

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет медико-фармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «Мікробіологічний синтез вітаміну К2 (менахінон) та
перспективи його застосування в нутрицевтиках»**

Виконав: здобувачка вищої освіти групи ПБТМ24(1,6д)-01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Дарина СИДОРЕНКО

Керівник: доцент закладу вищої освіти
кафедри біотехнології, к. фарм. н., с.н.с. Наталія ДВІНСЬКИХ

Рецензент: Начальник відділу фармацевтичної розробки ТОВ
«БІОЛІК ФАРМА», к.фарм.н., с.н.с. Олена НАЗАРОВА

Харків – 2026 рік

АНОТАЦІЯ

У кваліфікаційній роботі розглянуто мікробіологічний синтез вітаміну К₂ (менахінону) та перспективи його застосування в нутрицевтиках. Проаналізовано біохімічні властивості та фізіологічну роль менахінонів, зокрема форми МК-7, яка характеризується високою біодоступністю та тривалим періодом напіввиведення. Узагальнено сучасні дані щодо штамів мікроорганізмів-продуцентів вітаміну К₂, основних шляхів його біосинтезу, методів метаболічної інженерії та оптимізації умов культивування. Розглянуто технологічні етапи отримання, вилучення та очищення менахінону, а також проаналізовано стан і тенденції ринку нутрицевтичних продуктів з вітаміном К₂ в Україні. Запропоновано узагальнену технологічну схему мікробного синтезу МК-7 та обґрунтовано перспективність його використання у складі функціональних харчових добавок.. Загальний обсяг роботи – 57 стор., кількість таблиць 6, рисунків 8, джерел літератури 36, додатків 1.

Ключові слова: вітамін К₂, менахінон-7, мікробіологічний синтез, *Bacillus subtilis*, метаболічна інженерія, нутрицевтики.

ANNOTATION

The qualification work considers the microbiological synthesis of vitamin K₂ (menaquinone) and the prospects for its application in nutraceuticals. The biochemical properties and physiological role of menaquinones, in particular the MK-7 form, which is characterized by high bioavailability and a long half-life, are analyzed. Current data on strains of microorganisms producing vitamin K₂, the main pathways of its biosynthesis, methods of metabolic engineering and optimization of cultivation conditions are summarized. The technological stages of obtaining, extracting and purifying menaquinone are considered, and the state and trends of the market of nutraceutical products with vitamin K₂ in Ukraine are analyzed. A generalized technological scheme for microbial synthesis of MK-7 is proposed and the prospects for its use in functional food additives are substantiated. The total volume of the work is 57 pages, the number of tables is 6, figures is 8, references are 36, and appendices are 1.

Keywords: vitamin K₂, menaquinone-7, microbiological synthesis, *Bacillus subtilis*, metabolic engineering, nutraceuticals..

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Розділ 1 Огляд літератури.....	7
1.1 Властивості вітаміну К	7
1.2 Споживання та статус вітаміна К на ринку	11
1.3 Використання вітаміну К ₂ в дієтичних добавках та спортивному харчуванні	14
1.4 Технологічні аспекти отримання вітаміну К ₂ мікробним синтезом	17
Висновок до I розділу	25
Розділ 2 Об'єкти та методи досліджень.....	27
2.1. Структура вітаміну К	27
2.2. Механізми біосинтезу менахінонів	29
2.3. Механізми фізіологічної дії менахінонів.....	30
2.4. Окисно-відновний цикл вітаміну К.....	34
2.5. Методи досліджень.....	35
Висновок до 2 розділу.....	35
Розділ 3 Експериментальна частина.....	37
3.1 Біотехнологічні підходи до виробництва вітаміну К	37
3.2 Аналіз продуцентів та шляхів їх удосконалення	38
3.3 Шляхи підвищення продуктивності мікробного синтезу вітаміну К ₂ модифікацією мікроорганізмів.....	43
3.4 Оптимізація технологічного процесів мікробного синтезу вітаміну К ₂	46
3.5 Схема технологічного процесу отримання вітаміну К ₂	49
3.6 Напрями подальших досліджень.....	54
Висновок до 3 розділу	55
Висновки.....	57
Список використаних джерел.....	58
Додаток. Публікації за темою роботи.....	63

ВСТУП

Актуальність теми. Вітамін К₂ (менахінон) є одним із найважливіших жиророзчинних вітамінів, що відіграє ключову роль у процесах кальцієвого обміну, формуванні кісткової тканини та підтриманні нормальної функції серцево-судинної системи. На відміну від вітаміну К₁, який переважно надходить із рослинних джерел, менахінон синтезується мікроорганізмами та має більш тривалий період біологічної активності, що зумовлює його вищу ефективність у профілактиці остеопорозу, атеросклерозу та інших метаболічних порушень.

Зростаючий інтерес до нутрицевтиків природного походження, а також тенденція до зниження використання синтетичних добавок, зумовлюють потребу у розробці екологічно безпечних біотехнологічних методів одержання вітаміну К₂. Мікробіологічний синтез є перспективним напрямом, оскільки дає змогу отримувати біологічно активний продукт із високим ступенем чистоти та мінімальними витратами.

Особливу увагу привертають штами бактерій родів *Bacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та *Escherichia*, здатні до біосинтезу менахінонів різної довжини ланцюга. Оптимізація умов культивування та підбір ефективних продуцентів відкривають нові можливості для промислового виробництва вітаміну К₂.

Це є підставою звернути увагу на те, що роль та значення спеціалізованих продуктів харчування, що містять компоненти функціональної дії, зокрема вітамін К₂, дослідження мікробіологічного синтезу вітаміну К₂ та вивчення перспектив його використання у складі нутрицевтичних препаратів є актуальним науковим напрямом, який поєднує фундаментальні знання мікробіології, біотехнології та харчової хімії, сприяючи створенню безпечних і ефективних засобів для підтримання здоров'я людини.

Метою дослідження є аналіз сучасних біотехнологічних підходів до промислового виробництва вітаміну К₂, вивчення властивостей та потенціалу різних продуцентів, дослідження можливостей удосконалення технологічних процесів на основі метаболічної інженерії та розробка узагальненої схеми технологічного процесу одержання МК-7 мікробним синтезом.

Для досягнення мети треба було виконати такі **завдання**:

1. Проаналізувати біохімічні характеристики вітаміну К₂ та його фізіологічних форм.
2. Розглянути особливості біосинтезу менахінонів у бактеріальних клітинах.
3. Визначити найбільш перспективні штами-продуценти. Опрацювати технологічні характеристики штамів, які є найпоширенішими продуцентами МК-7.
4. Проаналізувати основні методи метаболічної інженерії, що застосовуються для збільшення продуктивності мікробного синтезу менахінонів.
5. Проаналізувати основні тенденції ринку менахінону в Україні. Розглянути форми випуску засобів із вмістом менахінону.
6. Визначити технологічні прийоми отримання вітаміну К₂, їх очистки та отримання продукту в доцільній та зручній для споживання формі.
7. Запропонувати орієнтовну технологічну схему вітаміну К₂.

