基于 CFD 模拟的七烯甲萘醌发酵过程优化

殷峻杰， 刘 龙， 李江华， 许志国， 汪 坤， 丁 健*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要： 七烯甲萘醌(menaquinone-7，MK-7)是维生素 K_2 的重要组成部分之一，前期研究发现，摇瓶培养条件下 MK-7 的最高产量远高于搅拌釜反应器培养条件下的最高产量。为缩小从摇瓶放大至 3 L 搅拌釜反应器带来的差异，使用计算流体力学(CFD)及动态吸收法对不同转速下摇瓶与搅拌釜反应器内的剪切力及氧气传递性能进行比较，并探讨氧气供应及剪切力对枯草芽孢杆菌 BS20 菌体生长与 MK-7 合成的影响。结果表明，充足的氧气供应对菌体生长及 MK-7 合成有促进作用，但过高的剪切力会对菌体产生破坏作用，降低 MK-7 的产量。基于上述结果，在 3 L 搅拌釜反应器中，以较低搅拌转速(400 r/min)保证低剪切力，同时采用通富氧空气(氧气体积分数 55%)的方式提高供氧水平，MK-7 产量达到 296.25 mg/L，比对照批次(氧气体积分数 21%)提高 152%，达到摇瓶培养最高水平的 79%。本研究在搅拌釜反应器中所采用的降低搅拌转速、提高进气氧体积分数的方法，能够有效提高对剪切敏感且高好氧微生物的发酵性能。

关键词： 搅拌釜反应器；挡板摇瓶；计算流体力学；氧传质速率；剪切力
中图分类号：TQ 920.6　**文章编号：**1673-1689(2023)05-0078-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.05.011

Optimization of Menaquinone-7 Fermentation Process Based on CFD Simulation

YIN Junjie， *LIU Long*， *LI Jianghua*， *XU Zhiguo*， *WANG Kun*， *DING Jian**
（School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract： Menaquinone-7 (MK-7) is one of the significant components of vitamin K_2. Previous studies found that the highest yield of MK-7 under shake flask culture condition was much higher than that cultured under stirred tank reactor (STR). In order to reduce the differences caused by scaling up from the shake flask to 3 L STR, computational fluid dynamics (CFD) and dynamic absorption method were used to compare the shear stress and oxygen transfer performance of the shake flask and STR at different rotational speeds. The effects of oxygen supply and shear stress on the growth of *Bacillus subtilis* BS20 and the synthesis of MK-7 were also explored. The results showed that sufficient oxygen supply could promote the growth of *Bacillus subtilis* BS20 and the synthesis of MK-7, however, excessive shear stress would destroy the bacterial cell and reduce the yield of MK-7. Based on the above results, under the culture condition of the 3 L STR, the lower stirring speed (400 r/min) was used to ensure low shear force, while the oxygen-enriched air (oxygen

收稿日期： 2021-09-27
基金项目： 国家重点研发计划“绿色生物制造”重点专项项目(2021YFC2101100)；2021 内蒙古自治区科技兴蒙引导项目(2021CG0016)。
* **通信作者：** 丁 健(1983—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事发酵工程、发酵过程优化等研究。
E-mail：dingjian@jiangnan.edu.cn

volume fraction 55%) was used to improve the oxygen supply level. The yield of MK-7 reached 296.25 mg/L, which was an increase of 152% compared to the control batch (with an oxygen volume fraction of 21%), and reached 79% of the highest level cultured in shake flask. In this study, reducing the stirring speed and increasing the oxygen volume fraction of the supplied air in the STR can effectively improve the performance of the shear-sensitive but highly aerobic fermentation process.

Keywords: stirred tank reactor, baffled shake flask, computational fluid dynamics, oxygen mass transfer rate, shear stress

生物制品发酵工艺的开发大都需经历实验室小型实验、中间规模实验和工业规模化放大这 3 个阶段。如何恰当结合实际研究与理论分析，对生物反应内在规律及干扰要素进行总结，在工业规模化放大阶段，使大型生物反应器中上述参数与小型反应器中具有一致性，从而使得小型反应器最优培养结果转移到大型生物反应器中加以重演，这便是研究生物反应器放大的目的[1]。虽然在不同规模生物反应器中所发生的生物反应相似，但流体环境、传质方式等却不完全相同，造成细胞生长与代谢产物生成速率等特性存在较大差异，极易导致实验室小试中确定的最优工艺在大型生物反应器中无法达到同样的效果。因此，生物反应器放大是生物反应器设计和发酵工艺开发过程中的重要环节[2]。

七烯甲萘醌（menaquinone-7，MK-7）是维生素 K_2 的重要组成部分之一，是人体必需的营养物质。具有生物活性的 MK-7 主要由微生物发酵产生，发酵生产方式包括固态发酵和液体发酵两种[3]。作者所在研究团队前期研究发现，摇瓶培养条件下 MK-7 的最高产量可达到 360 mg/L，而 5 L 生物反应器培养条件下的最高产量只有 190 mg/L。初步推测，这是由反应器规模的扩大，发酵罐内剪切和溶氧等环境条件与摇瓶内环境条件相差较大所造成的[4]。有研究者分别通过提高搅拌转速和通气量提升 MK-7 的产量，然而效果有限，这是因为他们忽略了在不同的培养条件下供氧量和剪切力之间相互关联[5-6]。对于含有大量活细胞的发酵液，需要较高的搅拌转速以提高氧气传递和改善物料混合性能，但过高的搅拌转速也会带来过高的剪切力，可能影响细胞生长，最终降低目标代谢物的合成效率[7-8]。因此，需将上述因素独立出来，分别考察其对菌体生长及产物合成的影响，最终找到影响菌体生长及 MK-7 合成的关键因素，为 MK-7 发酵过程放大优化提供依据[9]。

