مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

مروری بر رویکردهای دستیابی به بیشینه بهره‌وری تولید مناکینون از *باسیلوس سوبتلیس*

نوع مقاله: مروری 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4

مجید عزیزی[1*]، سعید سهیلی‌وند[1]

۱-استادیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

smajidazizi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۰۴

صفحه ۵۲-۳۷

چکیده

افزایش بهره‌وری سامانه تولید و سهولت در افزایش مقیاس، پیش‌نیاز گسترش کاربرد مناکینون-۷ در صنایع دارویی و غذایی است. این بررسی نخست به معرفی، تجارت جهانی، ارزش بازار و کاربرد مناکینون-۷ اشاره دارد. سپس انواع رویکردهای تولید صنعتی همراه با چالش‌های مرتبط معرفی می‌شوند. در ادامه مزیت نسبی تولید مناکینون-۷ از منابع میکروبی، مسیرهای بیوسنتز و آنزیم‌های کلیدی مورد بررسی قرار خواهند گرفت. در پایان رویکردهای افزایش بهره‌وری سامانه تولید مانند جهش زایی و غربالگری، مهندسی مسیرهای متابولیکی، مهندسی زیست فرآیند و استخراج مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس* معرفی خواهند شد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس سوبتلیس*، بهره‌وری، زیست فرآیند، مناکینون، ویتامین K.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

مقدمه

ویتامین K متعلق به خانواده کوئینون‌های محلول در چربی است. عملکرد اصلی ویتامین K فعال کردن پروتئین‌هایی است که در لخته شدن خون، سلامت قلب و سلامت استخوان نقش دارند (Iwamoto et al. 2011). اشکال متنوع ویتامین K مشتمل بر ویتامین K1 (فیلوکینون)، ویتامین K2 (مناکینون) و ویتامین K3 (منادیون) هستند. به‌دلیل تفاوت در جذب و انتقال اشکال متنوع ویتامین k به بافت‌ها و مخاطرات ایمنی زیستی، مناکینون نسبت به فیلوکینون و منادیون مزیت دارد. مناکینون به دو روش سنتتیک و طبیعی تولید می‌شود؛ و به‌دلیل مزایای متعدد زیستی، مناکینون طبیعی نسبت به مناکینون سنتتیک ترجیح داده می‌شود (Mahdinia et al. 2017).

ساختار مولکولی مناکینون متشکل از حلقه نفتوکینون و زنجیره جانبی ایزوپرنی غیراشباع است. مناکینون بر اساس تکرار واحدهای زنجیره جانبی ایزوپرنی غیر اشباع مناکینون ۴ تا ۱۳ تقسیم‌بندی می‌شود (Bonaldo and Leroy, 2024). با افزایش تعداد واحدهای زنجیره ایزوپرنی؛ جذب زیستی، فعالیت زیستی و ماندگاری در دستگاه گردش خون افزایش می‌یابد. از عمده مناکینون‌های یافت شده در طبیعت می‌توان به مناکینون-۴ و مناکینون-۷ اشاره کرد (Luo et al. 2016).

مناکینون ۴ و ۷ به ترتیب در منابع پروتئین‌های حیوانی و غذاهای تخمیری (مانند سویای تخمیری ناتو) یافت می‌شود. میزان دوز پیشنهادی مناکینون برای مصارف انسانی، ۱۸۰ میکروگرم در روز است. ۱/۳ کیلوگرم تخم مرغ و ۱/۲ کیلوگرم گوشت خوک حاوی ۱۸۰ میکروگرم مناکینون-۴ بوده و در حالی‌که هر ۲۲ گرم سویای تخمیری ناتو حاوی ۱۸۰ میکروگرم مناکینون-۷ است. با توجه به تعداد واحدهای زنجیره ایزوپرنی، مناکینون-۷ نسبت به مناکینون-۴ ترجیح داده می شود (Walther and Chollet, 2017). تجارت جهانی مناکینون-۷، ۰/۴۵ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۱ بوده و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۹ با نرخ رشد مرکب سالیانه ۲۶ درصد به ۰/۸ میلیارد دلار برسد. ارزش بازار هر کیلوگرم روغن یا پودر حاوی ۰/۱ درصد مناکینون-۷، بیش از ۱۲۰۰ دلار است. از تولیدکنندگان صنعتی مناکینون-۷ می‌توان به NattoPharma (نروژ)، Gnosis (ایتالیا) و Viridis Biopharma (هندوستان) اشاره کرد (Ren et al. 2020).

باکتری گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو (جداسازی شده از سویای تخمیری ناتو) به‌دلیل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

بهره‌وری بالای تولید در مقایسه با سویای تخمیری ناتو، گوشت و تخم مرغ مهمترین منبع صنعتی مناکینون-۷ به شمار می‌آید. از چالش‌های فرآیند بالادستی و پایین دستی سامانه تولید مناکینون-۷ می‌توان به پتانسیل ژنتیکی پایین باکتری *باسیلوس سوبتلیس*، رویکردهای تامین اکسیژن و تشکیل بیوفیلم و فوم (Foam) در سامانه تولید اشاره کرد (Luo et al. 2016).

مهندسی زیست فرآیند، تولید متابولیت‌های میکروبی با ارزش بالا از راهکارهای پیشنهادی برای دستیابی به بیشنه بهره‌وری سامانه تولید است (Lal et al. 2022). بنابراین در این بررسی، ابتدا کاربردهای مناکینون-۷ و رویکردهای تولید صنعتی مناکینون-۷ بیان خواهد شد. سپس، مسیرهای بیوسنتز مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس* برای درک بهتر فرآیند تولید معرفی خواهد شد. در ادامه رویکردهای افزایش بهره‌وری تولید مناکینون-۷ از منظر مهندسی سویه، بهینه‌سازی فرآیند تولید و استخراج مناکینون-۷ به تفصیل مورد بحث قرار خواهد گرفت. امیدواریم این بررسی برای توسعه کاربردهای مناکینون-۷ و تسهیل فرآیندهای تولید صنعتی این متابولیت ارزشمند با هدف ارتقاء سلامت بشر در آینده‌ای نزدیک مفید واقع شود.

