

两阶段转速调控对纳豆芽胞杆菌合成维生素 K₂ 的影响

冯静静¹, 吴静¹, 李伟¹, 周梦洁¹, 胡汶松¹,
汪剑¹, 薛正莲^{1,2}, 王洲^{1,2}, 刘艳^{*1,2}

(1. 安徽工程大学 生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 微生物发酵安徽省工程研究中心, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 为进一步提高纳豆芽胞杆菌合成维生素 K₂ 的能力, 根据前期不同转速对维生素 K₂ 产量影响的结果, 在 250 mL 摇瓶中考察转速 0 (产量最大) 和 200 r/min (产量其次) 对菌体生长和产物生成的影响。通过分析不同条件下发酵进程曲线与发酵动力学参数, 并对不同时间点的发酵液进行稀释涂布和扫描电镜观察菌体形态变化, 提出两阶段转速调控策略, 并对影响此调控策略的条件 (温度、转速、pH 和时间) 进行正交优化。0 r/min、108 h 产量最高, 发酵后期菌体形态多为褶皱, 200 r/min 菌体数量高于 0 r/min, 菌体在发酵后期破碎较多, 少数表面平整; 优化后在 40 ℃、pH 6.5、0~36 h 控制转速 220 r/min, 36~132 h 转速为 0 r/min, 维生素 K₂ 的产量为 (35.60±0.13) mg/L, 比优化前 (0、200 r/min) 分别提高了 1.67 倍和 9.674 倍。分阶段调控转速可以有效提高纳豆芽胞杆菌合成维生素 K₂ 的能力, 对维生素 K₂ 的大规模生产具有重要的指导意义和参考价值。

关键词: 纳豆芽胞杆菌; 维生素 K₂; 扫描电镜; 发酵动力学; 正交优化

中图分类号: Q815 文章编号: 1673-1689(2022)02-0037-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.02.005

Effects of Two-Stage Rotational Speed Regulation on Vitamin K₂ Synthesis by *Bacillus subtilis natto*

FENG Jingjing¹, WU Jing¹, LI Wei¹, ZHOU Mengjie¹, HU Wensong¹, WANG Jian¹,
XUE Zhenglian^{1,2}, WANG Zhou^{1,2}, LIU Yan^{*1,2}

(1. College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China; 2. Anhui Engineering Technology Research Center of Microbial Fermentation, Wuhu 241000, China)

Abstract: To further improve the ability of *Bacillus subtilis natto* to synthesize vitamin K₂, the effect of rotational speed (0, 200 r/min) on cell growth and product formation was investigated in 250 mL shake flasks. A two-stage rotational speed control strategy was proposed by analyzing the fermentation process curves and kinetic parameters under different conditions, as well as by observing the morphological changes between the bacteria at different time points after diluting and coating the fermentation broth with scanning electron microscopy. The conditions (temperature,

收稿日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871781; 31772081); 安徽高校自然科学研究重点项目 (KJ2018A0106); 芜湖市科技计划重点项目 (2020yf62); 国家级大学生创新创业项目 (201910363042; 201810363046); 安徽省大学生创新创业计划项目 (201710363178)。

* 通信作者: 刘艳 (1981—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事资源生物技术方面的研究。E-mail: liuyan@ahpu.edu.cn

speed, pH and time) affecting the control strategy were optimized by orthogonal design. When the rotate speed was maintained at 0 r/min, the highest yield of vitamin K₂ was obtained at 108 h and the morphology of bacteria was mostly folded at the later stage of fermentation. When the rotate speed was maintained at 200 r/min, the biomass was higher than that at 0 r/min. The bacteria were broken at the later stage of fermentation, and a few of them had a smooth surface. After optimization, the yield of vitamin K₂ reached (35.6±0.13) mg/L at 40 °C and pH 6.5 when the rotate speed was maintained at 200 r/min from 0 h to 36 h, and maintained at 0 r/min from 36 h to 132 h, which was 1.67 times and 9.674 times higher than that before optimization (0, 200 r/min), respectively. The stage-by-stage control of rotational speed could effectively improve the ability of *Bacillus subtilis natto* to synthesize vitamin K₂, which is of great guiding significance and reference value for the large-scale production of vitamin K₂.