Об'єкти дослідження: мікроорганізми-продуценти вітаміну К₂, зокрема штами бактерій родів *Bacillus*, *Lactococcus* та *Propionibacterium*; умови культивування, що впливають на біосинтез менахінону (температура, рН середовища, джерела вуглецю та азоту, аерація тощо); процес виділення та очищення вітаміну К₂ із культуральної рідини; біохімічні та спектрофотометричні методи кількісного визначення вітаміну К₂; перспективи використання одержаного вітаміну К₂ як активного компонента у складі нутрицевтичних препаратів.

Предметом дослідження є біотехнологічні особливості синтезу менахінону мікроорганізмами-продуцентами, умови культивування, що впливають на його накопичення, методи виділення та ідентифікації вітаміну К₂, а також наукові та практичні аспекти використання одержаного біопродукту у нутрицевтичних технологіях.

Методи дослідження. методи порівняльного аналізу технологічних процесів мікробного синтезу, систематизації даних про штами-продуценти та методи їх оптимізації, а також методи структурно-логічного моделювання для формування узагальненої технологічної схеми виробництва вітаміну К₂.

Практичне значення отриманих результатів. Результати, отримані у кваліфікаційній роботі, мають практичну цінність для нутриціології та біотехнологічної галузі. Узагальнений аналіз мікробіологічних методів синтезу вітаміну К₂ (менахінону-7), підходів до підвищення продуктивності штамів-продуцентів та оптимізації технологічних параметрів може бути використаний при розробці та впровадженні промислових технологій отримання МК-7. Запропонована орієнтовна технологічна схема мікробного синтезу вітаміну К₂ може слугувати основою для створення вітчизняного виробництва нутрицевтичних препаратів із високою біодоступністю та стабільністю. Матеріали роботи можуть бути використані у подальших наукових дослідженнях, спрямованих на розширення асортименту функціональних харчових продуктів.

Апробація результатів дослідження і публікації.

Результати досліджень опубліковані в матеріалах конференції:

Сидоренко Д. Д. Сучасні біотехнологічні підходи до промислового виробництва вітаміну К₂ мікробіологічним синтезом / Сидоренко Д. Д., наук. кер.: Двінських Н.В. // Youth Pharmacy Science: мат. VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (10-11 грудня 2025 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2025. – С. 217-219.

Зроблено доповідь на тему: «Особливості технологічного процесу отримання менахінону (вітаміну K2)» на VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Youth Pharmacy Science» (10-11 грудня 2025 р., м. Харків).

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.

Робота складається з вступу, трьох розділів - огляду літератури, об'єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 57 стор., кількість таблиць 6, рисунків 8, джерел літератури 36, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Властивості вітаміну К.

Вітамін К — це жиророзчинний вітамін, який існує у двох формах. Основний тип називається філохінон і міститься в зелених листових овочах, таких як капуста, капуста-кале та шпинат. Інший тип, менахінони, міститься в деяких продуктах тваринного походження та ферментованих продуктах. Менахінони також можуть вироблятися бактеріями в організмі людини [6, 12, 30].

Вітамін К також допомагає виробляти різноманітні білки, які необхідні для згортання крові та будівництва кісток. Протромбін – це вітамін К-залежний білок, який безпосередньо бере участь у згортанні крові. Остеокальцин – це ще один білок, якому також потрібен вітамін К для вироблення здорової кісткової тканини.

Вітамін К наявний в усьому організмі, включаючи печінку, мозок, серце, підшлункову залозу та кістки. Він швидко розщеплюється та виводиться з сечею чи калом. Через це він рідко досягає токсичного рівня в організмі людини навіть при високому споживанні, як це іноді може траплятися з іншими жиророзчинними вітамінами [6, 17, 25].

На відміну від вітаміну К₁, вітамін К₂ виконує низку ферментативних функцій. Цей вітамер бере участь у синтезі ферментів, які каталізують перетворення залишків глютамінової кислоти на γ -карбоксивітамінової (Gla) білки, регулюючи подальшу активність останніх. Завдяки цьому вітамін К₂ забезпечує низку життєво важливих фізіологічних процесів, зокрема [5, 6, 17, 25, 29, 33-35]:

- **контроль системи згортання крові** та зупинку кровотеч шляхом стимулювання синтезу і активації факторів згортання, антикоагулянтних білків, а також утворення активних форм тромбіну й тромбопластину у печінці;

- **регуляцію кальцієвого обміну** та профілактику остеопорозу через стимулювання остеобластів до синтезу остеокальцину;
- **запобігання патологічній кальцифікації судинних стінок і хрящової тканини** завдяки активації синтезу матричного Gla-білка (MGP);
- **профілактику ряду патологічних станів**, таких як онкологічні захворювання, венозна тромбоемболія, системний червоний вовчак, мезангіальний проліферативний гломерулонефрит, хронічна ниркова недостатність та прееклампсія, що пов'язано зі стимулюванням продукції білка GAS6;
- **участь у міжклітинних взаємодіях**, прикріпленні клітин і міграції епітеліальних структур, необхідних для формування тканин під час ембріогенезу, регенерації та імунних реакцій, шляхом активації синтезу білка періостину (POSTN).

Крім того, вітамін K₂ залучений до синтезу пролін-багатих білків (PRGP), трансмембранних протеїнів (TMG) та білків GRP. Хоча функції цих сполук остаточно не з'ясовані, відомо, що вони виконують важливі біологічні ролі в організмі людини і не проявляють токсичної чи патогенної дії [29].

За останні роки було проведено багато досліджень, які підтверджують ефективність вітаміну K₂ (МК-7) у підтримці здоров'я, про що було згадано вище. Дефіцит вітаміну K₂ пов'язують із кальцифікацією судин та остеопорозом. Матричний GLa-білок (MGP) – це вітамін K-залежний білок, який при активації пригнічує кальцифікацію судин та м'яких тканин [5, 6, 29, 33, 35].

Дослідження, опубліковане в лютому 2024 року, показало, що вітамін K₂ значно знижує вагу, жир у черевній порожнині та печінковій жировій тканині у мишей на дієті з високим вмістом жирів, що підкреслює його захисну роль проти неалкогольної жирової хвороби печінки [27].

Тобто, окрім участі у синтезах, вітамін K виконує і інші важливі функції, що відображено в табл. 1.1 [5, 6, 8, 12, 17, 25, 33-35].

Фізіологічна функції вітаміну K₂

Види впливу/функції	Опис функції
Активація білків-VKDP (Vitamin K-Dependent Proteins)	Менахінон є кофактором γ-глутамінат-карбоксилази, що допомагає перетворювати глутамінову кислоту в γ-карбоксиглутамат (Gla) у білках, активуючи їх (наприклад, остеокальцин, MGP та ін.)
Підтримка кісткової тканини	Сприяє мінералізації кісток через активацію остеокальцину; зменшує ризик остеопорозу
Запобігання кальцифікації судин	Через активацію матричного Gla-білка (MGP) попереджає відкладення кальцію в артеріальних стінках, сприяє збереженню еластичності судин
Підтримка серцево-судинного здоров'я	Зменшує ризик коронарного кальцинозу, артеріальної жорсткості; спостерігається зниження ризику захворювань серця при адекватному споживанні K ₂
Позитивний вплив на нирково-кістково-судинний синдром	Хворі на хронічну хворобу нирок (ХХН) схильні до накопичення кальцію в м'яких тканинах (судинах, клапанах), що погіршує серцево-судинні наслідки. Вітамін К впливає на ектопічну (неправильну) кальцифікацію у пацієнтів із ХХН, запобігає їй, захищаючи судини
Метаболізм і енергетичний обмін	K ₂ відіграє роль у транспортуванні кальцію, бере участь у регуляції інсулінової чутливості, показниках глюкози; має антиоксидантні ефекти
Підтримка розвитку мозку / нейропротекція	У дітей та підлітків K ₂ необхідний для активації білків (наприклад Gas6, Protein S) що пов'язані з розвитком мозку, апоптозом, клітинним ростом; підтримка синтезу сфінголіпідів. Встановлено послідовний зворотний зв'язок між рівнем вітаміну К та депресивними симптомами в різних популяціях людей. Досліджується зв'язок між рівнем вітаміну К та когнітивною функцією у людей похилого віку