کاربرد مناکینون-۷

مناکینون-۷ نقشی کلیدی در بسیاری از فرآیندهای زیستی مانند انعقاد خون، هموستاز کلسیم (داروی نسل چهارم پوکی و شکستگی استخوان) و زنجیره انتقال الکترون دارد. در سال‌های ابتدایی کشف مناکینون-۷ (۱۹۳۵ میلادی)، پژوهشگران تنها بر عملکرد آن در انعقاد خون متمرکز بودند. استفاده از داروهای خاص (کومارول، وارفارین و آسپرین) یا بیماری‌هایی مانند یرقان انسدادی می‌توانند موجب کاهش فاکتورهای انعقادی و ایجاد خطر خونریزی شوند. مناکینون، با افزایش تولید پروترومبین (فاکتورهای انعقادی) به درمان و جلوگیری از خونریزی کمک می‌کند. همچنین در هنگام تولد، مناکینون-۷ به‌منظور جلوگیری از بیماری خونریزی‌دهنده در نوزادان نیز تجویز می‌شود (Kyla Shea and Holden, 2012). ویلمز و همکاران گزارش کردند شکستگی‌های سیستم اسکلتی در حضور مناکینون-۷ بهبود می‌یابد. در واقع مناکینون-۷ با فعال کردن استئوکلسین (پروتئین تشکیل‌دهنده استخوان)، موجب جذب و قرارگیری کلسیم در بافت‌های استخوانی می‌شود. همچنین با فعال شدن استئوکلسین توسط مناکینون، از تخریب استخوان توسط استئوکلاست (سلول‌های تحلیل‌برنده‌ی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

استخوانی) ممانعت به عمل می‌آید. در صورت فقدان مناکینون، کلسیم به‌دلیل عدم فعالیت استئوکلسین جذب استخوان نشده و در خون باقی می‌ماند (Willems et al. 2014). در ایران بالغ بر ۱۷۰ هزار مورد شکستگی ناشی از پوکی استخوان یا استئوپروز در سال رخ می‌دهد، این در حالیست که حدود ۴ هزار و ۲۰۰ مورد مرگ به علت شکستگی ناشی از پوکی استخوان در کشور ما اتفاق می‌افتد. در ایران، هزینه ناشی از پوکی استخوان و شکستگی‌های مرتبط با آن، بیش از ۴۰۰ میلیون دلار در سال است که به سیستم سلامت تحمیل می‌شود (Tanha et al. 2021). درضمن مناکینون-۷ قادر به فعال کردن پروتئین‌هایی است که کلسیم را از بافت‌های نرم مانند شریان‌ها حذف و در نتیجه ریسک بیماری‌های قلبی - عروقی و مغزی - عروقی را کاهش می‌دهد.

از دیگر کاربردهای مناکینون-۷ می‌توان به پیشگیری از سرطان و پارکینسون، بازیابی عملکرد کبد و کاهش خطر ابتلاء به دیابت نوع دو اشاره کرد (Li et al. 2018). ژاپن در سال ۲۰۰۱ اولین کشوری بود که فروش مناکینون-۷ را با هدف درمان اختصاصی پوکی استخوان مجاز شناخت. در ادامه سازمان غذا و داروی آمریکا و اروپا به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ مصرف انسانی مناکینون-۷ را با اهداف حفظ سلامت سیستم اسکلتی و بیماری‌های قلبی و عروقی مجاز شناختند (Orlando et al. 2019). بدیهی است با توجه به نقش مناکینون در درمان انواعی از اختلالات، تولید مقرون به صرفه این متابولیت ارزشمند نقش موثری در ارتقاء سلامت بشر داشته باشد.

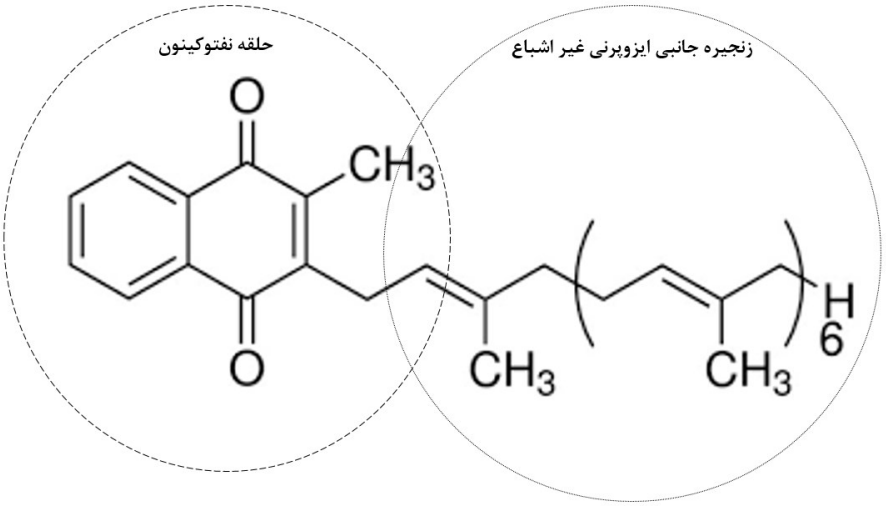
رویکردهای صنعتی تولید مناکینون-۷

سلول‌های انسانی قادر به تولید مناکینون-۷ نیستند و بشر ملزم به دریافت این متابولیت ارزشمند از طریق غذا و یا مکمل‌های دارویی است. به‌دلیل مقادیر ناچیز مناکینون-۷ در منابع غذایی از آن به‌عنوان "ویتامین پلاتینیوم" یاد می‌شود. در حال حاضر مناکینون-۷ توسط رویکردهایی مانند استخراج از مواد غذایی، فرآیندهای میکروبی و شیمیایی تولید می‌شود. پژوهشگران ژاپنی مناکینون-۷ را از سویای تخمیری ناتو که دارای بافت رشته‌ای همراه با طعم اومامی است، استخراج کردند. این فرآورده تخمیری علاوه‌بر مناکینون-۷ حاوی ترکیبات دیگری مانند ناتوکیناز و گاما پلی گلوتامیک اسید است (Wang et al. 2023). با این وجود بهره‌وری پایین استخراج مشکل اصلی تولید مناکینون-۷ از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

مواد غذایی عنوان شد (Tarvainen et al. 2019). ساختار مولکولی مناکینون متشکل از حلقه نفتوکینون و زنجیره جانبی ایزوپرنی غیر اشباع است (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار مولکولی مناکینون-۷ متشکل از زنجیره جانبی ایزوپرنی غیر اشباع و حلقه نفتوکینون.