Keywords: *Bacillus subtilis natto*, vitamin K₂, scanning electron microscopy, fermentation kinetics, orthogonal optimization

维生素 K₂(VK₂, MK-*n*)是一种重要的脂溶性维生素,在血液凝固和预防骨质疏松症中发挥重要作用,并具有降低与心血管相关疾病的风险,以及抗肿瘤、改善Ⅱ型糖尿病患者的骨质、改善早期膝关节炎、保护肾功能等作用^[1-3]。据统计,由于人口老龄化、久坐不动和维生素 D 缺乏症日益严峻,导致 2010 年全世界约 900 万例骨折,因此研究预防骨质疏松的高效率产品迫在眉睫^[4]。而维生素 K₂ 作为预防骨质疏松症的有效药物,其价格昂贵、产量低、供不应求。维生素 K₂ 也被称为甲萘醌(menaquinone),它的萘醌环与 4~13 个异戊二烯单元组成的可变侧链相连,生成一系列被称为 MK-*n* 的异构体,其中 *n* 代表异戊二烯单元的个数^[5]。

甲萘醌是呼吸链中重要的电子传递载体,因此很多微生物都可以产生甲萘醌。不同的菌株可以产生不同类型的甲萘醌^[6],纳豆芽胞杆菌(*Bacillus subtilis natto*, Bsn)能够产生 MK-4~MK-8 的 MK 同系物, MK-7 占比可达 96%,而黄杆菌主要产生 MK-4 和 MK-6,一些肠道微生物如乳球菌、肠球菌也可以产生 MKs^[7-9]。纳豆芽胞杆菌具有食用安全的特点以及发酵产生的 MK-7 含量高,被认为是微生物生产 MK-7 最主要和最具有发展潜力的菌株^[10]。近年来维生素 K₂ (MK-7) 的制备和产业化已成为研究的热点。目前,获取维生素 K₂ 的方法主要有微生物发酵法和化学合成法^[11],化学合成法通常具有产生低活性的顺式异构体、副产物以及造成环境污染等弊端,而微生物发酵法所得产品的生物活性较高,因

此广受青睐。

发酵动力学具体研究发酵过程中各个参数之间的关系,包括细胞生长、基质消耗、产物生成速率之间的变化规律以及环境因素对三者的影响^[12-13],三者相辅相成,形成错综复杂的体系。张敏^[14]等人将发酵动力学模型应用于粪肠乳酸球菌产 γ -氨基丁酸(GABA),使 GABA 产量提高了 60.1%。圣亚春^[15]等人基于发酵动力学的分析,使丁醇产量提升了 210.3%。通过发酵动力学分析,能够深入研究微生物的新陈代谢规律,为后续产业化的过程控制以及工艺的优化提供理论支撑。

生物膜(biofilm, BF)是具有高度组织性的微生态系统,是细菌由浮游的单细胞状态转变为静止的多细胞状态的过程,随后的生长导致了有组织的群落以及细胞分化^[16]。它能够附着在非生物介质的表面以及气液相交的界面上,分泌的细胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)主要包括胞外多糖、胞外蛋白、胞外 DNA(extracellular DNA, eDNA),以此来增强对外界不利环境的抗性以及耐受能力^[17-18]。有研究提到枯草芽孢杆菌生物膜的形成有利于维生素 K₂ 的产生^[19]。静置发酵能够产生大量疏水性的生物膜,作者通过分析不同条件下(0、200 r/min)发酵进程曲线与发酵动力学参数,以及对不同时间点的发酵液进行稀释涂布和扫描电镜观察菌体形态变化,明确菌体生长与产物合成之间的关系,根据结果提出分阶段转速调控的方法,并对其发酵条件(温度、转速、初始 pH 和时间)进行正

交优化,进一步提高纳豆芽胞杆菌合成维生素 K₂ 的产量,同时也为大规模生产维生素 K₂ 提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 菌种

纳豆芽胞杆菌 GMCC2108 (*Bacillus subtilis natto*):由作者所在实验室保藏。

1.2 试剂

正己烷、异丙醇、二氯甲烷、甲醇(均为色谱纯)、冰醋酸、结晶紫、乙醇、戊二醛(均为分析纯):购于上海生工。

萃取液为 $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{异丙醇}}=2:1$

流动相为 $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}=1:9$

1.3 培养基

固体培养基(g/L):胰蛋白胨 10,氯化钠 10,酵母粉 5,琼脂 20;pH 7.0,121 °C灭菌 20 min。

种子培养基(g/L):胰蛋白胨 10,氯化钠 10,酵母粉 5;pH 7.0,121 °C灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L):大豆蛋白胨 50,酵母粉 20,甘油 50,K₂HPO₄ 3.86,KH₂PO₄ 1.62;121 °C灭菌 20 min。

1.4 培养方法

将在 LB 固体培养基上活化的纳豆芽胞杆菌接种于种子培养基中,37 °C、200 r/min 培养至对数生长期,以体积分数 2%将种子液接入 50 mL/250 mL 的摇瓶中,37 °C于 0 r/min 与 200 r/min 分别发酵。

1.5 分析方法

1.5.1 生物量的测定 按照 1.4 的培养方法,发酵至相应时间,将菌液全部吸出离心,去除培养基,用 PBS(7.4)缓冲液洗涤 2~3 遍,以完全去除培养基,离心称湿质量,即为生物量(g/L)。