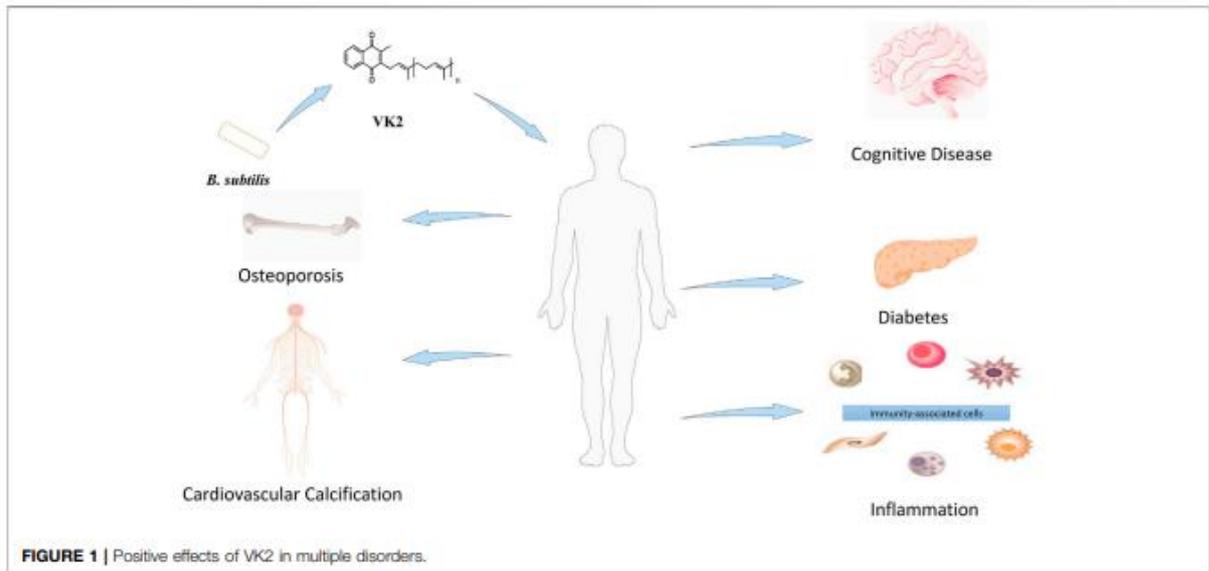


Рис. 1.1. Позитивний вплив вітаміну K_2 при множинних розладах [1].

Завдяки своїм властивостям, K_2 розглядається як компонент нутрицевтиків, спрямованих на здоров'я кісток, серцево-судинної системи, можливо на уповільнення вікових змін, зменшення запалення, що й обумовлює перспективи його використання в нутрицевтиках / дієтичних добавках.

Виробництво нутрицевтичних сполук за допомогою біосинтетичних методів останніми роками привертає значну увагу. Наприклад, виробництво менахінону-7 (МК-7), підтипу вітаміну K_2 , біосинтезом у клітинах *Bacillus subtilis*, виявилось більш ефективним, ніж за допомогою традиційних методів хімічного синтезу [1, 16, 17, 24]. Це обумовлено також тим, що вітамін K_2 є біологічно активним лише у своїй транс-ізомерній формі, тоді як хімічно синтезована цис-ізомерна форма є біологічно неактивною. На цій основі складно синтезувати стереоселективну біологічно активну транс-конфігурацію вітаміну K_2 хімічним шляхом. Тому транс-ізомерний вітамін K_2 наразі користується високим попитом [6].

Інформація щодо біодоступності різних форм вітаміну K , отриманих із харчових джерел, наразі є обмеженою. Відомо, що філохінон у вільному вигляді засвоюється організмом приблизно на 80%, проте його абсорбція з продуктів харчування відбувається значно повільніше. Це пов'язано з тим,

що у рослинній їжі філохінон міцно зв'язаний із хлоропластами, через що його біодоступність нижча, ніж у складі олій або дієтичних добавок. Спільне споживання овочів із невеликою кількістю жирів (зокрема рослинних олій) покращує засвоєння філохінону, однак рівень його поглинання все ж залишається нижчим порівняно з тим, який спостерігається при вживанні чистих олійних форм [5, 17, 30].

Мікробне виробництво вітаміну K_2 є порівняно кращим варіантом, оскільки дозволяє селективно виробляти тільки транс-ізомери, однак має низьку врожайність. Тому не втрачає актуальності завдання розробки нових технологій, які підвищать бактеріально синтезований K_2 в промислових масштабах.

1.2. Споживання та статус вітаміна К на ринку.

Світовий ринок вітаміну K_2 у 2024 році оцінювався приблизно у 292,4 млн доларів США. Очікується, що до 2030 року його обсяг зросте до 602,0 млн доларів США, демонструючи середньорічний темп зростання (CAGR) 13,5% у період 2025–2030 років.

Основними чинниками зростання ринку є підвищення обізнаності споживачів щодо користі вітаміну K_2 для здоров'я, а також демографічні та поведінкові зміни, зокрема старіння населення, зростання інтересу до функціональних продуктів харчування та безперервні наукові дослідження, які підтверджують його лікувально-профілактичні властивості [27].

Ключові ринкові тенденції виначаються в тому, що:

- Північна Америка у 2024 році утримувала провідну позицію на ринку з часткою 35,18%;
- очікується стабільне розширення ринку вітаміну K_2 у Сполучених Штатах протягом прогнозного періоду;
- за формою випуску найбільшу частку займав сегмент капсул і таблеток — 42,05%;
- у розрізі сфер застосування лідером був сегмент здоров'я кісток, який у 2024 році забезпечив 36,41% ринку;

- за типом продукту домінував сегмент МК-7, що мав найбільшу частку у загальній структурі ринку [27].

Індустрія вітаміну К₂ характеризується високим ступенем інновацій. Впроваджуються нові формати доставки, такі як жувальні таблетки, капсули та навіть продукти, збагачені К₂, щоб задовольнити різноманітні вподобання споживачів. Компанії також досліджують нові комбінації інгредієнтів, змішуючи вітамін К₂ з іншими необхідними поживними речовинами, такими як вітамін D та кальцій, для посилення користі. Крім того, досягнення у сфері сталого постачання та методів виробництва стимулюють розробку високоякісних, екологічно чистих продуктів з вітаміном К₂.