از سال ۱۹۵۸ تلاش‌های فراوانی برای تولید شیمیایی مناکینون-۷ به روش آلکیلاسیون آغاز شد. با وجود تلاش‌های گسترده، گزینش‌پذیری واکنش بسیار محدود بود. آنتا باج و همکاران در سال ۲۰۱۶ مناکینون-۷ را با خلوص ۹۹/۹ درصد با استفاده از منادیون، ایزوپرن و ترانس فارنزل به‌عنوان سوبسترا تولید کردند (Baj et al. 2016). همچنین کانگ در سال ۲۰۱۷ مناکینون-۷ را بر اساس واکنش انتخابی ۷-تریپنول و منادیون پس از انجام مراحلی پیچیده مانند تقطیر، استخراج، کروماتوگرافی ستونی، تبلور مجدد، خشک کردن و الک کردن تولید کرد. به‌طور کلی تولید مناکینون-۷ مبتنی‌بر فرآیندهای شیمیایی با چالش‌هایی همچون بهره‌وری پایین، پیچیده بودن مراحل، تشکیل ایزومرهای سیس با فعالیت زیستی پایین، تولید محصولات جانبی و آلودگی محیط زیست همراه است (Kang et al. 2022). تانی و همکاران پس از مطالعه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها گزارش کردند باکتری‌ها از پتانسیل بالایی برای تولید مناکینون-۷ برخوردار هستند (Tani et al. 1986).

باسیلوس سوبتلیس قادر به تولید همولوگ‌های مناکینون ۴ تا ۸ است و توسط مهندسی زیست فرآیند می‌توان تولید مناکینون-۷ را تا ۹۶ درصد

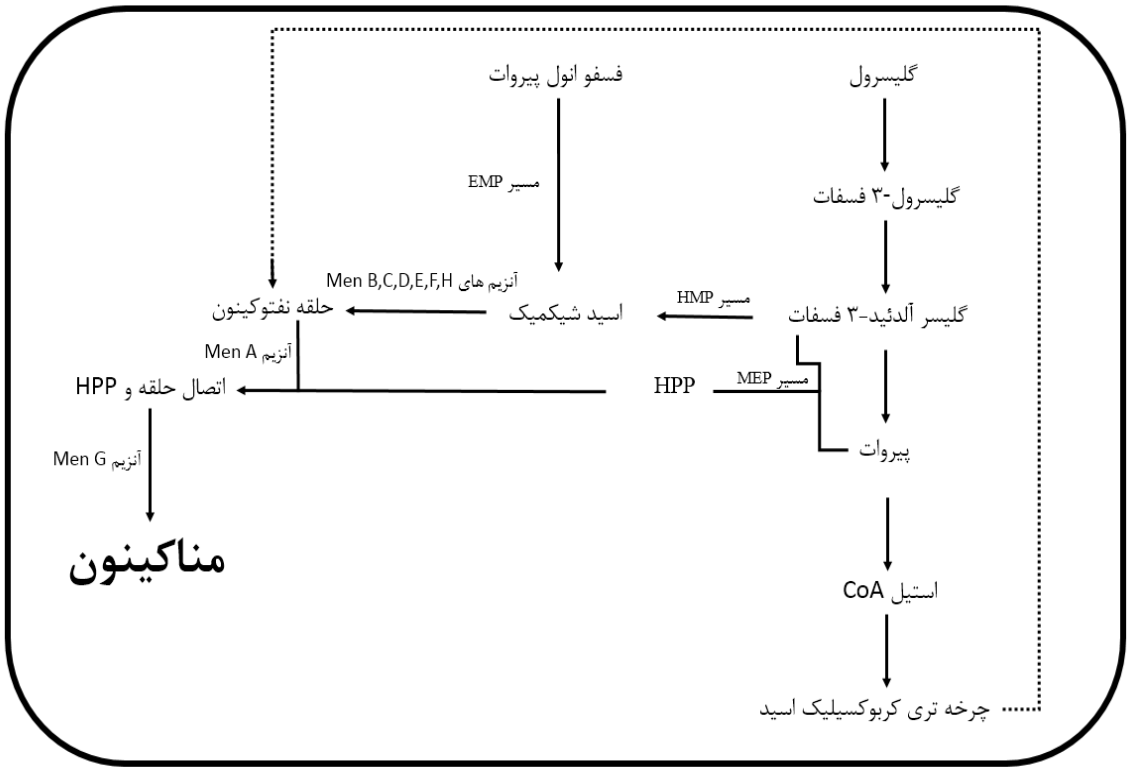
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

افزایش داد (Lal et al. 2022). فلاوباکتریوم‌ها به‌طور عمده مناکینون ۶ و ۴ را تولید می‌کنند. باکتری‌های اسید لاکتیک روده‌ای مانند لاکتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس، لوکونوستوک و استرپتوکوک طیف وسیع‌تری از مناکینون ۷ تا ۱۰ را تولید می‌کنند (Chollet et al. 2017). به‌طور کلی، ۱۱ تولیدکننده صنعتی مناکینون-۷ در دنیا فعالیت می‌کنند که نیمی از آنها تولید مبتنی‌بر فرآیندهای میکروبی دارند (Ren et al. 2020). در میان تمام تولیدکنندگان زیستی این متابولیت ارزشمند، *باسیلوس سوبتلیس* به‌دلیل سابقه طولانی مدت استفاده ایمن و محتوای بالای مناکینون-۷ مورد توجه پژوهشگران و تولیدکنندگان صنعتی مناکینون-۷ است.

بیوسنتز مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس*

برای درک عمیق تولید میکروبی مناکینون، ابتدا مسیر بیوسنتز در *باسیلوس سوبتلیس* مورد بحث قرار خواهد گرفت (شکل ۲).



شکل ۲- چرخه بیوسنتز مناکینون-۷ در باکتری *باسیلوس سوبتلیس* (Bentley and Meganathan, 1982).

