别 34°C 和 37°C 培养的发醇策略, 使菌体前期不至于生长迅速, 耗糖过快, 18 h 菌体生物量为  $63 \times 10^8$  CFU/mL, 和发酵 3 的 18 h 生物量 ( $65 \times 10^8$  CFU/mL) 相差不大, 但比发酵 1 的 18 h 生物量减少 12.5%。后续升温至 37°C 后, 效价在 29 h 到达

最高点 1193 U/mL,比发酵 1 提高了 24%,比发酵 3 提高了 9.2%。平均效价合成速率为 41.14 U/(mL·h)。



(a) 菌体生长



(b) 效价合成

图 7 阶段变温 B 对 DW2 的影响  
(数据为平均值±标准偏差)

发酵 1~7 相关参数见表 1。

表 1 所有试验批次相关参数情况

试验批号	效价/ (U·mL <sup>-1</sup> )	生物量/ (10 <sup>8</sup> CFU·mL <sup>-1</sup> )	生长速率/ (×10 <sup>8</sup> CFU·(mL·h <sup>-1</sup> ))	葡萄糖消耗速率/ (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	平均效价合成速率/ (U·mL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
发酵 1	952	110	5.24	1.9	45.33
发酵 2	1014	102	4.88	1.43	34.97
发酵 3	1092	98	4.67	1.4	37.66
发酵 4	995	92	4.38	1.29	35.54
发酵 5	735	82	3.42	1.2	25.34
发酵 6	903	106	5.02	1.5	37.61
发酵 7	1193	103	4.90	1.39	41.14

表 1 中:效价是发酵期间效价最高点数据,生物量是发酵期间生物量最高点数据;生长速率是最高生物量与时间的比值,葡萄糖消耗速率是葡萄糖消耗量与时间的比值,平均效价合成速率是效价到达最高点与时间的比值。发酵 7 的效价最高,比发酵 1 和 3 分别提高了 24%和 9.2%,而平均效价合成速率仅低于发酵 1。发酵 3 效价仅低于发酵 7,说明适当降温可以减缓生长速率,延长杆菌肽合成时间,提高杆菌肽产量。发酵 6 和 7 对效价合成的影响表明变温控制策略可有效提高效价。

### 3 结论

DW2 菌株发酵产杆菌肽过程中,菌体前期生长和初级代谢强度会影响中后期次级代谢产物—杆菌肽的合成效率。本文研究了降温和变温控制对菌体生长速率、糖耗速率和效价合成的影响,其结论如下:

1)降低发酵温度会明显减少糖耗速率和生长速率,延长杆菌肽合成时间来提高产量,34℃发酵温度下的效价最高点比 37℃提高了 13.5%,到达了 1092 U/mL。

2)18 h 前后分别 34℃和 37℃培养的阶段变温策略满足了杆菌肽合成对细胞数量,能量供应(中后期糖含量)和前体的需求,效价比对照(37℃培养)提高了 24%,比 34℃培养提高了 9.2%,效价在 29 h 到达了最高点(1193 U/mL)。

该策略便于工艺控制,可以为工业生产提供重

要参考。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 唐娟,张毅,李雷雷,等.地衣芽胞杆菌应用研究进展[J].湖北农业科学,2008,47(3):351-354.
- [2] 唐丽娟,纪兆林,徐敬友,等.地衣芽胞杆菌 W10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质[J].中国生物防治学报,2005,21(3):203-205.
- [3] 吴剑波,张致平,微生物制药[M]北京:化学工业出版社,2002:113.
- [4] 余清梅,王明兹,林清强,等.杆菌肽合成分子机制及高产策略[J].农产品加工(学刊),2013(5):28-33.
- [5] Pavli V, Kmetec V. Pathways of chemical degradation of polypeptide antibiotic bacitracin[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(11):2160-2167.
- [6] 邓坤,冀志霞,陈守文.溶氧对地衣芽胞杆菌 DW2 合成杆菌肽的影响[J].中国抗生素杂志,2009(11):664-668.
- [7] 周欣,李宝库.杆菌肽的研究进展及应用[J].科技信息,2010(14):102-103.
- [8] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8):613.
- [9] Juana M. Gancedo. Yeast carbon catabolite repression[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(2):334-361.
- [10] Stülke J, Hillen W. Carbon catabolite repression in bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2