作者对摇瓶及发酵罐规模的 MK-7 发酵培养过程进行 CFD 建模和动态吸收法测定，系统表征摇瓶及发酵罐的剪切力和氧气传递性能，并考察培养条件变化对 MK-7 发酵生产过程的影响。最终目的是通过对 3 L 发酵罐培养条件的优化提高 MK-7 产量，实现 MK-7 发酵生产过程从摇瓶规模至 3 L 发酵罐规模的放大。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡萄糖、蔗糖、酵母粉、大豆蛋白胨、NaCl 和 KH_2PO_4：国药集团化学试剂有限公司（中国上海）产品；MK-7 标准样品：美国 ChromaDex 公司产品；甲醇、二氯甲烷、2-丙醇、正己烷：美国 Sigma-Aldrich 公司产品；MK-7 生产菌株枯草芽孢杆菌 BS20：江南大学未来食品科学中心（无锡）提供。

SBA-40C 生物传感分析仪：山东科学院生物研究所提供；C18 ODS 色谱柱（5 μm，250 mm×4.6 mm）：Thermo Fisher Scientific 公司产品；Agilent 1260 高效液相色谱仪：Santa Clara 公司产品。

LB 培养基：酵母粉 5 g，胰蛋白胨 10 g，NaCl 10 g，蒸馏水定容至 1 L；121 ℃灭菌 20 min。

发酵培养基：葡萄糖 50 g，蔗糖 50 g，大豆蛋白胨 50 g，KH_2PO_4 0.06 g，蒸馏水定容至 1 L；115 ℃灭菌 20 min。

1.2 研究方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌 BS20 的摇瓶培养 将工程菌株枯草芽孢杆菌 BS20 在 LB 琼脂平板上进行 37 ℃活化培养后，挑取一环接种至装有 3 mL LB 培养基的 15 mL 试管中，于 37 ℃、220 r/min 条件下振荡8 h 作为种子液。以体积分数为 3%的接种量将种子液接种至含有 20 mL 发酵培养基的 250 mL 挡板摇瓶或无挡板摇瓶内培养 7 d，培养温度为 40 ℃，摇床转速按照实验设计要求分别选用 120、170、220 r/min。

使用不同封口条件对进入摇瓶的氧气量进行调节。每 24 h 取 0.5 mL 发酵液分析 MK-7 产量。

1.2.2 3 L 生物反应器分批发酵实验 在含有 1.5 L 发酵培养基的 3 L 生物反应器中，以分批培养发酵方式生产 MK-7。整个培养过程中,温度控制在 40 ℃,通气量控制为 1.5 L/min。为独立考察剪切与溶氧对发酵过程的影响,采用以下两种不同的溶氧控制方式:1)控制进气氧体积分数为 21%的定值,采用不同搅拌转速(400、600、800 r/min);2)控制搅拌转速为 400 r/min 的定值，采用不同的进气氧体积分数(21%、42%、55%)。每 8 h 取 1 mL 发酵液进行分析,直至发酵结束。

1.2.3 MK-7 萃取 将 2-丙醇和正己烷以体积比 1:2 的比例混合作为萃取剂，然后萃取剂和发酵液以体积比 4:1 的比例从发酵液中萃取出 MK-7。将混合物用涡旋振荡机剧烈振荡 10 min,然后以 7 000 g 离心 5 min 分离两相。最后将萃取得到的 MK-7 有机相用于 HPLC 分析。

1.2.4 分析技术 用去离子水将发酵液稀释至适宜倍数，以 600 nm 波长检测稀释液的吸光度($OD_{600\,nm}$)确定细胞密度。用生物传感分析仪测定培养基中的葡萄糖质量浓度。使用配备有光子二极管阵列紫外检测器和 C18 ODS 色谱柱的高效液相色谱仪测定发酵样品的 MK-7 产量(质量浓度)。进样量为 10 μL,柱温为 40 ℃,流动相由甲醇和二氯甲烷(体积比为 9:1)组成,流量为 1 mL/min。校准和分析所用波长为 254 nm,MK-7 校准曲线在 1~100 mg/L 呈线性(R^2=0.998)。

1.3 CFD 模型建立

1.3.1 摇瓶 CFD 模型建立 摇瓶在摇床上的转动是一种绕转动轴转动的特殊公转,且转动过程中瓶身前后左右 4 个方位保持不变。因此在摇动时,可视为摇瓶不动,摇瓶内的发酵液流体微元受重力及绕该流体微元周期性运动的离心力的共同作用。基于此,对每个流体微元进行受力分析,相应的加速度为:

$$a_x=\omega^2 r\cdot\cos(\omega t) \quad (1)$$

$$a_y=\omega^2 r\cdot\sin(\omega t) \quad (2)$$

$$a_z=g \quad (3)$$

式中:ω 为旋转角速度;r 为摇床的回转半径，本文中保持为常数 0.015;g 为重力加速度;t 为运行持续时间;a_x 为 x 轴方向重力加速度;a_y 为 y 轴方向重力加速度;a_z 为 z 轴方向重力加速度。

采用 Euler-Euler 法对摇瓶内的气液两相流动状态建模,摇瓶内部存在连续的气液两相,两相间存在明显的界面,初始时刻按照装液量确定气液交界面位置对流场进行初始化,过程中采用 VOF 方法对气液两相流动形成的自由表面进行追踪。摇瓶内网格采用四面体网格进行划分,最大网格尺寸小于 1.25 mm。湍流模型选用 RNG k-ε 双方程模型。

1.3.2 发酵罐 CFD 模型建立 为计算不同搅拌速度下的生物反应器中的剪切力,使用商业 CFD 软件包 ANSYS® Fluent 2020 R2 对 Navier-Stokes 方程进行求解。采用 Euler-Euler 双流体模型模拟气液两相流动。将液体选为主要相,空气选为次要相。叶轮的旋转由多重参考系（MRF）方法进行描述，搅拌轴、桨叶及附近流体区域采用旋转坐标系,其他区域采用静止坐标系。气泡设置为球形，直径约为 0.002 m，不考虑破裂和聚结效应。基于 Schiller-Naumann 模型的阻力被考虑在生物反应器的模拟中。此外还应用标准的 k-ε 湍流模型来计算液相的湍流动能和湍流能量耗散。