MenF, isochorismate synthase; MenD, 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase; MenH, 2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase; MenC, o- succinylbenzoate synthase; MenE, o-succinylbenzoic acid-CoA ligase; MenB, 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase; MenA, 1,4-dihydroxy-2-naphthoate heptaprenyltransferase; MenG,

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

demethylmenaquinone methyltransferase. MEP: methylerythritol 4-phosphate; HMP: pentose phosphate; MP: Embden-Meyerhof-Parnas; HPP: Heptaprenyl Diphosphate

ساختار مولکولی مناکینون-۷ متشکل از زنجیره جانبی ایزوپرنی غیراشباع و حلقه نفتوکینون است (شکل ۱). زنجیره جانبی ایزوپرنی غیر اشباع (HPP) و حلقه نفتوکینون به ترتیب در مسیر غیرموالوناتی (MEP) و مسیر پنتوز فسفات (HMP) سنتز می‌شوند (شکل ۲). هر دو مسیر حاوی آنزیم‌ها، کوفاکتورها و واکنش‌های متعددی هستند. منبع کربن آلی برای تولید مناکینون-۷ عموما گلیسرول است. گلیسرول به‌عنوان سوبسترا توسط گلیسرول کیناز ابتدا به گلیسرول-۳ فسفات و در ادامه به گلیسر آلدئید-۳ فسفات و پیروات تبدیل می‌شود. پیروات، دکربوکسیله شده و به استیل-CoA برای ورود به چرخه کربس و تولید حلقه نفتوکینون تبدیل می‌شود. همزمان گلیسر آلدئید-۳ فسفات با پیروات ترکیب شده و وارد مسیر MEP برای تشکیل HPP می‌شود. برای بیوسنتز مناکینون-۷، HPP با هفت واحد ایزوپرن موردنیاز است. علاوه‌بر این، گلیسر آلدئید-۳ فسفات برای تولید اسید شیکمیک وارد مسیر HMP می‌شود (Bentley and Meganathan, 1982; Zhao et al. 2021).

تشکیل حلقه نفتوکینون از اسید شیکمیک توسط ۶ آنزیم (Men B, C, D, E, F, H) که توسط خوشه ژن مناکینون (menFDHCEB) کنترل می‌شوند، انجام می‌شود. در پایان، واحدهای HPP توسط آنزیم MenA به گروه کربوکسیل حلقه نفتوکینون ملحق و پس از متیلاسیون توسط آنزیم MenG، مناکینون-۷ سنتز می‌شود (شکل ۲). ژن‌های کدکننده آنزیم‌های درگیر در مسیرهای MEP و HMP به‌طور معمول در کنار هم قرار می‌گیرند و خوشه ژن مناکوئین نامیده می‌شوند (Dairi. 2012).

علاوه‌بر این، بسیاری از آنزیم‌های محدودکننده بیان مانند پلی‌پرنیل پیروفسفات سنتتاز و HPP سنتتاز که در خوشه ژن مناکینون رمزگذاری نشده‌اند، محصول نهایی را با تغییر در طول زنجیره جانبی ایزوپرنی تعیین می‌کنند. همچنین میزان بیان پایین آنزیم‌های مرتبط با بیوسنتز مناکینون، دلیل مهم دیگری برای نرخ پایین بیوسنتز این متابولیت است. علاوه‌بر پیچیدگی‌های تولید در سطح سلولی، برخی بازدارنده‌ها مانند سیترات سدیم، آلانین، اسیدهای آمینه معطر و دی فنیل آمین (DPA)، بیوسنتز مناکینون-۷ را محدود می‌کنند (Tsukamoto et al. 2001). در نتیجه، بیوسنتز مناکینون-۷ در میکروارگانیسم‌ها متاثر از عوامل زیستی و غیرزیستی متعددی است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

رویکردهای افزایش بهره‌وری تولید مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس*

الف) فرآیند بالا دستی

معرفی رویکردهای دستیابی به بیشینه پتانسیل ژنتیکی *باسیلوس سوبتلیس*

از رویکردهای کارآمد برای افزایش پتانسیل ژنتیکی *باسیلوس سوبتلیس* با هدف دستیابی به بیشینه بهره‌وری تولید مناکینون-۷، جهش‌زایی و مهندسی مسیرهای متابولیکی است (جدول ۱). مطالعات متعددی در خصوص استفاده از عوامل جهش‌زای فیزیکی (اشعه UV و پلاسمای سرد) و شیمیایی (متیل-نیترو-نیتروز- گوانیدین (NTG)) برای جهش‌زایی *باسیلوس سوبتلیس* با اهداف ویژه منتشر شده است. اگرچه جهش‌زایی روشی کارآمد برای افزایش بیوسنتز مناکینون-۷ است، ولی شناسایی جهش یافته‌ها روشی زمانبر است. از رویکردهای غربالگری برای شناسایی *باسیلوس سوبتلیس* جهش یافته با قابلیت تولید مناکینون-۷ بالا، روش مقاومت به آنالوگ‌های ساختاری و روش غربالگری با کارایی بالا مبتنی‌بر فلورسانس (رودآمین۱۲۳) است (Ren et al. 2022).

بیوسنتز مناکینون-۷ مشتمل بر انواع مسیرهای متابولیتی و آنزیم‌ها است که تحت تاثیر ترکیبات شیمیایی (مانند سیترات سدیم، آلانین، اسیدهای آمینه معطر و DPA) تنظیم و یا محدود می‌شوند (Song et al. 2014). به‌طور کلی، جهش یافته‌های مقاوم به محدودکننده‌های تولید مناکینون-۷ یا آنالوگ ساختاری آنها، از قابلیت تولید مناکینون-۷ بالاتری برخوردار هستند (Tsukamoto et al. 2001). برای مثال، جهش یافته‌های مقاوم *باسیلوس سوبتلیس* به منادیون، از قابلیت تولید مناکینون-۷ بالاتری (۳۰ درصد افزایش تولید) برخوردار بودند (Sato et al. 2001).

زو و ژانگ با استفاده از عوامل جهش‌زای شیمیایی - فیزیکی و غربالگری سویه‌های با قابلیت تولید مناکینون-۷ بالا با روش مقاومت به آنالوگ‌های ساختاری (مانند هیدروکسی نفتالدئید (HNA) و دی فنیل آلانین (DPA))، بهره‌وری تولید مناکینون-۷ را تا ۲ برابر نسبت به سویه استاندارد افزایش دادند (Xu and Zhang, 2017).

همچنین، پژوهشگران تلاش‌های گسترده‌ای با هدف مهندسی مسیرهای متابولیک *باسیلوس سوبتلیس* یا ساخت مسیرهای جدید در میکروارگانیسم‌های مدل با فرابیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز مناکینون-۷ و یا کاهش بیان ژن‌های سنتز متابولیت‌های حدواسط آغاز کرده‌اند (جدول ۱).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

جدول ۱- مطالعات مرتبط با تولید مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس* با استفاده از رویکردهای جهش‌زایی و مهندسی مسیرهای متابولیکی.