1.5.2 不同转速条件下发酵前期菌落数比较 在不同转速条件下培养至所需要的时间,将发酵液稀释至适当的浓度涂布,在相同浓度下比较菌落数量。

1.5.3 维生素 K₂ 产量的测定 维生素 K₂ 标准曲线以及样品的测定参考文献[19]。

1.5.4 甘油残余量的测定 甘油标准曲线的绘制以及样品的测定参考文献[20]。

1.5.5 扫描电子显微镜样品的制备 样品制备参考文献[21]。

1.6 不同转速下发酵动力学模型的建立

1.6.1 菌体生长模型 Logistic 方程是典型的 S 形曲线,可以很好地反应菌体浓度的增加对自身生长

产生的抑制作用,且达到稳定期后菌体不再生长,纳豆芽胞杆菌的生长过程可以用 Logistic 方程来描述,公式(1)。

$$\frac{dx}{dt}=\mu_m X(1-\frac{X}{X_m}) \quad (1)$$

式中: X 为生物量,g/L; X_m 为最大生物量,g/L; μ_m 为最大比生长速率,h⁻¹; t 为发酵时间,h。

1.6.2 产物生成模型 根据判断细胞生长与产物生成在时间上的关系,可将其分为 3 类。当 $\alpha \neq 0, \beta = 0$ 时为 I 类发酵,即偶联型发酵;当 $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$ 时,为 II 类发酵,即部分偶联型发酵;当 $\alpha = 0, \beta \neq 0$ 时,为 III 类发酵,即非偶联型发酵^[14],见公式(2)。

$$\frac{dP}{dt}=\alpha \frac{dx}{dt}+\beta X \quad (2)$$

式中: P 为维生素 K₂ 产量,g/L。

1.6.3 底物消耗模型 维生素 K₂ 发酵过程中,甘油的消耗主要用于 3 个方面^[22],即甘油分解后产生的 3-磷酸-甘油醛可以与丙酮酸通过 DXP 途径合成维生素 K₂ 的异戊二烯侧链部分;供纳豆芽胞杆菌生长;为维生素 K₂ 的合成提供前体,促进菌体合成维生素 K₂。甘油消耗模型见公式(3)。

$$-\frac{dS}{dt}=\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt}+\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt}+mX \quad (3)$$

式中: S 为甘油质量浓度,g/L; $Y_{x/s}$ 为纳豆芽胞杆菌对甘油得率,g/g; $Y_{p/s}$ 为发酵产物维生素 K₂ 对甘油得率,g/g; m 为维持系数,g/(g·h)。

2 结果与分析

2.1 不同转速下维生素 K₂ 发酵进程曲线及动力学参数分析

研究了不同转速下(0、200 r/min)菌体生长与产物合成的关系,结果见图 1。图中各点为 3 个平行实验的平均值±标准差,当转速为 0 时,菌体能够形成很厚的疏水性生物膜(图 2),使生物量大大提高,在 48 h 时生物量达到最大,为(67.08±2.1) g/L。之后随着生物膜的溶解,生物量随之缓慢下降,发酵结束时生物量为(63.21±1.3) g/L,比转速为 200 r/min 时要高很多。可能的原因是:菌体在形成生物膜之后产生的胞外聚合物对菌体具有保护和抵御外界不良环境的作用,而未形成生物膜的菌体只是一少部分,少量菌体自溶;维生素 K₂ 产量在 108 h 达到最大值,为(21.32±0.08) mg/L。此时,甘油消耗殆尽,无法继续供给菌体生长所需的能量,甘油除

了供微生物生长之外,还能够为维生素 K₂ 的合成提供前体,促进菌体合成维生素 K₂;随后维生素 K₂ 产量的下降主要体现在两方面^[23-24]:一是维生素 K₂ 受到光解作用;二是位于细胞膜上的维生素 K₂ 在纳豆芽胞杆菌的电子传递系统中作为电子载体参与电子传递链。而 pH 的升高是由于蛋白质水解和随之而来的氨化作用导致的^[25]。