2 结果与分析

2.1 挡板结构对摇瓶中流场结构的影响

为比较不同培养条件下的摇瓶氧气传质能力及其对枯草芽孢杆菌 BS20 细胞生长及 MK-7 合成的影响,通过流体力学模拟,用体积氧传质系数 k_La 对 250 mL 带挡板摇瓶与无挡板摇瓶中气液界面的氧传质能力进行描述,k_La 越大表示气液界面传质能力越强。k_La 可拆分为用于表征传质界面面积大小的气液比表面积 a 及用于表征液膜传质阻力的氧传质系数 k_L。气液比表面积通常通过下式(4)进行计算:

$$a=\frac{A}{V_L} \quad (4)$$

式中:a 为气液比表面积,A 为摇瓶中的气液界面面积,V_L 为摇瓶中发酵液体积。

描述氧传质系数的方法有 Higbie 的渗透理论、表面更新理论、最小涡旋模型等。本文中采用最小涡旋模型,模型表述如下:

$$k_L=K\sqrt{D_L}\left(\frac{\varepsilon}{\nu}\right)^{1/4} \quad (5)$$

式中:k_L 为氧传质系数;K 为模型常数，本文中取

0.4;D_L 为氧在发酵液中的扩散系数;ε 为平均能量耗散率;ν 为运动粘度。

不同转速下普通摇瓶与带挡板摇瓶的传质系数如图 1 所示。

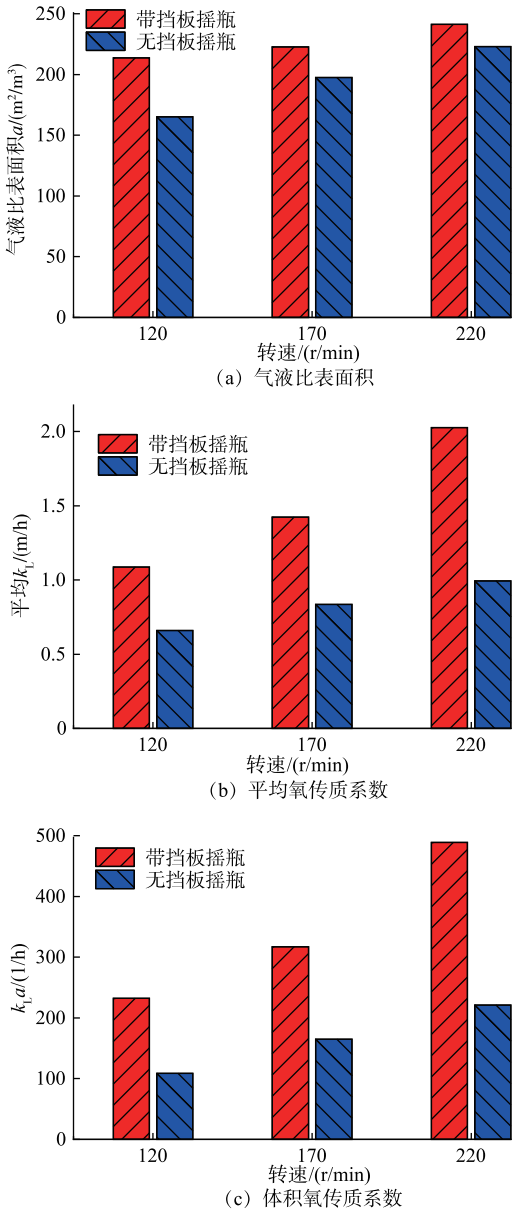


图 1 不同转速下带挡板摇瓶与无挡板摇瓶传质参数流场预测值对比

Fig. 1 Comparison of flow field prediction values of mass transfer parameters between baffled shake flask and non-baffled shake flask at different shaking frequency

由于挡板的存在,相同转速下带挡板摇瓶中的液体表面具有许多褶皱,而无挡板摇瓶中的液体表面则相对光滑。随着转速的提高,无挡板摇瓶及带挡板摇瓶中的液体表面褶皱均增加,能量耗散率增大,最终导致氧传质系数大幅上升。挡板摇瓶的体积氧传质系数甚至能够超过通气时的搅拌釜反应器的传质系数[10],说明气液界面处的传质阻力可能不是摇瓶发酵培养过程中氧气传递的限制性步骤,而氧气传递的限制极有可能来自摇瓶封口处的传递阻力。因此在以下的研究中,将探讨不同封口方式对摇瓶氧气传递的影响。

2.2 不同封口方式对摇瓶氧气传质的影响

在不同搅拌转速下使用动态吸收法对不同封口方式摇瓶的表观传质系数进行测定,结果如图 2 所示[11]。与理论传质系数一致,不同封口膜下带挡板摇瓶及无挡板摇瓶的表观传质系数均随着转速的提高而增大,且相同转速下使用相同封口方式的带挡板摇瓶的传质系数大于无挡板摇瓶。但是这 4 组实验测定的表观传质系数远小于使用 CFD 模拟出的气液理论传质系数,且使用棉花塞的无挡板摇瓶传质系数大于使用一层封口膜的带挡板摇瓶,挡板对传质系数的影响小于封口膜对传质系数的影响,这证明摇瓶培养过程中封口膜的存在对摇瓶中氧气传质起主要限制作用。

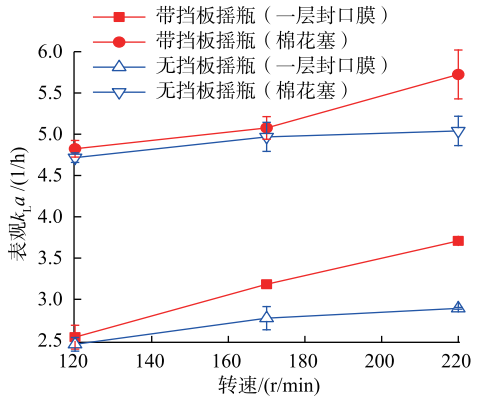


图 2 不同转速及不同类型封口膜下摇瓶表观传质系数

Fig. 2 Apparent mass transfer coefficient of different shaking frequency and different types of sealing films