رفرنس	غلظت مناکینون	سوبسترا	سامانه کشت	توضیحات	رویکرد
(Toshiro et al. 2001b)	۳۵ میلی‌گرم بر لیتر	سویا و گلیسرول	تخمیر بستر مایع	جهش یافته‌های مقاوم به آنالوگ‌های ساختاری	موتاسیون
(Xu and Zhang, 2017)	۶۱ میلی‌گرم بر لیتر	سویا، عصاره مخمر و ذرت هیدرولیز شده			
(Song et al. 2014)	۲/۳ میلی‌گرم بر لیتر	گلیسرول، عصاره مخمر و پپتون			
(Yoshinori et al. 2001)	۳/۴۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ناتو	عصاره گوشت و پلی پپتون	تخمیر بستر جامد		
(Yang et al. 2019)	۶۹/۵ میلی‌گرم بر لیتر	گلیسرول، پپتون سویا و عصاره مخمر		فرابیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز مناکینون-۷ مانند menA، dxs، dxr، yacM-yacN و glpD همراه با کاهش بیان ژن dhbB (مرتبط با تولید محصولات حدواسط)	مهندسی مسیرهای متابولیکی
(Xu et al. 2017)	۲۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک زیست توده	گلیسرول، عصاره مخمر و پپتون سویا	تخمیر بستر مایع	فرابیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز مناکینون-۷ مانند menA، menC، menD، menE، menH و hepS	
(Kong and Lee, 2011)	۲۹۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک زیست توده	تریپتون و عصاره مخمر		کاهش بیان ژن ubiCA و فرابیان ژن‌های menA و menD	

برای مثال ما و همکاران با فرابیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز مناکینون-۷ (MenA، LdI، DxR و DxS)، غلظت مناکینون-۷ در *باسیلوس سوبتلیس* را ضمن پایداری ژنتیکی مناسب سویه‌ها تا ۱۰ برابر ارتقاء دادند (Ma et al. 2019). در مطالعه‌ای دیگر، فرابیان ژن‌های مرتبط با تولید مناکینون-۷ مانند MenA و MenD و کاهش بیان ژن مرتبط با تولید یوبیکینون (متابولیت حدواسط)، به ترتیب غلظت مناکینون-۷ را ۵ و ۱/۳ برابر در *اشرشیا کلی* افزایش داد (Kong and Lee, 2011). همچنین، فرابیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز مناکینون-۷ مانند menA، dxs، dxr، yacM-yacN و glpD همراه با کاهش بیان ژن dhbB (مرتبط با تولید متابولیت حدواسط)، میزان تولید مناکینون-۷ را ۲/۱ برابر افزایش داد (Yang et al. 2019). زو و همکاران بیشنه غلظت مناکینون-۷ (۲۷۳

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

میلی‌گرم بر گرم وزن خشک زیست توده) را با فرابیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز مانند menA، menC، menD، menE، menH و hepS گزارش کردند (Xu et al. 2017). بنابراین جهش‌زایی و مهندسی مسیرهای متابولیکی از رویکردهای موثر و کارآمد در افزایش تولید مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس* هستند.

مهندسی زیست فرآیند تولید مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس*

از سامانه‌های کارآمد برای تولید مناکینون-۷ می‌توان به تخمیر بستر جامد (SSF)، تخمیر بستر مایع (LSF) و بیوفیلم راکتور اشاره کرد (Lal et al. 2023). در ژاپن، غذای سنتی ناتو با استفاده از تخمیر دانه های سویای پخته (SSF) با افزودن *باسیلوس سوبتلیس* ناتو تهیه می‌شود. پژوهشگران متعددی علاوه‌بر سویا بسترهایی همچون حبوبات، غلات و گندم را ارزیابی کرده و با توجه به نوع سویه، سطح رطوبت و عوامل محیطی غلظت مناکینون-۷ را بین ۰/۵۳ تا ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش کردند (Singh et al. 2015).

از مزایای SSF می‌توان به استفاده از محصول نهایی به‌عنوان مکمل غذایی خشک اشاره کرد که حاوی سطوح بالایی از مناکینون-۷ است. از معایب SSF علاوه‌بر حجم کاری بالاتر می‌توان به دشواری کنترل پارامترهای محیطی مانند دما و رطوبت اشاره کرد. حرارت در تخمیر بستر جامد به سختی کنترل می‌شود و رطوبت نامناسب خواص فیزیکی ماتریکس جامد را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد. رطوبت پایین، منجر به کاهش انبساط بستر، کاهش حلالیت مواد غذایی و افزایش فشار اسمزی می‌شود (Berenjian et al. 2014). بنابراین، تلاش پژوهشگران برای تولید مقرون به صرفه مناکینون-۷ از سامانه‌های SSF به LSF معطوف شد. از مزایای LSF می‌توان به کاهش زمان فرآیند، کاهش حجم بیوراکتور و ارتقاء بهره‌وری تولید اشاره کرد. از منابع کربنی مورد استفاده در LSF می‌توان به گلیسرول، مالتوز و گلوکز اشاره کرد. همچنین از منابع نیتروژنی می‌توان به عصاره مخمر و پپتون سویا اشاره کرد (Wu and Ahn, 2011). گلوکز و گلیسرول به ترتیب برای دستیابی به بیشینه تولید زیست‌توده و مناکینون-۷ پیشنهاد شده‌اند (Song et al. 2014). برنجیان و همکاران گزارش کردند بیشینه غلظت مناکینون-۷ (۶۲ میلی‌گرم بر لیتر)، با افزودن ۵۰ گرم بر لیتر گلیسرول و ۱۸۹ گرم بر لیتر پپتون سویا به دست می‌آید (Berenjian et al. 2011). علاوه‌بر این، رویکردهای خوراک‌دهی مانند افزودن ۲ درصد گلیسرول در حین فرآیند منجر به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

افزایش تولید مناکینون-۷ تا ۴۰ درصد می‌شود (Berenjian et al. 2012) (جدول ۲).

جدول ۲- مطالعات مرتبط با تولید مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس* مبتنی‌بر بهینه‌سازی فرآیند.