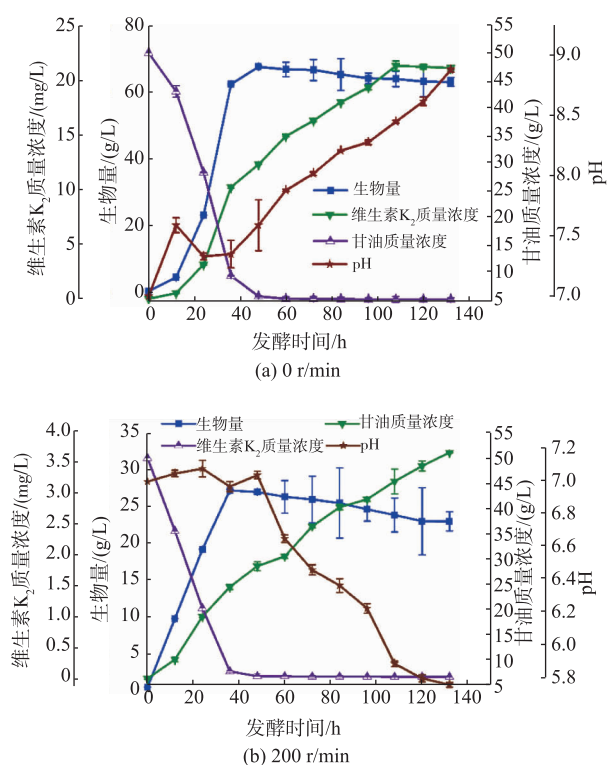


图1 不同恒定转速条件下纳豆芽胞杆菌产维生素 K₂ 发酵进程曲线

Fig. 1 Times courses of VK₂ production by *Bacillus subtilis natto* at various constant rotational speed

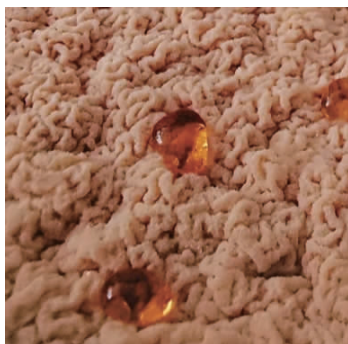


图2 生物膜的疏水性

Fig. 2 Hydrophobicity of biofilms

当增加转速 (200 r/min) 时, 最大生物量为 (27.2±0.2) g/L, 此时甘油所剩无几, 菌体生长受到限制。发酵过程中 pH 总体趋势降低, 可能是由于氮源代谢, 氨基酸中的一NH₂ 被利用后导致 pH 下降, 过低的 pH 影响溶液的化学性质和氧化还原电位, 破坏细胞的结构, 使菌株对基质的利用速率降低, 从而影响产物的合成。发酵结束时维生素 K₂ 的产量为 (3.68±0.09) mg/L, 远低于 0 r/min 时的产量。纳豆芽胞杆菌发酵时会产生表面活性物质和酶类, 可能对细胞结构产生影响, 从而使维生素 K₂ 的合成受到影响。虽然 0 r/min 培养的生物膜生物量高于 200 r/min 培养的生物量, 但是将其稀释涂布, 发现其菌落数量小于 200 r/min 下培养的菌落数量, 见图 3。可能的原因是: 摇动培养时, 细菌能够很快增殖产生大量菌体; 静置发酵时在气液界面产生大量生物膜, 其主要成分为胞外多糖、胞外蛋白质和 eDNA, 生物膜的产生使静置发酵的生物量比摇动培养的生物量高; 测定菌落数时用的是发酵液, 而静置发酵的菌体大部分被生物膜吸附粘连很难洗脱, 因此, 静置发酵的菌落数没有摇动培养的菌落数多。

综上所述, 适合菌体生长的转速和维生素 K₂ 合成所需的最适转速并不统一。据文献[26]报道, 低转速可以使孢子的产生时间推迟, 有利于维生素 K₂ 产量的提高, 而增加转速可以使氧气的供应量升高, 有助于菌体的生长。因此, 恒定的转速不能使菌体生长和产物合成同时达到最佳的效果, 为使两者同时达到最佳状态, 提出分阶段转速控制发酵合成维生素 K₂。

2.2 不同转速下菌体形态的变化

如图 4 所示, 对不同条件下 (0、200 r/min) 的菌体形态利用扫描电镜观察发现, 0 r/min、24 h 时菌体形态正常, 箭头所指为胞外聚合物; 48 h 时菌体表面有轻微褶皱; 96 h 出现大面积褶皱至发酵结束。而在 200 r/min 条件下, 0~48 h 菌体形态正常; 72 h 菌体开始破裂至发酵结束, 但没有破裂的菌体表面润滑平坦。菌体形态产生的差异可能是导致维生素 K₂ 产量产生差异的原因之一。

2.3 不同转速下发酵动力学模型的分析

2.3.1 发酵动力学公式的求解 当 $t=0$ 时, $X=X_0$, $P=P_0$, $S=S_0$, 求得的公式(4)、(5)、(6)分别为:

$$X(t) = \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \quad (4)$$

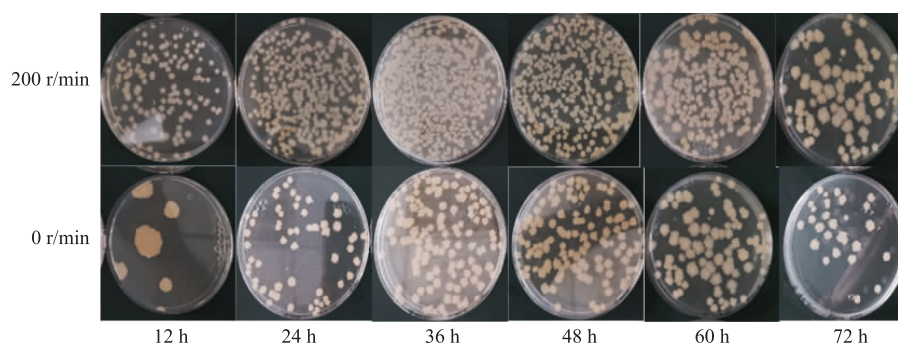


图3 不同转速下培养至12、24、36、48、60、72 h的菌落数量

Fig. 3 Number of colonies between different rotating speeds at 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h