不同封口方式下的氧通透率在摇瓶静止时使用动态吸收法进行测定,由式(6)进行表述[12]:

$$P_m=\frac{V_L\cdot k_La\cdot C^*_{flask}}{A_0\cdot(P_{atm}-P_{flask})} \quad (6)$$

式中:P_m 为封口膜的氧通透率,A_0 为摇瓶口截面积,P_{atm} 为大气空间的氧气分压,P_{flask} 为摇瓶空间的氧气分压,C^*_{flask} 为与 P_{flask} 相平衡的液相氧饱和浓度。

由公式可知,P_{flask} 越小,$(P_{atm}-P_{flask})$越大,氧传质

系数越大,封口膜通透性越好。从表 1 中可以看出,棉花塞的氧通透率高于一层封口膜,远高于五层封口膜,但是远小于无封口膜时的氧通透率,趋势与转动时的摇瓶表观传质系数一致,进一步说明摇瓶培养时封口膜的存在对摇瓶的氧气传质起限制性作用,且棉花塞传质效果最好,一层封口膜次之,五层封口膜最差。

表 1　不同类型封口膜的氧通透率

Table 1　Oxygen permeability of different sealing films

封口膜种类	封口膜的氧通透率/(mol/(m²·Pa·h))
棉花塞封口膜	0.756
一层封口膜	0.329
无封口膜	9.353
五层封口膜	0.020

2.3　摇瓶与 3 L 搅拌釜反应器气液流场特性对比

为使摇瓶培养结果更好地放大至搅拌釜反应器中，使用 CFD 模拟方法对不同搅拌转速下3 L 发酵罐形成的流场进行详细研究,并将其与摇瓶转动时形成的流场进行对比。

首先比较摇瓶及发酵罐叶轮的单位发酵液体积功率消耗(*P*/*V*),其反映气液传递过程的强弱。图 3 中无挡板摇瓶、带挡板摇瓶及搅拌釜反应器的 *P*/*V* 均随转速的提高而增大，带挡板摇瓶的 *P*/*V* 远大于无挡板摇瓶，且随转速的提高而急剧增大,甚至大于搅拌釜反应器的 *P*/*V*，说明挡板的存在使得挡板摇瓶内的速度分布更加无序,对气液混合作用更大,甚至大于发酵罐中搅拌桨对发酵液的作用。

在对剪切敏感型的细胞培养过程中,要充分考虑反应器内的剪切环境,剪切环境的好坏决定反应器是否适合剪切敏感型细胞的生长。图 4 中对摇瓶及搅拌釜反应器的剪切速率进行比较,无挡板摇瓶的剪切速率之所以小于带挡板摇瓶,是因为挡板的存在使得摇瓶内流体不仅受到容器壁的作用,还会与挡板碰撞,引起液体的凸起和飞溅,剪切速率远大于无挡板摇瓶,甚至超过较低搅拌转速下的搅拌釜反应器。三者的剪切速率均随转速的提高而增大,这是由于随着转速的提高,流体流动速度加快,流体互相之间、流体与容器壁、流体与挡板或叶轮的碰撞作用加强,导致流体受到的剪切速率增大[13]。较低的剪切可促进体系内的气液传质,但随着剪切速率的增大,微生物细胞受到的剪切损伤也逐渐增大,最终影响细胞的正常生长和产物的合成[14]。因

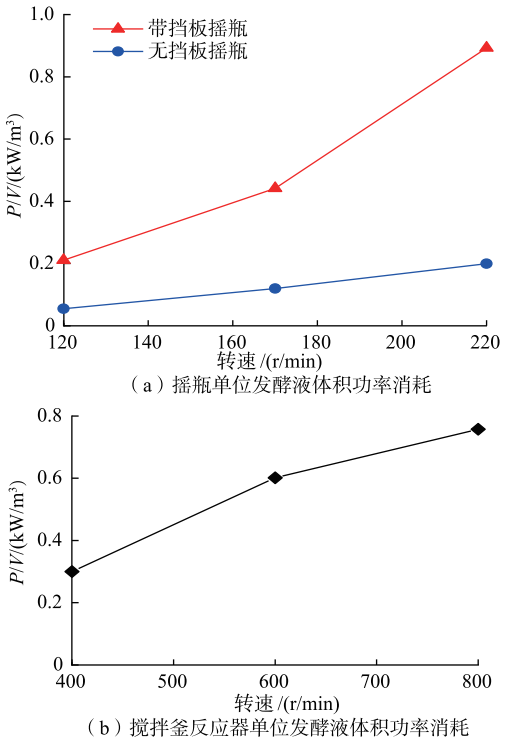


图 3　不同转速下不同生物反应器的单位发酵液体积功率消耗

Fig. 3　Power consumption per unit volume of different bioreactors at different rotational speeds

此,一味提高搅拌转速来提高发酵体系内溶解氧含量的做法不可取。

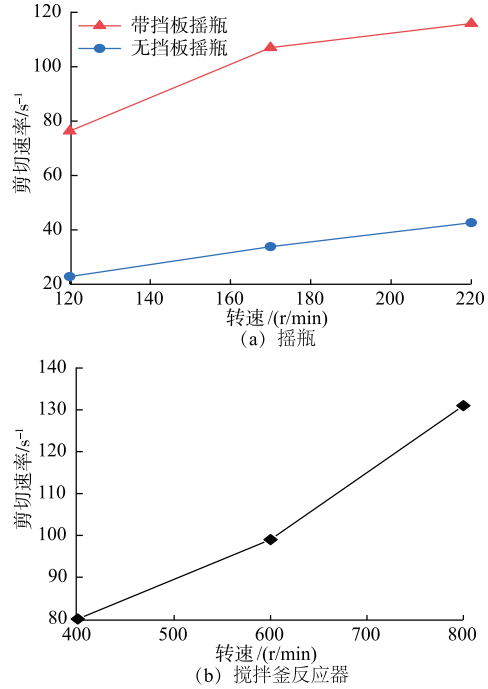


图 4　不同转速下不同生物反应器的剪切速率

Fig. 4　Shear strain rate of different bioreactors at different rotational speeds

本文中还使用 pH 法对不同搅拌转速下搅拌釜反应器中液体混合时间进行测定，并与 CFD 模拟得到的液体混合时间进行对比，以检验 CFD 模型的可靠性。图 5 中列出了不同方法测定的液体混合时间，可知不同方法下测定的液体混合时间均随搅拌转速的提高而降低，且基本吻合，这证明搅拌釜反应器 CFD 模型是准确的。