Ринок дедалі більше формується під впливом зростаючого споживчого інтересу до підтримки здоров'я кісткової тканини, серцево-судинної системи та превентивної медицини. У міру того як споживачі все частіше зосереджуються на збереженні здоров'я в довгостроковій перспективі, вітамін К₂ — зокрема завдяки його ролі в контролі кальцієвого обміну та процесах мінералізації кісток — привертає все більшу увагу. Підвищений інтерес також зумовлений загальною тенденцією до використання натуральних, науково підтверджених рішень, а також зростанням обізнаності населення щодо значення вітамінів для підтримки здоров'я [27, 28, 36].

У 2024 році сегмент МК-7 утримував провідну частку світового ринку, що зумовлено його природним походженням — формою менахінону-7, яку отримують із ферментованих продуктів, зокрема натто. Порівняно з МК-4, МК-7 вирізняється вищою біодоступністю та більш тривалою дією в організмі.

Наукові дослідження підтверджують, що МК-7 сприяє підтримці серцево-судинного здоров'я, зменшуючи ризик кальцифікації артерій і забезпечуючи нормальні процеси згортання крові. Так, у лютому 2024 року було оприлюднено дані, згідно з якими щоденне споживання 375 мкг вітаміну К₂ МК-7 від Карра Bioscience протягом 24 тижнів сприяло зниженню ризику серцево-судинних захворювань шляхом уповільнення

артеріальної жорсткості у пацієнтів із діабетом, які проходили хронічний гемодіаліз [27].

Крім того, поширення веганського та рослинного способу харчування посилило попит на добавки МК-7, які зазвичай мають нетваринне походження. Зростання поінформованості споживачів щодо відмінностей і переваг різних форм вітаміну К₂ сприяло активнішому зростанню продажів продуктів на основі МК-7, що додатково підтримало розвиток цього сегмента ринку [27].

Прогнозування росту світового ринку вітаміну К₂ пов'язане з ростом обізнаності щодо користі цього вітаміну також серед людей похилого віку та зростанням кількості старіючого населення [27].

Такі чинники та дослідження мотивують виробників розширювати асортимент і збільшувати обсяги випуску лікарських препаратів та дієтичних добавок, що сприяє подальшому зростанню світового ринку вітаміну К₂ [27, 28].

На рис. 1.2 наведено дані звіту щодо зростання індустрії вітаміну К₂ [27].

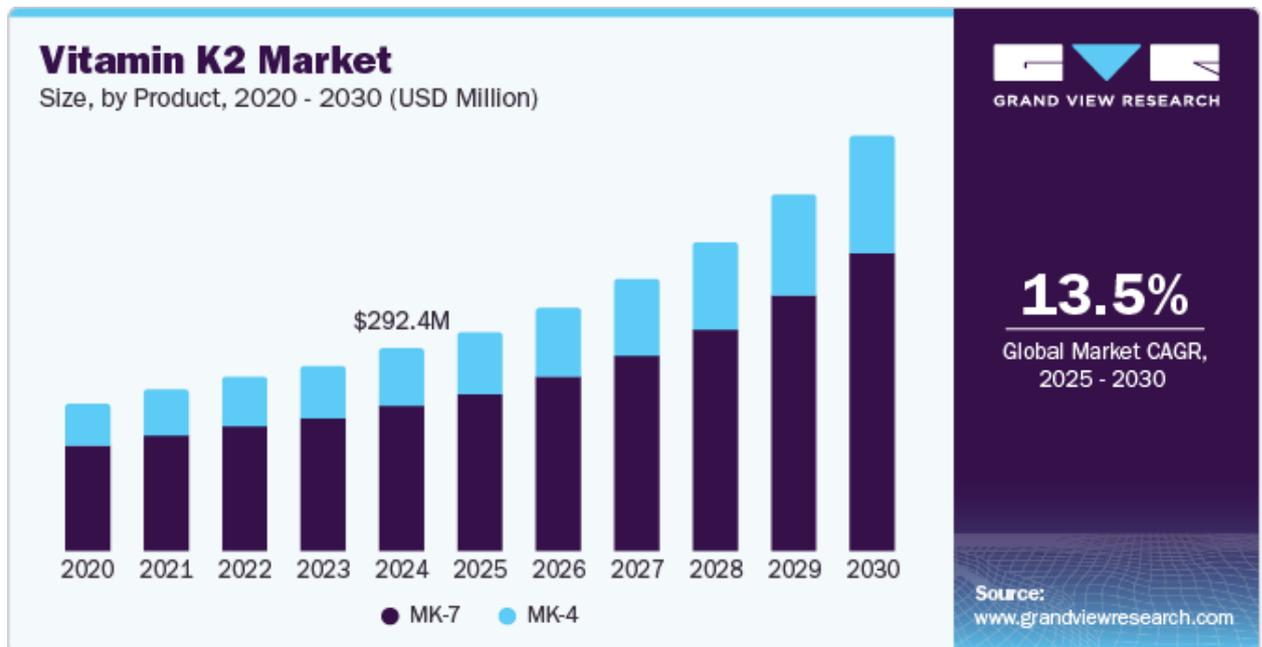


Рис. 1.2. Дані звіту щодо зростання індустрії вітаміну К₂ [27].

Розвиток ринку вітаміну K_2 значною мірою пов'язаний із розширенням продуктових ліній компаній-виробників. Підприємства активно впроваджують інноваційні формули та сучасні способи доставки речовини. Очікується, що поява нових форматів — таких як капсули, таблетки, м'які гелеві форми, рідкі засоби та комбіновані добавки — сприятиме подальшому зростанню попиту на нутрицевтичному ринку [27, 28].

Наприклад, у січні 2021 року компанія MENADIONA представила новий тип вітаміну K_2 - МК-7, призначений для використання в нутрицевтиці відповідно до стандартів чистоти Фармакопеї США. Це оновлення розширило асортимент продукції компанії, доповнивши існуючі форми K_2 МК-4 і зміцнивши її позиції на ринку [27].

На ринку України представлено широкий асортимент добавок як вітчизняного, так і імпортного виробництва. Основними формами випуску є капсули, таблетки та м'які гелеві капсули, що містять вітамін K_2 у формах менахінон-4 (МК-4) та менахінон-7 (МК-7). Багато виробників поєднують вітамін K_2 із вітаміном D_3 або кальцієм, що підсилює їхню біологічну дію.

1.3. Використання вітаміну K_2 в дієтичних добавках та спортивному харчуванні.

У наш час збереження та підтримка здоров'я посідають провідне місце серед життєвих пріоритетів людини. Вагому роль у цьому відіграють дієтичні добавки та збагачені нутрієнтами харчові продукти, які сприяють забезпеченню організму необхідними поживними речовинами, зокрема вітамінами та мікроелементами. Однією з таких цінних сполук є вітамін K_2 , що має важливе значення для підтримання належного рівня здоров'я.

Для прикладу проведено аналіз сучасного стану українського ринку дієтичних добавок, що містять вітамін K_2 . В табл. 1.2 наведено порівняльну характеристику продуктів найпоширеніших торгових марок за такими показниками, як назва, склад, країна-виробник та форма випуску. Отримані результати свідчать, що переважне місце належить комбінованим препаратам із природним менахіноном-7, які мають високу біодоступність. Це

підтверджує перспективність розвитку українського ринку нутрицевтиків із вмістом вітаміну К₂ та необхідність подальших досліджень у напрямі вдосконалення складу і форм випуску таких добавок.