رفرنس	غلظت مناکینون	سوبسترا	سامانه کشت	توضیحات	رویکرد
(Wu and Ahn 2011)	۱۲/۴۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک زیست توده	عصاره سویا		بهینه‌سازی درصد عصاره سویا، دما و منابع کربنی	بهینه‌سازی فرآیند تولید مناکینون
(Berenjian et al. 2011)	۶۲/۳۲ میلی‌گرم بر لیتر	گلیسرول و پپتون سویا	تخمیر بستر مایع	بهینه‌سازی منابع کربن و نیتروژن	
(Song et al. 2014)	۳/۵۹ میلی‌گرم بر لیتر	گلیسرول، ساکاروز، پپتون و عصاره سویا		بهینه‌سازی دما، هوادهی و زمان	
(Berenjian et al. 2012)	۸۶/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر	عصاره مخمر، گلیسرول و پپتون سویا		بهینه‌سازی خوراک‌دهی گلیسرول	
(Berenjian et al. 2014)	۲۲۶ میلی‌گرم بر لیتر	عصاره مخمر، گلیسرول و پپتون سویا		بهینه‌سازی هوادهی	
(Singh et al. 2015)	۳۹ میکروگرم بر گرم ناتو	سویا، گلیسرول و عصاره مخمر	تخمیر بستر جامد	بهینه‌سازی pH، دما، گلیسرول، مانیتول، عصاره مالت، عصاره مخمر و کلرید کلسیم	

از متابولیت‌هایی جانبی فرآیند تولید متاکونین، ناتوکیناز است. ناتوکیناز آثار مثبت درخور توجهی در درمان بیماری‌های قلبی عروقی، درمان یا پیشگیری از بیماری‌های آمیلوئیدی همچون آلزایمر و کاهش کلسترول خون دارد. وانگ و همکاران همزمان با تولید ۹۱ میلی‌گرم بر لیتر مناکینون-۷ در حضور لاکتوز و سویا به‌ترتیب به‌عنوان منابع کربن و نیتروژن، ۲۶۷۵ U/mL ناتو کیناز تولید کردند (Wang et al. 2018). همچنین از عوامل موثر بر LSF می‌توان به رویکردهای تامین اکسیژن و دما اشاره کرد (جدول ۲). دمای بهینه رشد باسیلوس‌ها ۲۸ تا ۴۵ درجه سلسیوس است. بر اساس مطالعات انجام‌شده دمای بهینه برای دستیابی به حداکثر بهره‌وری تولید

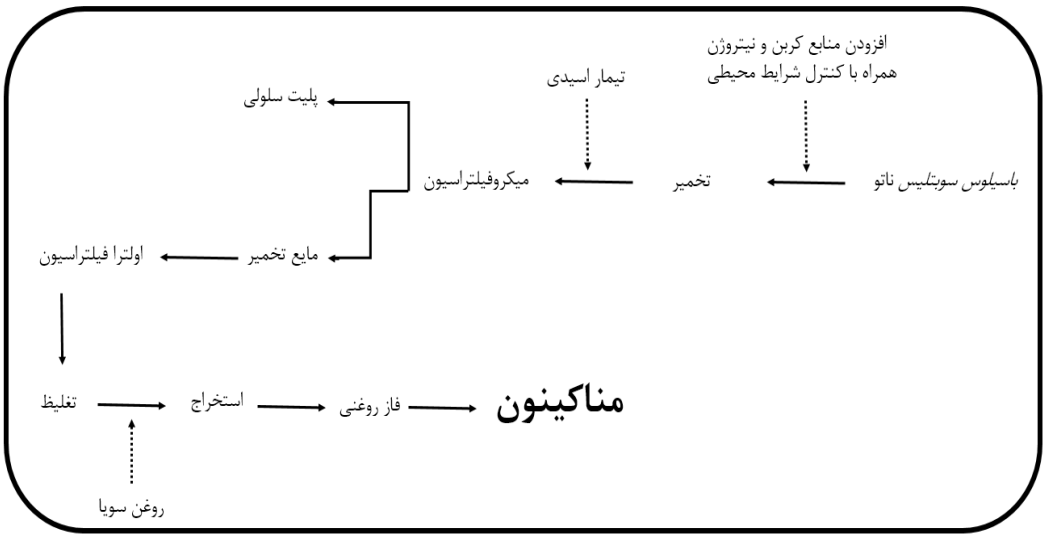
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

مناکینون-۷، ۴۰ درجه سلسیوس است. هوادهی با شدت بالا منجر به فعالیت بالای آنزیم پیروات کیناز، کاهش تجمع گلیسیرل آلدئید-۳ فسفات و فعالیت بالای چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید می‌شود. بنابراین، هوادهی با شدت بالا با تولید مناکینون-۷ رابطه مستقیمی دارد (Ma et al. 2019). علاوه‌بر سامانه‌های SSF و LSF، راکتور بیوفیلم نیز برای تولید مناکینون-۷ در مقیاس‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. بر همین اساس با استفاده از راکتور بیوفیلم مبتنی‌بر کامپوزیت‌های پلاستیکی و ترکیبات لیگنوسلولزی همراه با بهینه کردن غلظت منابع کربنی مانند گلیسرول و گلوکز می‌توان غلظت مناکینون-۷ را ۲/۳ برابر افزایش داد (Mahdinia et al. 2018). بر اساس گزارشات منتشر شده سامانه LSF رویکرد بهینه تولید مناکینون-۷ در واحدهای صنعتی است.

ب) فرآیند پایین دستی

عموما فرآیند پایین دستی تولید متابولیت‌های میکروبی، ۵۰ درصد هزینه تولید را به دلایلی همچون جداسازی، تغلیظ، آب‌گیری، خشک کردن و استخراج در برمی‌گیرد. فرآیند پایین دستی تولید مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس* در واحدهای صنعتی مشتمل بر تیمار اسیدی سوسپانسیون سلولی، حذف بقایای سلولی با استفاده از میکروفیلتراسیون، تغلیظ روشناور کشت با استفاده از غشای اولترافیلتراسیون و استخراج مناکینون-۷ توسط روغن سویا است (شکل ۳).



شکل ۳- فرآیند صنعتی تولید مناکینون-۷ از باکتری *باسیلوس سوبتلیس*.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

مناکینون-۷ به‌دلیل نقش کوآنزیمی در زنجیره انتقال الکترون، تجمع درون سلولی اندکی داشته و به‌طور عمده در غشاء سلولی *باسیلوس سوبتلیس* به صورت فرم آزاد یافت می‌شود (Hu et al. 2017).