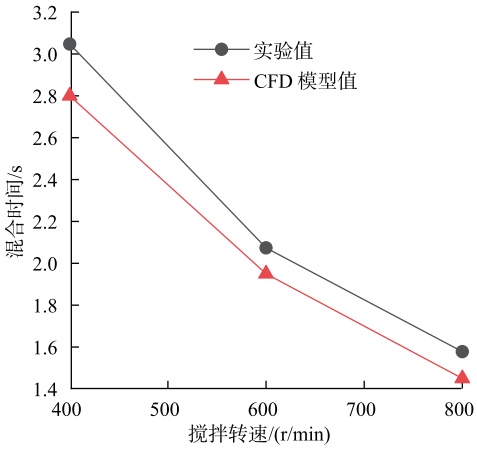


图 5　不同方法测定的液体混合时间

Fig. 5　Liquid mixing time measured by different methods

2.4　摇瓶中不同剪切和氧气传质条件对枯草芽孢杆菌 BS20 发酵性能的影响

上述研究使用 CFD 模拟方法和动态吸收法比较了不同转速及不同封口方式下摇瓶中的剪切力和氧气传质速率。然而在实际的枯草芽孢杆菌 BS20 菌株摇瓶发酵过程中，剪切力(有无挡板)和氧气传质速率(封口方式)对 MK-7 的合成有何影响还尚未可知。以下的研究将比较在不同封口方式(氧气传质速率)下，枯草芽孢杆菌 BS20 在带挡板和无挡板摇瓶中发酵生产 MK-7 的特性。

首先，比较不同封口方式和转速对微生物生长的影响，结果如图 6 所示。首先，使用五层封口膜时，不论转速高低，细胞生长速率和最大 $OD_{600\ nm}$ 值均低于其他封口条件，这显然是由于氧气传质速率过低，发酵液中氧气匮乏造成的。其次，对于使用一层封口膜和棉花塞的批次，在相同的摇瓶类型和转速条件下，细胞生长状态没有显著差异。此外，在中、低转速条件下，培养前期挡板促进氧气传质的特性起主要作用，更有利于细胞的快速生长；培养后期挡板所带来的剪切力起主要作用，加速细胞的死亡($OD_{600\ nm}$ 值降低)。而在高转速条件下，挡板对细胞生长所带来的影响较小。最后，比较不同转速对细胞生长的影响，随着转速的提高，最大 DO 值(溶解氧体积分数)也随之升高，相同转速下无挡板摇瓶生长速率始终慢于带挡板摇瓶。

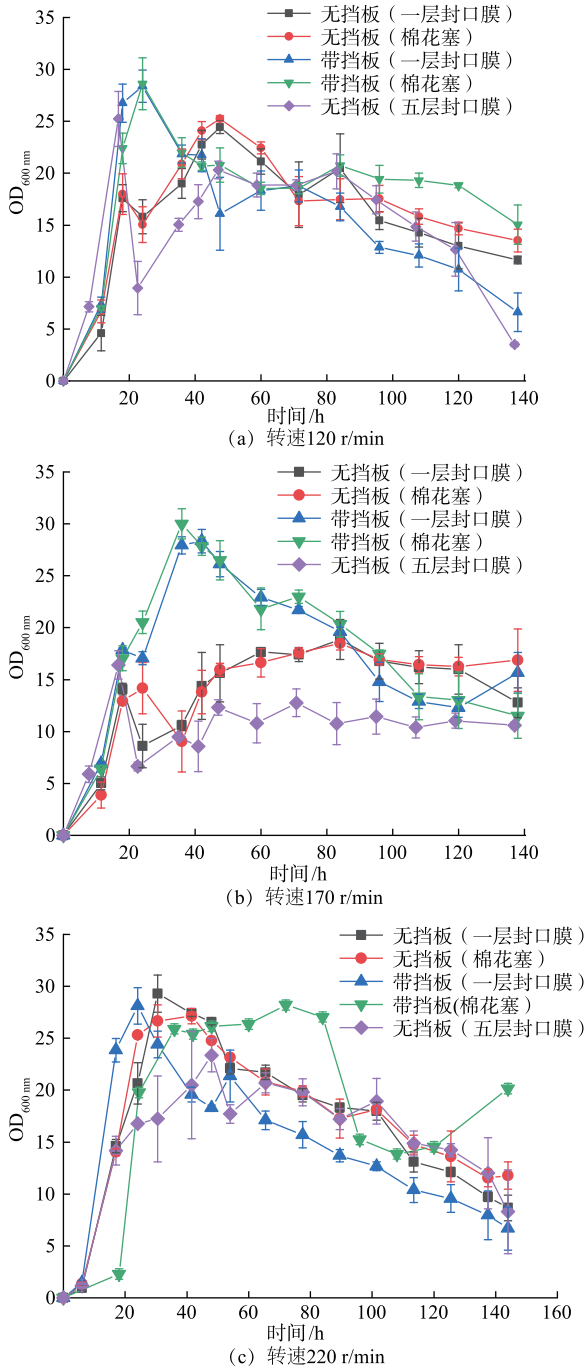


图 6　不同转速及不同封口膜下微生物生长情况

Fig. 6　Microbial growth under different shaking frequency and different sealing films