Таблиця 1.2

Аналіз продуктів з вітаміном К₂ на ринку України [26, 30-32]

Назва	Склад	Форма випуску	Виробник
1	2	3	4
Натуральний вітамін К ₂ (менахінон-7) 100 мкг	Вітамін К ₂ (у вигляді менахінону-7) - 100 мкг. Кальцій - 115 мг.	Капсули	СОЛГАР ІНК., США
Остеоцитрат Макс	1 саше 3,3 г містить: активні інгредієнти: кальцію цитрат 2400 мг еквівалентно кальцію 500 мг, магній (у вигляді магнію цитрату) 25 мг, цинк (у вигляді цинку цитрату) 3,75 мг, вітамін К ₂ (менахінон-7) 50 мкг, вітамін D ₃ (холекальциферол) 25 мкг (1000 МО (IU)); допоміжні речовини: цикламат натрію, апельсиновий ароматизатор, сахарин натрію.	Порошок для орального розчину з апельсиновим смаком у саше	GADOT BIOCHEMICAL INDUSTRIES LTD, Ізраїль
Д Мекс 5000 + К ₂	Вітамін D ₃ 125,0 мкг (5000 IU (МО)). Вітамін К ₂ (МК-7) 100 мкг	Таблетки	ТАКТУС НУТРАСАЙЕНС ЛПІ, Індія
Вітамін К ₂ рідкий	Vitamin K (як К ₂ (МК-4))	Розчин	Thorne Research, США
Вітамін К ₂ МК-7	Вітамін К ₂ (МК-7) 100 мкг	Капсули	Doctor's Best, США
Вітамін К ₂ -менахінон-7	Вітамін К ₂ (МК-7) 100 мкг	Капсули	Biotus, Україна

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4
«Аспротек» дієтична добавка з підсолоджу- вачем стимулятор регенерації кісткової та хрящової тканин	Кальцій 1000 мг, Глюкозаміну сульфат 750 мг, Хондроїтину сульфат 600 мг, Метилсульфонілметан (МСМ) 750 мг, Вітамін D ₃ (холекальциферол) 25 мкг, Вітамін K ₂ (у вигляді менахінон-7 (МК-7) 20 мкг,	Порошок в саше	PHARMA ROSSO GIDA ILAC KOZMETİK MEDİKAL Туреччина
«Каліста» джерело кальцію, фосфору та вітамінів D ₃ та K ₂	Вітамін K ₂ , Вітамін D ₃ , Гліцин, Кальцій та фосфор	Таблетки	DELTA MEDICAL PROMOTIO NS, Німеччина
Магнірен	Цитрат магнію – 2600 мг, вітамін K ₂ у формі менахінону МК-7 10 мг, допоміжні речовини: ароматизатор зелене яблуко, діоксид кремнію	Порошок в саше	СИСТЕМ ФАРМ ТОВ, Україна
Вітамін К LIFE EXTENSION	Вітамін С (у вигляді аскорбілу пальмітату) - 10 мг (mg), Вітамін K ₁ (у вигляді фітонадіону) - 1500 мкг (mcg), Вітамін K ₂ (у вигляді менахінону-4) - 1000 мкг (mcg), Вітамін K ₂ (у вигляді транс- менахінону-7) - 100 мкг (mcg)	Капсули	КВОЛІТІ САППЛЕМЕ НТС ЕНД ВІТАМІНС, США

Сфера виробництва вітаміну K₂ відзначається активним розвитком і впровадженням інноваційних рішень. Постійно з'являються нові форми випуску — жувальні таблетки, капсули та харчові продукти, збагачені вітаміном K₂, що дозволяє враховувати різні вподобання споживачів. Виробники експериментують із поєднанням K₂ з іншими важливими нутрієнтами, зокрема з вітаміном D і кальцієм, щоб посилити позитивний вплив добавок на здоров'я. Крім того, удосконалення технологій виробництва та впровадження екологічних підходів сприяють створенню

більш якісних і безпечних для довкілля продуктів, що містять вітамін К₂ [27, 28].

1.4. Технологічні аспекти отримання вітаміну К₂ мікробним синтезом.

Виробництво нутрицевтичних сполук за допомогою біосинтетичних підходів отримало значну увагу в останні роки. Наприклад, МК-7, підтип вітаміну К₂, біосинтезований у *Bacillus subtilis*, виявився більш ефективним, ніж отриманий традиційними методами хімічного синтезу. Це стало можливим завдяки розвитку генетичної інженерії *B. subtilis* як клітини-шасі. Вкрай важливо мати розуміння модифікацій проникності мембран *B. subtilis*, використання біоплівкових реакторів та оптимізації ферментації як передових методів, що стосуються виробництва МК-7.

Хоча традиційний метод редагування генів за допомогою гомологічної рекомбінації покращує біосинтетичний шлях, CRISPR-Cas9 потенційно може вирішити недоліки традиційних методів редагування геному. З цих причин майбутні дослідження повинні вивчити застосування інструментів редагування генів систем CRISPRi (інтерференція CRISPR) та CRISPRa (активація CRISPR) у шляху анаболізму МК-7.

Етапи біотехнологічного процесу отримання вітаміну К₂

Основним способом біотехнологічного отримання вітаміну К₂ є ферментативний синтез за участю бактерій, здатних продукувати менахінони. Зокрема, штами *Bacillus subtilis* широко використовуються для виробництва МК-7 через їхню здатність виробляти довголанцюгові менахінони.

В роботах [1, 2, 5, 7, 9, 12, 14-16, 21, 22] описано способи отримання вітаміну К₂, які можна узагальнити.

Підготовка мікроорганізмів та інокуляту

Клітини штаму *B. subtilis natto* культивують в рідкому живильному середовищі, що містить триптон, дріжджовий екстракт, гліцерин або гексози та натрію хлорид, перед тим, як висівати штрихом на чашки з поживним

агаром. Чашки інкубують при 37 °С протягом 48 (до 120) годин. Потім клітини знімають з чашок та суспендують у стерилізованому фізіологічному розчині (0,9 % NaCl). Суспензію потім поміщають у водяну баню при 80 °С на 30 хвилин для інактивації вегетативних клітин та індукції утворення спор перед центрифугуванням (3000 об/хв протягом 10 хвилин) для видалення клітинних залишків. Отриману суспензію спор ($4,8 \times 10^6$ КУО /мл) використовують як інокулят для ферментації [10, 14, 21, 24].

Процедура ферментації

Середовище для ферментації готують та стерилізують при температурі 121 °С протягом 20 хвилин. Потім інокують 5 % попередньо підготовленої суспензії спор *B. subtilis natto*. Ферментацію проводять аеробно при 37 °С у динамічних умовах (120 об/хв) протягом шести днів [14, 24, 21].

Аналіз МК-7

Аналіз МК-7 проводять за методами, описаними в роботах [2, 7, 12, 20, 24], з незначними змінами для врахування вимог хроматографічної колонки, що використовувалася в цьому дослідженні. Для визначення концентрації ізомеру МК-7 у ферментованих зразках використовують систему високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), оснащену чотирма насосами, автоматичним інжектором зразків, термостатованим відсіком колонки та УФ-детектором з фотодіодною матрицею. Для підтвердження наявності та перевірки хроматографічних часів утримування повністю *транс*- та *цис*-ізомерів МК-7 застосовують методи рідинної хроматографії-мас-спектрометрії (РХ-МС).