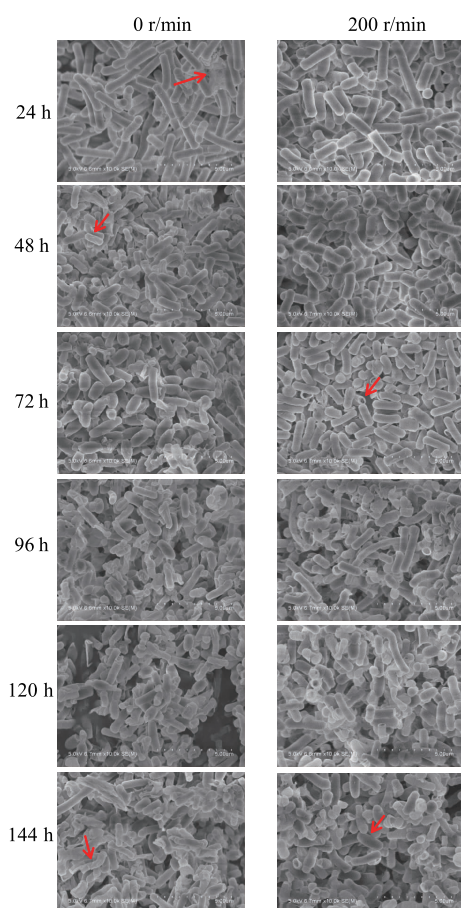


图4 不同固定转速下各时间点的菌体形态

Fig. 4 Morphology of bacteria at different time points at different constant rotational speed

$$P(t) = \alpha X_0 \left(\frac{X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - 1 \right) + \beta \frac{X_m}{X_0} \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t}) \right) \quad (5)$$

$$S(t) = S_0 - \left(\frac{1}{Y_{XS}} + \frac{\alpha}{Y_{PS}} \right) \left(\frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - X_0 \right) - \left(m + \frac{\beta}{Y_{PS}} \right) \ln \left(\frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} \right) \quad (6)$$

将两种不同转速培养条件下的发酵参数作为实验数据,通过1stOpt软件撰写程序,对上述动力学方程采用通用全局优化算法(First Optimization),不需设置初始值,便能找出最优解,根据实验所得数据求出模型最优参数估计值,结果见表1~2。

由表1~2可知,两种转速培养条件下的 α 和 β 值均不为0,说明菌体生长与产物合成之间为部分偶联关系;参数估计值显示静态发酵时 μ_m 、 Y_{PS} 、 Y_{XS} 大于动态发酵时的值,说明静态发酵有利于维生素K₂的生物合成,虽然静态发酵时 X_m 的值比动态发酵时的值要高很多,但是将两种不同条件下的发酵液进行稀释涂布发现静态培养条件下的菌落数明显少于动态培养的菌落数,可能的原因是静态培养条件下产生的生物膜成分主要为胞外多糖、胞外蛋白以及少量的eDNA,使生物膜生物量升高,但菌体数量少于动态培养,证明维生素K₂产量的提高并不是由于生物量的升高而增加,可能是由于产生生物膜之后的一系列生理活动引起的。

对于要想获得更大的维生素K₂产量,通过改变和优化培养条件,尽可能减小维持系数 m ,使得 μ 值变大以及更高的菌体生物量 X ,是提高维生素K₂产量行之有效的方法,通过比较静态与动态发酵的实验值与预估值,从表3~4可以看出,细胞生长、产物合成和底物消耗的预估值与实验值接近,说明此模型能较好地反映纳豆芽胞杆菌在250 mL摇瓶中0、200 r/min发酵过程的动力学。

表 1 0 r/min 发酵动力学参数预估值

Table 1 Parameter estimation of the shake flask(0 r/min) fermentation kinetics model

参数	预估值
$X_0/(g/L)$	0.289 9
$X_m/(g/L)$	65.502 1
μ_m/h^{-1}	0.211 1
α	0.167 3
β	0.001 8
$S_0/(g/L)$	47.118 1
$Y_{XS}/(g/g)$	1.588 7
$Y_{PS}/(g/g)$	7.695 6
$M/(g/(g \cdot h))$	-0.000 2

表 2 200 r/min 发酵动力学参数预估值

Table 2 Parameter estimation of the shake flask(200 r/min) fermentation kinetics model