图 7 中展示不同转速及不同封口条件对产物 MK-7 合成的影响。转速相同时，使用棉花塞封口的

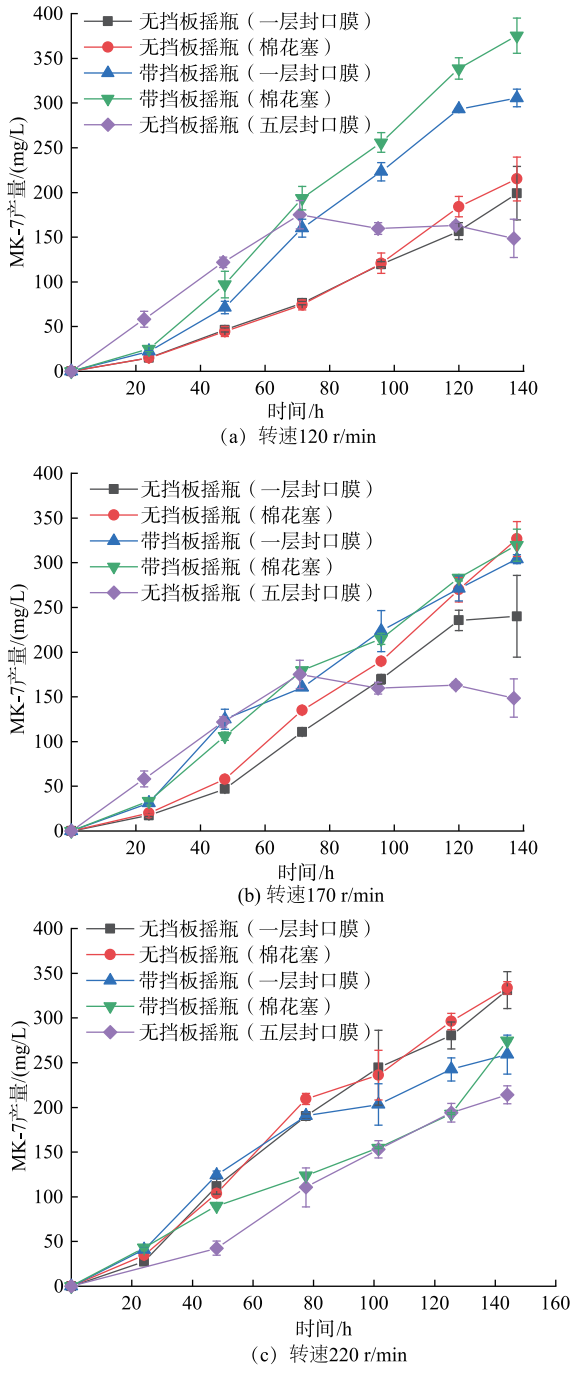


图 7　不同转速及不同封口膜下产物合成情况

Fig. 7　Product synthesis under different shaking frequency and different sealing films

批次 MK-7 产量略高于使用一层封口膜的批次，使用五层封口膜的批次 MK-7 产量最低，说明较高的氧气传质对产物合成具有积极作用。对于无挡板摇瓶培养批次，MK-7 产量随着转速的提高而提高；对于带挡板摇瓶培养批次，MK-7 产量随着转速的提高而降低。说明较小的剪切力更有利于 MK-7 合成，剪切力越大，细胞受到的破坏作用也越大，最终导致 MK-7 产量降低。上述结果证明了摇瓶 CFD 模型的准确性：较小的剪切力对产物合成有促进作用，而较大的剪切力对产物合成有抑制作用。

2.5　3 L 发酵罐流场对枯草芽孢杆菌发酵培养的影响

基于摇瓶培养结果，即采用带挡板摇瓶、棉花塞封口、转速为 120 r/min 的批次具有最高的 MK-7 产量，达到 375.48 mg/L，此时对应的剪切速率为 77 s^{-1}，发酵罐培养时与此剪切速率对应的搅拌转速为400 r/min。为提高 3 L 发酵罐传质速率进而提高发酵体系的氧气供应能力，首先采用不同搅拌转速（400、600、800 r/min）进行发酵培养，探究发酵罐中不同剪切速率及不同氧气传质速率对发酵过程的影响，上述 3 种转速条件下的 OTR（从气体到液体的氧气传输速率）和剪切速率如表 2 所示，发酵性能如图 8 所示。

表 2　不同搅拌转速及不同进气氧体积分数下氧气传质速率（DO=0）

Table 2　Oxygen mass transfer rate under different stirring speeds and different inlet oxygen volume fraction (DO=0)

转速/(r/min)	氧气体积分数/%	OTR/(mmol/(L·h))	剪切速率/s^{-1}
400	21	0.008 7	80
600	21	0.020 1	99
800	21	0.027 6	131
400	42	0.017 4	80
400	55	0.022 9	80

在发酵前期，随着搅拌转速的提高，最大细胞浓度（$OD_{600\,nm}$ 值）和 MK-7 合成速率均增大，且细胞生长速度快，生长周期缩短。然而，使用 800 r/min 的批次培养 20 h 后细胞生长停止，细胞浓度开始大幅度下降，培养 40 h 后葡萄糖消耗也几乎停止，MK-7 合成减缓。而使用 400 r/min 的批次，虽然在前期细胞生长缓慢，最大 $OD_{600\,nm}$ 值也低于前两个批次，却始终能够维持 MK-7 的快速合成，最终的产物产量达到117.54 mg/L，比使用 800 r/min 转速和 600 r/min 转速的批次分别提高 31.6%和 16.4%。发酵前期，高搅拌转速能够提高发酵体系中的氧气供

应，促进细胞的快速生长和 MK-7 的合成；发酵中后期，搅拌转速过高对细胞造成不可逆的损伤，导致耗糖速率急剧下降，最终 MK-7 产量低于采用低搅拌转速的批次，这也证明了关于搅拌釜 CFD 模型的准确性[15]。