Вимірювання щільності клітин та рН

Про ріст бактерій судять за щільністю клітин, яку визначають шляхом вимірювання оптичної щільності (OD) при 600 нм за допомогою спектрофотометра після відповідного розведення дистильованою водою. рН вимірюють безпосередньо в середовищі для культивування за допомогою стандартного лабораторного рН-метра [10, 14, 21, 24].

Вилучення продукту

Після ферментації вітамін К₂ необхідно ізолювати з культуральної рідини. На першому етапі використовують екстракцію неполярними органічними розчинниками, серед яких найефективнішим є н-гексан. Цей розчинник забезпечує добрий контакт із ліпідною фракцією клітин та має мінімальний вплив на життєздатність бактерій під час періодичної екстракції (до 84 годин). В результаті концентрація МК-7 у середовищі може сягати 52–55 мг/л, що у 1,5–1,7 раза перевищує контрольні показники [1, 16].

Екстракція МК-7

В роботах [1, 16] МК-7 екстрагували з культуральної рідини використовуючи суміші органічних розчинників, наприклад 2-пропанолу та н-гексану у співвідношенні 1:2 (об./об.) та співвідношенні рідина-органіка 1:4 (об./об.). Суміш енергійно струшували протягом 2 хвилин за допомогою вихрового змішувача та центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин для розділення двох фаз. Після цього верхній шар гексану відокремлювали від водної фази та випарювали під вакуумом для отримання екстрагованого МК-7.

Очищення препарату

Після первинного вилучення проводять очищення препарату, яке здійснюється за допомогою:

- адсорбційної або рідинної хроматографії (HPLC);
- фільтрації та концентрування під вакуумом;
- рекристалізації для виділення виключно транс ізомеру МК-7, що

має найвищу біоактивність.

На стадії очищення важливо мінімізувати контакт продукту з киснем і світлом, оскільки вітамін К₂ є фотолабільною сполукою. Для цього процеси проводять у темних або інертних умовах (із застосуванням азоту чи аргону) [1, 10, 14, 16, 21, 24].

Використання альтернативних субстратів

Оскільки вартість живильного середовища істотно впливає на економічну ефективність процесу, у сучасних біотехнологічних розробках значну увагу приділяють замінам традиційних джерел вуглецю та азоту. Як субстрати для ферментації використовують:

- соєве борошно або соєвий шрот;
- побічні продукти харчової промисловості (рисові висівки, кукурудзяні зародки, патоку);
- біологічні відходи з високим вмістом білків та ліпідів.

Ферментація на основі соєвих субстратів (зокрема у продуктах *натто*) є класичним прикладом поєднання мікробного синтезу МК-7 із виробництвом харчових продуктів функціонального призначення. Дослідження показують, що рівень вітаміну К₂ у ферментованій сої може досягати 1000–1200 мкг/100 г продукту, що робить її природним джерелом менахінонів [1-3, 5, 14, 21, 22, 24].

Застосування альтернативних сировинних джерел не лише знижує собівартість виробництва, а й відповідає принципам «зеленої біотехнології», оскільки сприяє утилізації органічних відходів і зменшенню екологічного навантаження.

Загальні біотехнологічні стратегії виробництва вітаміну К₂

Сучасні біотехнологічні стратегії виробництва вітаміну К₂ поєднують метаболічну інженерію, оптимізацію ферментаційних параметрів, контроль умов екстракції та впровадження екологічно орієнтованих технологій. Такий підхід дозволяє отримувати високоякісні, стабільні форми МК-7 з високою біодоступністю, що має велике значення для отримання фармацевтичних та нутрицевтичних продуктів [1, 3, 4, 10, 14-17, 22, 24].

Кількість МК-7, отримана з культурального середовища, що містить суміш н-бутанолу та н-гексану, є нижчою від потенційно можливої. Це пояснюється тим, що МК-7 міцно зв'язаний із клітинними мембранами бактерій. Використання лише органічних розчинників для вилучення МК-7 є

малоефективним, оскільки руйнування клітинної стінки значно покращує вихід сполуки. Для цього застосовують такі методи, як ультразвукова обробка, заморожування та розморожування, паровий вибух, нагрівання у кислому середовищі, лужний гідроліз і гомогенізацію.

Для підвищення ефективності екстракції пропонується оптимізувати співвідношення органічних компонентів (наприклад, н-бутанол : н-гексан), що може підвищити рівень утворення МК-7 у культуральному середовищі. Додавання CaCl_2 також сприяє кращій екстракції МК-7 завдяки ефекту висолювання. Однак дослідження показали, що тривале застосування суміші н-бутанолу та н-гексану (1:2) знижує продуктивність і життєздатність клітин *Bacillus subtilis* після 60 годин ферментації, імовірно через токсичний вплив н-бутанолу на клітинну мембрану [1, 16].

Більшість полярно-неполярних розчинників, зокрема спирти, також пригнічують ріст бактерій через пошкодження мембран. Натомість періодична екстракція за допомогою чистого н-гексану не знижує життєздатність клітин протягом 84 годин, забезпечуючи максимальний вихід МК-7 — 52,34 мг/л, що у 1,7 раза перевищує контроль (без розчинників) [1, 16].

Метаболічна інженерія

Для підвищення синтезу менахінонів застосовують генетичні модифікації, спрямовані на посилення потоків через шлях шікімату, що забезпечує утворення прекурсорів — ізопренових одиниць і нафтокінонового кільця. Надекспресія генів *menA*, *menB*, *menE* та *menG* дозволяє збільшити кінцеву концентрацію МК-7 у культуральній рідині у кілька разів [19].

Біосинтетичний шлях *Bacillus subtilis* для продукції МК-7 складається з чотирьох модулів: центрального шляху вуглецевого метаболізму (ССМ), шляху шікімату (SA), шляху метилеритритол-4-фосфату (MEP) та шляху МК-7 (рис. 1.3). У табл. 1.3 перелічені гени, що беруть участь у цих метаболічних шляхах.