از حلال‌های مورد استفاده در استخراج مناکینون-۷ می‌توان به ان-هگزان، پروپانول و روغن سویا اشاره کرد (جدول ۳). استفاده از حلال‌های شیمیایی با معایبی همچون ماندگاری در محصول نهایی و اثرات زیست محیطی همراه است. بر اساس گزارشات منتشرشده، ۲۰ تا ۶۰ درصد مناکینون-۷ در فرآیند تخمیر به محیط کشت ترشح می‌شود. بنابراین، دستیابی به رویکردهایی برای افزایش ترشح مناکینون-۷ به محیط کشت، بهره‌وری تولید را بهبود می‌بخشد. از ترکیبات کارا برای ترشح مناکینون-۷ می‌توان به سورفکتانت‌های پلیمری، یونی، غیریونی و خوراکی اشاره کرد (Mahdinia et al. 2018). رن و همکاران گزارش کردند افزودن ۲۰ گرم بر لیتر روغن سویا (سورفکتانت خوراکی) به محیط کشت، ترشح مناکینون-۷ را ۶۱ درصد افزایش می‌دهد. علاوه‌بر این، از روغن سویا می‌توان به‌عنوان عامل آنتی فوم استفاده کرد (Ren et al. 2020). به‌طور کلی، افزودن روغن سویا به‌دلیل افزایش ترشح مناکینون-۷ به محیط کشت و نقش آنتی فومی کاربرد گسترده‌ای در فرآیند پایین دستی تولید مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس* ایفاء می‌کند.

جدول ۳- مطالعات مرتبط با استخراج مناکینون-۷ از *باسیلوس سوبتلیس*

رفرنس	غلظت مناکینون	سوبسترا	سامانه کشت	توضیحات	رویکرد
(Hu et al. 2017)	۴۰/۹۶ میلی‌گرم بر لیتر	گلیسرول و پپتون سویا	تخمیر بستر مایع	افزودن سورفکتانت های خوراکی مانند روغن سویا	استخراج مناکینون
(Ranmadugala et al. 2018)	افزایش ۱/۷ برابری مناکینون	گلیسرول	تخمیر بستر مایع	افزودن ان- هگزان	

نتیجه‌گیری

مناکینون به‌دلیل درمان پوکی استخوان و بیماری‌های قلبی-عروقی، چشم‌انداز روشنی در بازار مکمل‌های دارویی و غذایی دارد. باکتری گرم مثبت *باسیلوس سوبتلیس* ناتو، سویه کاندید تولید صنعتی مناکینون است. از سامانه‌های تولید مناکینون می‌توان به تخمیر بستر جامد و مایع اشاره کرد. تخمیر بستر جامد، زمانبر بوده و حجم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

کاری بالایی نیاز دارد. بنابراین برای دستیابی به بیشینه بهره‌وری تولید مناکینون، تخمیر بستر مایع در واحدهای صنعتی مورد توجه است. همچنین، گزارشات متعددی برای دستیابی به بیشینه بهره‌وری سامانه تولید مناکینون مبتنی‌بر جهش‌زایی و غربالگری، مهندسی مسیرهای متابولیکی، بهینه‌سازی عوامل موثر بر کشت، رویکردهای کارآمد تامین اکسیژن، طراحی بیوراکتورهای نوین، ترشح مناکینون به محیط کشت و ممانعت از تشکیل فوم در سامانه تولید منتشر شده است. مطالعات آینده می‌تواند رویکردهای نوین با مزایای بالقوه تولید مناکینون-۷ را معرفی کند، با این وجود جستجو برای توسعه کاربرد و تسهیل فرآیندهای تولید صنعتی این متابولیت ارزشمند برای ارتقاء سلامت بشر در سراسر دنیا همچنان ادامه دارد.

فهرست منابع

References

Baj A, Wałejko P, Kutner A, Kaczmarek Ł, Morzycki JW, Witkowski S. 2016. Convergent Synthesis of Menaquinone-7 (MK-7). Organic Process Research & Development. 20: 1026–1033.

Bentley R and Meganathan R. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. Microbiological Reviews. 46: 241–280.

Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, Biffin R, Regtop H, Valtchev P, Kavanagh J, Dehghani F. 2011. Efficient media for high menaquinone-7 production: Response surface Methodology Approach. New Biotechnology. 28, 665-672.

Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, Regtop H, Kavanagh J, Dehghani F. 2014. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of menaquinone-7. Applied Biochemistry and Biotechnology. 172: 1347-1357.

Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, Regtop H, Kavanagh J, Dehghani F. 2012. Advances in menaquinone-7 production by *Bacillus subtilis* natto: Fed-batch glycerol addition. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 8: 105–110.

Bonaldo F and Leroy F. 2024. Review: Bacterially produced vitamin K2 and its potential to generate health benefits in humans. Trends in Food Science and Technology. 147.

Chollet M, Guggisberg D, Portmann R, Risse MC, Walther B. 2017. Determination of menaquinone production by *Lactococcus* spp. and propionibacteria in cheese. International Dairy Journal. 75: 1-9.

Dairi T. 2012. Menaquinone biosyntheses in microorganisms. Methods in Enzymology. 515: 107-122.

Hu Xc, Liu Wm, Luo Mm, Ren Lj, Ji Xj, Huang H. 2017. Enhancing menaquinone-7 production by *Bacillus natto* R127 through the nutritional factors and surfactant. Applied Biochemistry and Biotechnology. 182: 1630-1641.

Iwamoto J, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H. 2011. Bone quality and vitamin K2 in type 2 diabetes: Review of preclinical and clinical studies. Nutrition Reviews. 69: 162-167.

Kang MJ, Baek KR, Lee YR, Kim GH, Seo SO. 2022. Production of vitamin K by Wild-type and engineered microorganisms. Microorganisms. 10 (3): 554.

Kong MK, Lee PC. 2011. Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of *Escherichia coli* as a microbial platform for vitamin K production. Biotechnology and Bioengineering. 108: 1997-2002.