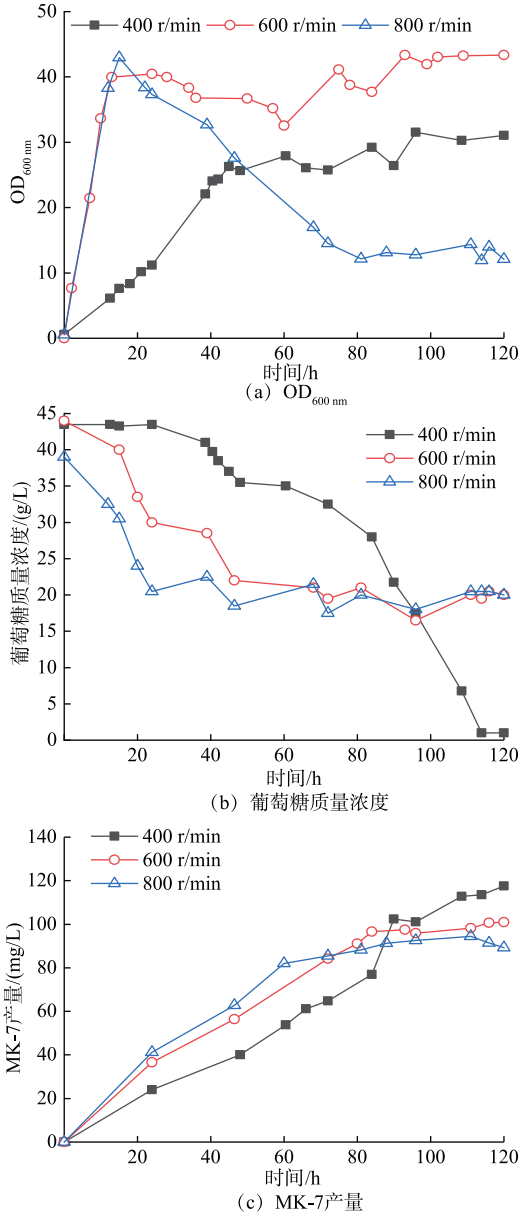


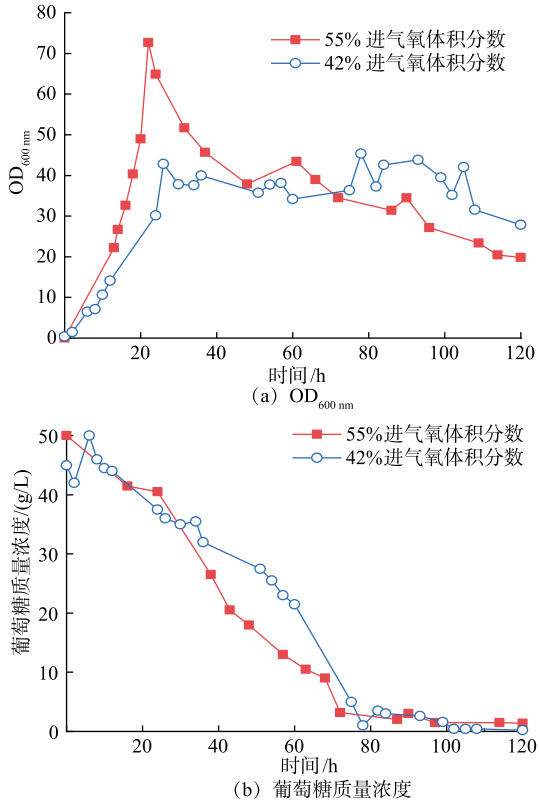
图 8　不同搅拌转速下发酵过程参数

Fig. 8　Fermentation process parameters under different stirring speeds

2.6　富氧空气对枯草芽孢杆菌 BS20 高效合成 MK-7 的影响

在通气量确定的前提下，搅拌转速与发酵体系的氧气供应水平相互关联。在本研究中，细胞生长和合成 MK-7 对氧气的供应有较高的需求，但枯草芽孢杆菌 BS20 细胞却无法承受供氧所需的高转速，采用提高搅拌转速的方式增强氧气供应水平在枯草芽孢杆菌 BS20 菌株生产 MK-7 的发酵过程中不可行[16]。因此，在后续的研究中将在低搅拌转速条件下，利用通富氧空气的方式提高发酵体系中的供氧水平，考察低剪切力、高供氧条件下的枯草芽孢杆菌 BS20 菌株合成 MK-7 的性能。

维持 1.5 L/min 的通气量和 400 r/min 的搅拌转速不变，分别通入氧气体积分数为 42%和 55%的富氧空气供氧，对枯草芽孢杆菌 BS20 菌株进行发酵培养。表 2 中对不同搅拌转速和进气氧体积分数条件下发酵体系的 OTR 和剪切速率进行比较，可看出：相同转速下，OTR 随着进气氧体积分数的提高而提高；相同进气氧体积分数下，剪切速率随着搅拌转速的降低而降低。发酵实验结果如图 9 所示，可以看出，在维持低剪切力水平（搅拌转速为 400 r/min）的前提下，供氧水平越高，葡萄糖消耗越快，细胞生长越快，最大 $OD_{600\ nm}$ 值越高，最终的 MK-7 产量也越高[17]。发酵 120 h 后，采用氧气体积分数为 55%的富氧空气供氧的批次，MK-7 产量达到 296.25 mg/L，比进气氧体积分数为42%和 21%的批次分别提高 73%和 152%。