参数	预估值
$X_0/(g/L)$	1.543 1
$X_m/(g/L)$	25.123 9
μ_m/h^{-1}	0.177 4
α	0.046 3
β	0.000 9
$S_0/(g/L)$	49.867 2
$Y_{XS}/(g/g)$	0.569 1
$Y_{PS}/(g/g)$	4.127 0
$M/(g/(g \cdot h))$	0.000 6

表 3 0 r/min 发酵实验值与预估值比较

Table 3 Experimental value of shake flask(0 r/min) fermentation compared with the predicted value

时间/h	生物量/(g/L)		维生素 K ₂ 产量/(g/L)		甘油质量浓度/(g/L)	
	实验值	预估值	实验值	预估值	实验值	预估值
0	0.50	0.33	0.00	-0.41	50.00	47.12
12	4.58	3.47	0.51	0.14	42.96	45.05
24	23.22	27.09	3.15	4.36	28.11	29.68
36	62.39	58.87	10.21	10.64	9.22	9.01
48	67.68	64.92	12.31	12.99	5.45	5.11
60	66.85	65.46	14.88	14.48	5.02	4.80
72	66.73	65.50	16.31	15.88	4.99	4.82
84	65.33	65.50	17.99	17.27	4.95	4.86
96	64.21	65.50	19.35	18.67	4.90	4.90
108	64.01	65.50	21.32	20.06	4.90	4.94
120	63.21	65.50	21.23	21.45	4.89	4.98
132	63.08	65.50	21.12	22.85	4.89	5.02

表 4 200 r/min 发酵实验值与预估值比较

Table 4 Experimental value of shake flask(200 r/min) fermentation compared with the predicted value

时间/h	生物量/(g/L)		维生素 K ₂ 产量/(g/L)		甘油质量浓度/(g/L)	
	实验值	预估值	实验值	预估值	实验值	预估值
0	0.50	1.54	0.00	-0.04	50.00	49.87
12	9.79	8.92	0.31	0.35	35.49	36.79
24	19.21	20.66	1.01	1.07	20.12	15.88
36	27.20	24.49	1.49	1.51	7.55	8.88
48	26.99	25.05	1.83	1.81	6.55	7.66
60	26.33	25.11	1.99	2.09	6.54	7.30
72	25.96	25.12	2.48	2.37	6.50	7.05
84	25.48	25.12	2.79	2.65	6.49	6.81
96	24.62	25.12	2.92	2.93	6.49	6.57
108	23.85	25.12	3.21	3.20	6.46	6.33
120	23.01	25.12	3.21	3.48	6.46	6.09
132	22.99	25.12	3.46	3.76	6.45	5.85

2.4 两阶段转速控制策略发酵条件的优化

根据上述试验数据结合不同转速下发酵动力学模型的理论验证,证明菌体生长与产物合成之间为部分偶联关系。若在相同的接种体积分数下培养,在发酵前期,0 r/min 的菌落数不及 200 r/min 的菌落数,且生物膜形成的时间长,因此将分阶段转速调控方法用于发酵培养,并对影响其发酵的条件(温度、转速、初始 pH、时间)进行正交优化,每个因素 4 个水平,采用 L₁₆(4⁵)正交实验设计方法,每组 3 个重复。

由表 6 试验结果的极差分析可知,4 个因素影响纳豆芽胞杆菌产维生素 K₂ 的次序为 D(时间/h)、A(温度/℃)、C(初始 pH)、B(转速 r/min)。正交实验的最优组合为温度 40 ℃、初始 pH 6.5、0~36 h 控制

转速 220 r/min,36~132 h 转速为 0 r/min,维生素 K₂ 的产量达到(35.60±0.13) mg/L,比优化前(0 r/min 和 200 r/min)分别提高了 1.67 倍和 9.674 倍。因此,该方案可行,两阶段转速控制方法可以有效地提高纳豆芽胞杆菌合成维生素 K₂ 的能力,为维生素 K₂ 的大规模生产提供理论依据。

表 5 实验因素水平表

Table 5 Factor level table

水平	因素 A 温度/℃	因素 B 转速/(r/min)	因素 C 初始 pH	因素 D 时间/h
1	31	100	6.5	12
2	34	140	7.0	24
3	37	180	7.5	36
4	40	220	8.0	48