Kyla Shea M and Holden RM. 2012. Vitamin K status and vascular calcification: Evidence from

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

observational and clinical studies. Advances in Nutrition. 3: 158-165.
Lal N, Seifan M, Berenjian A. 2023. Fermentation of menaquinone-7: The influence of environmental factors and storage conditions on the isomer profile. Processes. 11: 6.
Lal N, Seifan M, Berenjian A. 2022. The impact of key fermentation parameters on the production of the all-trans isomer of menaquinone-7. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 46.
Li Y, Chen Jp, Duan L, Li S. 2018. Effect of vitamin K2 on type 2 diabetes mellitus: A review. Diabetes Research and Clinical Practice. 136: 39-51.
Luo Mm, Ren Lj, Chen Sl, Ji Xj, Huang H. 2016. Effect of media components and morphology of Bacillus natto on menaquinone-7 synthesis in submerged fermentation. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 21: 777-786.
Ma Xc, Zhu Sy, Luo Mm, Hu Xc, Peng C, Huang H, Ren LJ. 2019. Intracellular response of Bacillus natto in response to different oxygen supply and its influence on menaquinone-7 biosynthesis. Bioprocess and Biosystems Engineering. 42: 817-827.
Ma Y, McClure DD, Somerville MV, Proschogo NW, Dehghani F, Kavanagh JM, Coleman NV. 2019. Metabolic Engineering of the MEP Pathway in *Bacillus subtilis* for Increased Biosynthesis of Menaquinone-7. ACS Synthetic Biology. 8: 1620-1630.
Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. 2018. Enhanced vitamin K (Menaquinone-7) production by *Bacillus subtilis* natto in biofilm reactors by optimization of glucose-based medium. Current Pharmaceutical Biotechnology. 19: 917-924.
Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. 2017. Production and application of menaquinone-7 (vitamin K2): a new perspective. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 33(1): 2.
Orlando P, Silvestri S, Marcheggiani F, Cirilli I, Tiano L. 2019. Menaquinone 7 stability of formulations and its relationship with purity profile. Molecules. 24(5): 829.
Ren L, Peng C, Hu X, Han Y, Huang H. 2020. Microbial production of vitamin K2: current status and future prospects. Biotechnology Advances. 39: 107453.
Sato T, Yamada Y, Ohtani Y, Mitsui N, Murasawa H, Araki S. 2001. Efficient production of menaquinone (vitamin K2) by a menadione-resistant mutant of *Bacillus subtilis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 26: 115-120.
Singh R, Puri A, Panda BP. 2015. Development of menaquinone-7 enriched nutraceutical: inside into medium engineering and process modeling. Journal of Food Science and Technology. 52: 5212-5219.
Song J, Liu H, Wang L, Dai J, Liu Y, Liu H, Zhao G, Wang P, Zheng Z. 2014. Enhanced production of vitamin K2 from *Bacillus subtilis* (natto) by mutation and optimization of the fermentation medium. Brazilian Archives of Biology and Technology. 57 (04): 606–612.
Tanha K, Fahimfar N, Nematollahi S, Sajjadi-Jazi SM, Gharibzadeh S, Sanjari M, Khalagi K, Hajivalizedeh F, Raeisi A, Larijani B, Ostovar A. 2021. Annual incidence of osteoporotic hip fractures in Iran: a systematic review and meta-analysis. BMC Geriatrics. 21: 1–8.
Tani Y, Asahi S, Yamada H. 1986. Menaquinone (Vitamin K2) -6 Production by mutants of *Flavobacterium meningosepticum.* Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 32: 137–145.
Tarvainen M, Fabritius M, Yang B. 2019. Determination of vitamin K composition of fermented food. Food Chemistry. 275: 515-522.
Tsukamoto Y, Kasai M, Kakuda H. 2001. Construction of a *Bacillus subtilis* (natto) with High productivity of vitamin K2 (Menaquinone-7) by Analog resistance. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 65: 2007-2015.
Walther B and Chollet M. 2017. Menaquinones, bacteria, and foods: Vitamin K2 in the diet. In: Gordeladze J (Ed.) Vitamin K2 - Vital for Health and Wellbeing, University of Oslo, Norway.
Wang Y, Zhang Z, Zhou Y, Qi L, Bao F, Fu S, Li T, Li S. 2023. High synthetic mechanisms and concentration improvement of menaquinone-7 from *Bacillus subtilis* subsp. natto. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 54.
Wang H, Sun X, Wang L, Wu H, Zhao G, Liu H, Wang P, Zheng Z. 2018. Coproduction of menaquinone-7 and nattokinase by *Bacillus subtilis* using soybean curd residue as a renewable substrate combined with a dissolved oxygen control strategy. Annals of Microbiology. 68: 655-665.
Willems BAG, Vermeer C, Reutelingsperger CPM, Schurgers LJ. 2014. The realm of vitamin K dependent proteins: Shifting from coagulation toward calcification. Molecular Nutrition and Food

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]

Research. 58: 1620-1635.
Wu WJ, Ahn BY. 2011. Improved menaquinone (Vitamin K 2) production in cheonggukjang by optimization of the fermentation conditions. Food Science and Biotechnology. 20: 1585-1591.
Zhao C, Wan Y, Tang G, Jin Q, Zhang H, Xu Z. 2021. Comparison of different fermentation processes for the vitamin K2 (Menaquinone-7) production by a novel *Bacillus velezensis* ND strain. Process Biochemistry. 102: 33-41.
Xu Jz, Zhang Wg, 2017. Menaquinone-7 production from maize meal hydrolysate by Bacillus isolates with diphenylamine and analogue resistance. Journal of Zhejiang University: Science B. 18: 462-473.
Xu JZ, Yan WL, Zhang WG. 2017. Enhancing menaquinone-7 production in recombinant: *Bacillus amyloliquefaciens* by metabolic pathway engineering. RSC Advances. 45: 28527-28534.
Yang S, Cao Y, Sun L, Li C, Lin X, Cai Z, Zhang G, Song H. 2019. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* to promote de novo biosynthesis of menaquinone-7. ACS Synthetic Biology. 8: 70-81.

A Review of the Strategies to Attain the Maximum Productivity of Menaquinone Production from *Bacillus subtilis*

Majid Azizi[1*], Saeed Soheilivand[1]

1- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

smajidazizi@yahoo.com

Abstract

Increasing the productivity of processes as well as ease in up-scaling are prerequisites to enhancing the use of menaquinone-7 in various industries such as pharmaceutical and food. This review first focuses on the introduction, global trade, market value, and application of menaquinone-7. Then various strategies of industrial production are introduced along with related challenges. Next, the relative advantage of menaquinone-7 production from microbial sources, biosynthesis pathways, and key enzymes will be investigated. At the end, the strategies to enhance menaquinone-7 productivity such as mutagenesis and screening, metabolic pathway engineering, bioprocess engineering, and menaquinone-7 extraction from *Bacillus subtilis* will be introduced.

Keywords: Vitamin K, Menaquinone, *Bacillus subtilis*, Productivity, Bioprocesses.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-09-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1401.15.3.6.4]