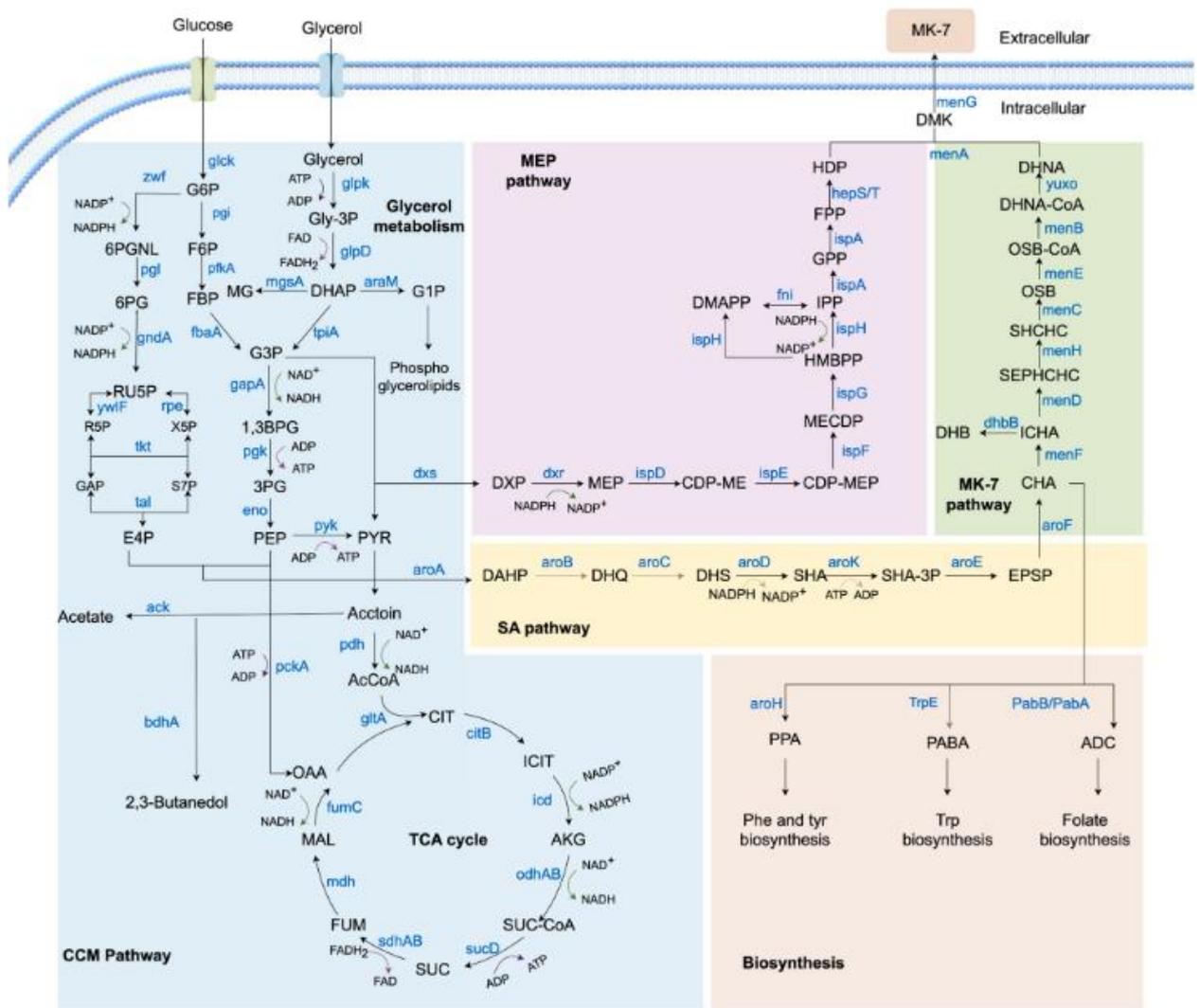


Рис.1.3 Метаболічний шлях *Bacillus subtilis*, що продукує МК-7, поділяється на п'ять модулів: шлях ССМ, шлях SA, шлях MEP, шлях МК-7 та біосинтез [19].

Шлях ССМ (центральний вуглецевий метаболізм)

ССМ є ядром метаболізму клітини та забезпечує енергію (АТФ, NADH/NADPH) і попередники для біосинтезу. Він включає гліколіз (ЕМР), пентозофосфатний шлях (PPP), глюконеогенез і цикл ТКА. У *Bacillus subtilis* глюкоза швидко забезпечує ріст і біомасу, тоді як гліцерин після виснаження глюкози підтримує синтез попередників МК-7. Використання змішаного джерела вуглецю (глюкоза + гліцерин) оптимізує енергетику та потік метаболітів.

Шлях метаболізму гліцерину

Гліцерин транспортується в клітину, фосфорилується до гліцерол-3-фосфату (Gly-3-P) та перетворюється в дигідроксиацетонфосфат (DHAP), частина якого ізомеризується до гліцерол-3-фосфату (G3P), які входять у гліколіз з утворенням високоенергетичної сполуки PEP, готуючи систему до подальшого утворення АТФ. Метаболічний шлях від G3P до PEP є основним компонентом як шляху ССМ, так і гліколітичного шляху.

Цей шлях забезпечує:

- додатковий вуглецевий потік після виснаження глюкози;
- утворення NADH і АТФ;
- попередники для шляху MEP.

Нормальний баланс між DHAP і G3P критично важливий для росту клітин.

Шлях EMP (гліколіз)

Глюкоза метаболізується до пірувату з утворенням АТФ і NADH. Цей шлях підтримує швидкий клітинний ріст, постачає PEP і піруват — ключові попередники для синтезу МК-7, ароматичних амінокислот і енергії.

Пентозофосфатний шлях (PPP)

PPP забезпечує клітину NADPH для відновлювальних реакцій та утворює E4P — попередник для синтезу ароматичних сполук і МК-7. Він тісно інтегрований з гліколізом через обмін проміжними метаболітами.

Цикл TCA

Цикл TCA не формує вуглецевий скелет МК-7 безпосередньо, але:

- генерує АТФ, NADH і FADH₂;
- підтримує клітинний ріст;
- забезпечує метаболічний баланс.

Його активність регулюється наявністю глюкози та глутамату. У *B. subtilis* відсутній повний гліоксилатний цикл, але його введення може зменшити втрати вуглецю.

Шлях MEP (метилеритритол-4-фосфату)

MEP — основний шлях синтезу ізопренових попередників (IPP і DMAPP) бічного ланцюга МК-7. Він використовує G3P і піруват, утворюючи C35-ланцюг, який з'єднується з нафтохіноновим кільцем. Стабільний потік IPP/DMAPP є критичним для високого виходу МК-7.

Шлях SA (шикіматний шлях)

SA-шлях забезпечує синтез хоризмату — попередника нафтохінонового кільця МК-7, ароматичних амінокислот і фолатів. Регуляція цього шляху (зокрема через інгібування EPSP-синтази) дозволяє перенаправляти вуглецевий потік і підвищувати синтез МК-7.

Шлях МК-7

Хоризмат перетворюється на DHNA, який з'єднується з ізопреновим бічним ланцюгом (із MEP-шляху).

Фінальне метилювання призводить до утворення МК-7 (менахінону-7).

Біосинтез (розгалуження від хоризмату)

Хоризмат є спільним попередником для:

- МК-7;
- ароматичних амінокислот (Phe, Tyr, Trp);
- фолієвої кислоти.

Після хоризмату ці шляхи конкурують між собою, тому регуляція розподілу вуглецю визначає ефективність синтезу МК-7.