表 6 L₁₆(4⁵)正交实验结果

Table 6 Result of L₁₆(4⁵) orthogonal test

因素与实验号	因素 A 温度/℃	因素 B 转速/(r/min)	因素 C 初始 pH	因素 D 时间/h	维生素 K ₂ 质量浓度/ (mg/L)
1	1	1	1	1	23.83±0.31
2	1	2	2	2	24.55±0.29
3	1	3	3	3	24.23±0.27
4	1	4	4	4	22.01±0.18
5	2	1	2	3	28.67±0.33
6	2	2	1	4	21.44±0.29
7	2	3	4	1	16.61±0.15
8	2	4	3	2	19.44±0.16
9	3	1	3	4	19.28±0.18
10	3	2	4	3	23.54±0.23
11	3	3	1	2	27.20±0.41
12	3	4	2	1	18.86±0.28
13	4	1	4	2	27.70±0.39
14	4	2	3	1	22.79±0.26
15	4	3	2	4	27.67±0.25
16	4	4	1	3	35.60±0.43
K ₁	23.653 9	24.871 3	27.018 4	20.523 1	
K ₂	21.539 0	23.075 9	24.936 8	24.721 7	
K ₃	22.221 8	23.927 4	21.435 9	28.010 0	
K ₄	28.440 5	23.977 0	22.464 2	22.600 4	
R	6.901 4	1.791 8	5.582 5	7.486 9	

3 结 语

分析不同转速下发酵过程曲线与动力学参数,并用扫描电镜观察菌体的形态变化。扫描电镜结果

显示,0 r/min 发酵后期菌体表面形态出现明显的褶皱,但菌体很少破裂;对于 200 r/min 培养的菌体,在 72 h 菌体出现破裂、自溶现象,但正常菌体表面光滑平整无异常。根据不同条件下菌体生长和产物

生成的关系,利用发酵动力学模型证明两者之间的关系为部分偶联型,提出分阶段转速调控的方法进行发酵,并对影响其发酵的条件进行优化。结果表明:温度 40 ℃、初始 pH 6.5、0~36 h 控制转速 220 r/min、36~132 h 转速为 0 r/min, 维生素 K₂ 的产量达到

(35.60±0.13) mg/L,比优化前(0 r/min 和 200 r/min)分别提高了 1.67 倍和 9.674 倍,这使纳豆芽胞杆菌合成维生素 K₂ 的能力显著提高,为进一步大量生产维生素 K₂ 提供了依据。

参考文献:

- [1] REN L J, PENG C, HU X C, et al. Microbial production of vitamin K₂: current status and future prospects[J]. **Biotechnology Advances**, 2020, 39: 1-14.
- [2] REZA G, MEYSAM M, RAMIN S, GOLNAZ B, AZITA G. Prevalence of osteoporosis and osteopenia in men and premenopausal women with celiac disease: a systematic review[J]. **Nutrition Journal**, 2019, 18(1): 1-7.
- [3] MYNENI V D, MEZEY E. Immunomodulatory effect of vitamin K₂: implications for bone health[J]. **Oral Diseases**, 2018, 24(1-2): 67-71.
- [4] BALASUBRAMANIAN A, ZHANG J, CHEN L. Risk of subsequent fracture after prior fracture among older women[J]. **Osteoporosis International**, 2019, 30(1): 79-92.
- [5] EHSAN M, ALI D, AYDIN B. Production and application of menaquinone-7 (vitamin K₂): a new perspective[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2017, 33(1): 2-8.
- [6] DAIRI T. Menaquinone biosynthesis in micro-organisms: natural product biosynthesis by microorganisms and plant[M]. London: Elsevier Academic Press Inc, 2012.
- [7] MAGALI C, DOMINIK G, RETO P, et al. Determination of menaquinone production by *Lactococcus* spp. and *Propionibacteria* in cheese[J]. **International Dairy Journal**, 2017, 75: 1-9.
- [8] KULICHEVSKAYA I S, SUZINA N, LIESACK W. *Bryobacter aggregatus* gen. nov., sp. nov., a peat-inhabiting, aerobic chemo-organotroph from subdivision 3 of the *Acidobacteria*[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2010, 60(2): 301-306.
- [9] TAKASHI M, NATSUTO T, SATO K. Production of menaquinones by lactic acid bacteria[J]. **Journal of Dairy Science**, 1999, 82(9): 897-903.
- [10] TOSHIRO S, YOHKO Y, YUTAKA O, et al. Production of menaquinone -7 (vitamin K₂) by *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2001, 91(1): 16-20.
- [11] AYDIN B, RAJA M, ANDREA T. Efficient media for high menaquinone-7 production: response surface methodology approach[J]. **New Biotechnology**, 2011, 28(6): 665-672.
- [12] GANGARAJU D, SIDDALINGAIYA G P. An insight into kinetics and thermodynamics of gamma-aminobutyric acid production by *Enterococcus faecium* CFR 3003 in batch fermentation[J]. **Annals of Microbiology**, 2015, 65(2): 1109-1118.
- [13] SHI X, CHANG C, MA S, et al. Efficient bioconversion of L-glutamate to γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* resting cells[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2016, 44(4-5): 697-704.
- [14] 张敏, 薛正莲, 余飞, 等. 两阶段转速控制对粪肠球菌合成 γ -氨基丁酸的影响[J]. **食品与发酵工业**, 2019, 45(17): 20-25.
- [15] 圣亚春. 拜氏梭菌 F-6 合成丁醇发酵工艺优化及其动力学研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
- [16] 王伟. 乳酸菌抗菌肽 Lac-B23 对荧光假单胞菌生物膜的消减作用研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
- [17] MARVASI M, VISSCHER P T, OERITO B. Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* *etfA* mutant[J]. **FEMS Microbiology Ecology**, 2010, 71(3): 41-50.
- [18] WAHLEN L, MANTEI J R, DIORIO J P. Production and analysis of a *Bacillus subtilis* biofilm comprised of vegetative cells and spores using a modified colony biofilm model[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2018, 148: 181-187.
- [19] 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.
- [20] 刘动斌, 刘莉娜, 吴敬, 等. *Sulfolobus solfataricus* P2 β -半乳糖苷酶在枯草芽孢杆菌中的表达及固定化[J]. **食品与发酵工业**, 2018, 44(7): 37-43.