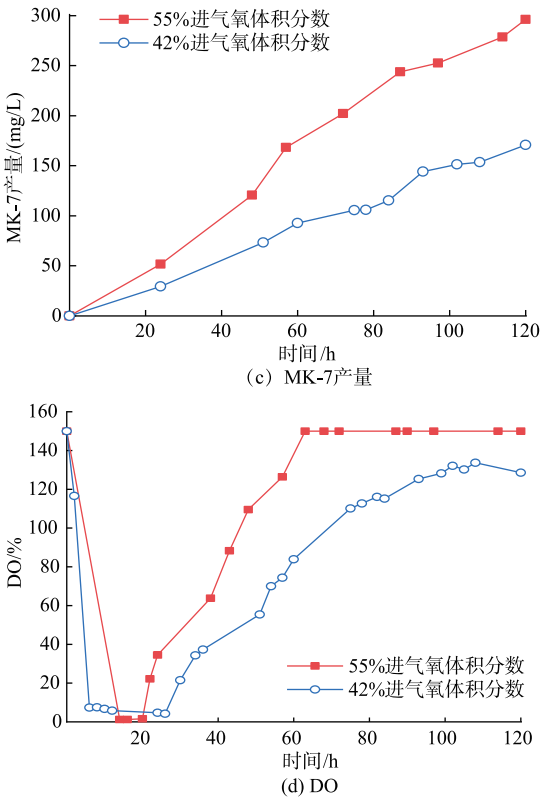


图 9　不同进气氧体积分数下发酵过程参数

Fig. 9　Fermentation process parameters under different supply oxygen volume fraction

然而,从图 9(d)中也可以看出:不论采用 42%还是 55%的进气氧体积分数，细胞生长阶段 DO 均快速下降，细胞浓度达到最大值后 DO 快速上升至较高水平(大于 100%)。对于采用 55%进气氧体积分数的批次,发酵后期 DO 偏高的问题更为突出,极有可能引起细胞的氧中毒。

采用富氧空气供氧,会提高 MK-7 生产过程中的供气成本,但采用富氧空气供氧可通过采用较低的搅拌转速降低部分能耗,同时能提高 MK-7 的产量。因此,只要 MK-7 产量的提高和搅拌能耗的降低能够覆盖供气成本,在工业生产中采用富氧空气供氧也是可行的。在后续的研究中,将会在发酵后期降低进气氧体积分数或通气量,在降低供气成本的同时还有可能进一步提高 MK-7 的产量。针对成本增加的问题,在后续的研究中通过改善发酵罐内部硬件结构(如搅拌桨、通气器、挡板等)提高氧气供应,只需在设备购买安装时一次性付费即可长期使用。

3　结　语

通过比较无挡板摇瓶及带挡板摇瓶的理论传质系数及表观传质系数,表明摇瓶培养过程中封口条件对氧气传质起主要限制作用。进一步研究了氧气供应及剪切力对枯草芽孢杆菌 BS20 菌株生长及 MK-7 合成的影响,结果表明:充足的氧气供应对菌体生长及 MK-7 合成有促进作用,但过高的剪切力会对菌体产生破坏作用,降低 MK-7 的产量。在发酵罐培养条件下,采用较低搅拌转速,利用富氧空气供氧有利于菌体生长和 MK-7 产量的提高。

参考文献:

[1] 夏建业,谢明辉,储炬,等. 生物反应器流场特性研究及其在生物过程优化与放大中的应用研究[J]. 生物产业技术,2018,63(1):41-48.

[2] 宋晓金. 富含 DNA 的裂殖壶菌的工业化生产试验、脂肪酸提取及应用研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2008.

[3] CHEN T C,XIA H Z,CUI S X,et al. Combinatorial methylerythritol phosphate pathway engineering and process optimization for increased menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**,2020,30(5):762-769.

[4] CUI S X,LYU X Q,WU Y K,et al. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. **ACS Synthetic Biology**,2019,8(8):1826-1837.

[5] BERENJIAN A,MAHANAMA R,TALBOT A,et al. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of menaquinone-7[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2014,172(3):1347-1357.

[6] MA X C,ZHU S Y,LUO M M,et al. Intracellular response of *Bacillus natto* in response to different oxygen supply and its influence on menaquinone-7 biosynthesis[J]. **Bioprocess & Biosystems Engineering**,2019,42(5):817-827.

[7] XU Y,ZHONG J J. Significance of oxygen supply in production of a novel antibiotic by *Pseudomonas* sp. SJT25[J]. **Bioresource**

Technology,2011,102(19):9167-9174.

[8] CAI M H,ZHOU X S,LU J A,et al. Enhancing aspergiolide a production from a shear-sensitive and easy-foaming marine-derived filamentous fungus *Aspergillus glaucus* by oxygen carrier addition and impeller combination in a bioreactor[J]. **Bioresource Technology**,2011,102(3):3584-3586.

[9] SONG X Q,ZHANG Y,XUE J Y,et al. Enhancing nemadectin production by *Streptomyces cyaneogriseus* ssp. *noncyanogenus* through quantitative evaluation and optimization of dissolved oxygen and shear force[J]. **Bioresource Technology**,2018,255:180-188.

[10] GARCIA-OCHOA F,GOMEZ E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes:an overview[J]. **Biotechnology Advances**,2009,27(2):153-176.

[11] ZHANG J X,LI X L,LIU H F,et al. Hydrodynamics and mass transfer in spinner flasks:implications for large scale cultured meat production[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2021,167:1-10.

[12] 范代娣,俞俊棠,魏东芝. 摇瓶的体积氧传递系数和氧通透率的测定[J]. 生物工程学报,1994,10(2):114-117.

[13] XIA J Y,WANG Y H,ZHANG S L,et al. Fluid dynamics investigation of variant impeller combinations by simulation and fermentation experiment[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2009,43(3):252-260.

[14] DUAN S B,YUAN G Q,ZHAO Y L,et al. Simulation of computational fluid dynamics and comparison of cephalosporin C fermentation performance with different impeller combinations[J]. **Korean Journal of Chemical Engineering**,2013,30(5):1097-1104.

[15] 冯涛,夏建业,储炬. 带档板摇瓶中形成流场的数值模拟及其对克拉维酸菌种及发酵培养过程影响的分析[J]. 华东理工大学学报,2021,47(5):1-9.

[16] XIA X,LIN S,XIA X X,et al. Significance of agitation-induced shear stress on mycelium morphology and lavendamycin production by engineered *Streptomyces flocculus*[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,2014,98(10):4399-4407.

[17] CUI S X,XIA H Z,CHEN T C,et al. Cell membrane and electron transfer engineering for improved synthesis of menaquinone-7 in *Bacillus subtilis*[J]. **iScience**,2020,23(3):1-31.