- (2):195-201.
- [11] Nicklin J, Graeme C K, Paget T, et al. Instant Notes in Microbiology[M]. Hong Kong: Bios Scientific Publishers Limited, 1999:5-26.
- [12] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [13] 储炬. 现代工业发酵调控学[M]. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 2006: 129-131.
- [14] 胡尚勤. 杆菌肽高产的代谢调控[J]. 国外医药抗生素分册, 2004, 25(4):160-162.
- [15] 刘铁军, 吴飞. 葡萄糖浓度对杆菌肽发酵过程的影响[J]. 医学信息(中旬刊), 2011, (09):439-440.
- [16] 刘道奇, 陈守文, 王志, 等. 混合碳源对地衣芽胞杆菌发酵合成杆菌肽的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9):52-57.
- [17] Shein S, Abraham L. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(12):917-927.
- [18] Servant P, Le Coq D, Aymerich S. CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA-independent catabolite repression of *Bacillus subtilis* gluconeogenic genes[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(5):1435-1451.
- [19] Tannler S, Fischer E, Le Coq D, et al. CcpN controls central carbon fluxes in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(18):6178-6187
- [20] Liu Z Y, Yu W L, Nomura C T, et al. Increased flux through the TCA cycle enhances bacitracin production by *Bacillus licheniformis* DW2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(16):6935-6946.
- [21] Cai D B, Zhu J, et al. Metabolic engineering of main transcription factors in carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms for enhanced production of bacitracin in *Bacillus licheniformis*[J]. ACS synthetic biology, 2019, 8(4):886-875.
- [22] 曾新年, 鲍帅帅, 李洪杰, 等. 双氧水对地衣芽胞杆菌合成杆菌肽的影响[J]. 中国酿造, 2013, 32(3):94-97.

## Temperature Control Strategy Promoting Bacitracin Synthesis by *Bacillus licheniformis*

SONG Zhao<sup>1</sup>, DAI Hang<sup>1</sup>, HUANG Xuesong<sup>1</sup>, CHEN Xiong<sup>1</sup>,  
CHEN Shouwen<sup>2</sup>, Li Junhui<sup>3</sup>, WANG Zhi<sup>1</sup>

*1 Key Laboratory of Fermentation Engineering of the Ministry of Education, Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation,*

*Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068 China;*

*2 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engin. of Hubei Univ., Wuhan 430062, China;*

*3 Lifecome Biochemistry Co., LTD, Pucheng 353400, China)*

**Abstract:** In the process of *Bacillus licheniformis* fermentation of bacitracin, the strength of pre cell growth and metabolism will affect bacitracin synthesis. In order to improve the potency, the effect of variable temperature control strategy on potency synthesis was studied at the level of 20L fermentor. It was found that the potency at 37°C fermentation temperature (control) reached a high point (962 U/mL) at 21h, and the average potency synthesis rate was 45.33 U/(mL · h). By lowering the fermentation culture temperature (35.5°C, 34°C, 32.5°C and 31°C), the growth rate and sugar consumption rate of the cells could be reduced. Although the average titer synthesis rate would be reduced, the titer synthesis time was extended. At the fermentation temperature of 34°C, the average titer synthesis rate of 37.66 U/(mL · h) reached the high point of titer (1092 U/mL) at 29h, which was an increase of 13.5% compared to 37°C. Based on the cooling control strategy, the temperature change strategies of 34°C and 37°C before and after 18 hours were studied. The average titer synthesis rate was 41.14 U/(mL · h), and the potency reached a high point (1193 U/mL) at 29h, which was 8 hours longer than the control (cultured at 37°C). The potency increased by 24%, and also increased by 9.2% compared to the whole 34°C culture. This strategy has obvious effect of increasing production, easy process control, and can provide important reference for industrial production.

**Keywords:** *bacillus licheniformis*; bacitracin; potency; temperature

[责任编辑: 张 众]