- [21] FUCHS FM, HOLLAND G, MOELLER R, et al. Directed freeze-fracturing of *Bacillus subtilis* biofilms for conventional scanning electron microscopy[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018(152): 165-172.
- [22] BERENJIAN A, CHAN NL, MAHANAMA R, et al. Effect of biofilm formation by *Bacillus subtilis* on menaquinone-7 biosynthesis[J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, 54: 371-378.
- [23] MICHIO K, EESHARAI B. Vitamin K₂ in electron transport system: are enzymes involved in vitamin K₂ biosynthesis promising drug targets[J]. *Molecules*, 2010, 15(3): 1531-1553.
- [24] QIN Y X, HE Y H, SHE Q X, et al. Heterogeneity in respiratory electron transfer and adaptive iron utilization in a bacterial biofilm[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-12.
- [25] 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: 1347-1357.
- [26] 吴元锋, 郑裕国. 微生物法生产维生素 K₂(MK)[J]. 科技通报, 2004, 20(5): 428-433.

科技信息

江南大学胥传来团队在 *Nature* 正刊发表最新研究成果

1月19日,江南大学胥传来研究团队在国际顶尖期刊 *Nature* 正刊以长文(Article)形式发表题为“Enantiomer-dependent immunological response to chiral nanoparticles”的研究论文(www.nature.com/articles/s41586-021-04243-2)。研究揭示了独特的手性纳米免疫佐剂能均衡介导体液免疫应答和细胞免疫应答,不但为保护性疫苗研发提供了理论支撑,也为治疗性疫苗研发指明了方向。《自然》杂志同期刊发了“News & Views”评论文章重点推荐介绍了这项工作(<https://www.nature.com/articles/d41586-021-03806-7>)。

在该工作中,研究团队研制了不对称因子达0.44的强手性纳米免疫佐剂,有效致敏免疫细胞,使得肿瘤坏死因子- α 、 γ -干扰素、白介素-12等细胞因子的表达量提升了1~2倍。研究人员通过H9N2流感病毒感染的小鼠模型,验证了左手性免疫佐剂有效促进细胞免疫应答和体液免疫应答,维护了机体的健康和内环境稳定。左手性免疫佐剂产生抗体的滴度是传统商业化铝佐剂的800余倍,是右手性纳米佐剂的1580余倍。该研究表明,手性佐剂与抗原呈递细胞表面的G蛋白偶联受体家族CD97、EMR1等分子特异性结合,激活炎症小体通路,促进了抗原的有效递呈。强手性免疫佐剂促进淋巴细胞活化、增殖和分化,产生IL-2、IL-4、IL-12、IFN- γ 等细胞因子,同时诱导细胞免疫应答和体液免疫应答,从而更好地预防感染,并带来持久的疫苗保护效果。该研究有3大亮点:首先,偏振光合成强手性纳米佐剂,研究人员筛选了系列手性配体,纳米佐剂制备过程中引入偏振光,并与不同波长偏振光优化组合,诱导高指数晶面上形成对称性破缺,最终获得了表面形貌均一、各向异性因子高达0.44的强手性纳米佐剂,实现了镜像强手性纳米佐剂的精准合成。第二,发现了手性纳米佐剂进入免疫细胞机制,通过冷冻电镜、光谱和蛋白质分析,研究团队发现并证实主要由CD97和EMR1两种7次跨膜蛋白介导了手性纳米佐剂进入细胞的机制。第三,发现了手性纳米佐剂介导免疫应答的机制,研究团队发现了免疫细胞的活化与手性纳米佐剂的手性强弱呈现相关性。手性纳米佐剂通过激活炎症小体NLRP3途径,调控细胞因子的表达模式,介导了细胞免疫应答和体液免疫应答。

[信息来源] 江南大学. 江南大学胥传来团队在 *Nature* 正刊发表最新研究成果 [EB/OL]. (2022-1-20). <https://news.jiangnan.edu.cn/info/1093/75177.htm>