Таблиця 1.3

Метаболічна інженерія надмірного вироблення *Bacillus subtilis* МК-7 [19]

Цільовий ген	Метод	Штам фону	Покращення МК-7	Титри або вихід МК-7, мг/л
1	2	3	4	5
<i>glpK</i>	Промоутер P _{lapS}	<i>BSMK</i>	6%	58,9 ± 1,0
<i>glpD</i>	Промоутер P _{lapS}	<i>BSMK-1</i>	10%	61,1 ± 0,5
<i>mgsA</i>	Видалення	<i>BSMK-2</i>	12%	62,3 ± 0,5
<i>araM</i>	Видалення	<i>BSMK-3</i>	15%	70,3 ± 0,8

Продовження таблиці 1.3

1	2	3	4	5
<i>dxs, fni, dxr, menF aroA</i>	Промотор P ₄₃ Промотор P _{hbs}	<i>Bacillus subtilis 168</i>	2,8	32,93
<i>menA</i>	Промотор P _{glgV}	<i>ZQ12</i>	2.9	177,38
<i>menD</i>	Промотор P _{cspD}	<i>BSW01</i>	1,75	101,36
<i>bdhA</i>	Видалення	<i>B. subtilis 168</i>	2	30,6
<i>ispD</i>	Промотор P ₄₃	<i>BS20</i>	10%	353,2 ± 1,2
<i>ispF</i>	Промотор P ₄₃	<i>BS20D</i>	3,9%	332,6 ± 3
<i>ispH</i>	Промотор P ₄₃	<i>BS20DF</i>	15,8%	370,8 ± 5,2
<i>ispG</i>	Промотор P ₄₃	<i>BS20DFH</i>	29,3%	415 ± 3,2
<i>spo0A</i>	Промотор P _{abrB} Промотор P _{spoiA}	<i>B. subtilis 168</i>	40	360
<i>sinR</i>	Видалення	<i>B. subtilis 168</i>	2.6	102,56 ± 2,84

Модифікація метаболічного шляху *Bacillus subtilis* зазвичай починається з модулів утилізації субстрату, використовуючи промотори різної сили для експресії ключових генів або нокаутуючи шляхи розгалуження для зміни метаболічних потоків. Крім того, модифікації вносяться до систем секреції, модулів формування спор і біоплівки, а також систем антиоксидантного захисту для покращення ефективності секреції МК-7 та сприяння його внутрішньоклітинному накопиченню.

Висновок до I розділу

Аналіз наукових джерел підтверджує, що вітамін К є життєво необхідним жиророзчинним вітаміном, який бере участь у регуляції процесів згортання крові, метаболізмі кальцію та мінералізації кісткової тканини. Серед різновидів вітаміну особливу увагу привертає вітамін К₂ (менахінон), який відзначається високою біологічною активністю та здатністю впливати на формування та підтримку кісткової та серцево-судинної систем. Літературні дані свідчать, що К₂, особливо форми МК-7, має більш тривалий період напіввиведення та кращу біодоступність у порівнянні з К₁, що робить його ключовим компонентом у нутрицевтичних та фармацевтичних продуктах.

Дослідження споживання та статусу вітаміну К вказують на те, що значна частина населення, як в Україні, так і в інших країнах, не отримує достатньої кількості цієї сполуки з раціону. Обмежене надходження К₂ з харчових продуктів і специфіка його біодоступності, зокрема зв'язок з клітинними мембранами рослинних джерел та залежність від наявності жирів у раціоні, підкреслюють необхідність використання дієтичних добавок. Водночас спостерігається зростаюча популярність продуктів із К₂ серед спортсменів та людей, які ведуть активний спосіб життя, що пов'язано з його позитивним функціональним впливом.

Огляд використання вітаміну К₂ у дієтичних добавках та спортивному харчуванні показує значну різноманітність форм випуску: капсули, жувальні таблетки, м'які гелеві капсули, рідкі форми, а також комбінації з вітаміном D₃, кальцієм та іншими нутрієнтами. Така різноманітність дозволяє виробникам задовольнити індивідуальні потреби споживачів, підвищуючи ефективність та комфорт прийому продукту. Аналіз українського ринку показав, що попит на нутрицевтики з К₂ зростає, особливо на продукти з МК-7, через його високу біологічну активність і тривалий ефект у організмі.

Щодо способів отримання вітаміну К₂, літературні джерела підтверджують ефективність мікробіологічного синтезу за участю бактерій роду *Bacillus*, включаючи застосування субмерсної ферментації, оптимізацію складу середовища, генетичну та метаболічну інженерію штамів, а також сучасні методи вилучення та очищення МК-7 із культурального середовища. Використання альтернативних субстратів, таких як соєве борошно чи побічні продукти харчової промисловості, дозволяє знизити собівартість та впроваджувати принципи «зеленої біотехнології».

Отже, проведений огляд літератури підкреслює, що вітамін К₂ є високоефективним нутрієнтом з широкими перспективами застосування у харчових добавках і спортивному харчуванні. Його недостатнє надходження з раціону обґрунтовує необхідність використання добавок, а розвиток біотехнологічних методів отримання та нових формул продуктів сприяє зростанню ринку та покращенню здоров'я населення.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Структура вітаміну К.

Вітамін К виконує незамінну роль як кофактор, який активує синтез специфічних білкових структур, що беруть участь у процесах згортання крові, підтриманні метаболізму кісткової тканини, регуляції судинної функції та запобіганні розвитку остеопорозу.

Природні форми вітаміну К - філохінон (K_1) і менахінон (МК; K_2), а синтетична його форма - менадіон (K_3). Листові овочі містять найвищу концентрацію K_1 , тоді як бактерії синтезують K_2 . Структура вітаміну K_2 складається з нафтохінонового кільця з ізопреноїдним бічним ланцюгом, залежно від кількості ізопреноїдів [6, 12, 29, 30].

Філохінон (вітамін K_1) та менахінони (вітамін K_2) – це дві біологічно активні форми. Менахінони (МК) з різною довжиною бічного ланцюга, що позначаються як МК-п, вказують на кількість ненасичених ізопреноїдних залишків. Довголанцюгові менахінони, такі як МК-7 та МК-10, синтезуються виключно бактеріями. МК-7, з подовженим періодом напіврозпаду в крові людини та високою біодоступністю, також виробляється різними мікроорганізмами [5, 6, 12, 30].

Попри те, що термін «вітамін К» не є офіційною хімічною назвою за номенклатурою IUPAC через складність точної характеристики біциклічної хінонової структури, у науковій практиці прийнято використовувати точні хімічні назви: «філохінон» для позначення вітаміну K_1 та «менахінон» - для вітаміну K_2 . 2-Метил-1,4-нафтохінон називають вітаміном K_3 або «менадіоном». 2,3-Диметокси-5-метилбензохінон називають «убіхіноном» (убіхінон - «повсюдно поширений хінон»). Ядро 2,3-диметилбензохінону виявлене в пластохіноні, який бере участь у ланцюзі переносу електронів у фотосинтезі. Скорочення від убіхінону, менахінону та філохінону позначають як Q, МК та К відповідно (рис. 2.1 та 2.2) [13, 19].

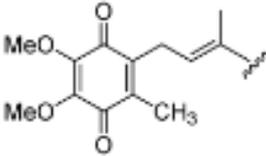
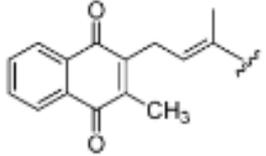
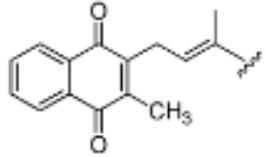
Quinone nucleus	Side-chain	Class name	Abbreviation	Corresponding hydroquinone	Abbreviation
 2,3-dimethoxy-5-methylbenzoquinone	prenyl	ubiquinone	Q	ubiquinol	QH ₂
 2-methylnaphthoquinone	prenyl	menaquinone	MK	menaquinol	MKH ₂
 2-methylnaphthoquinone	phytyl	phyloquinone	K	phyloquinol	KH ₂

Рис. 2.1. Структури убіхінону, менахінону та філохінону та відповідних гідрохінонів [13].

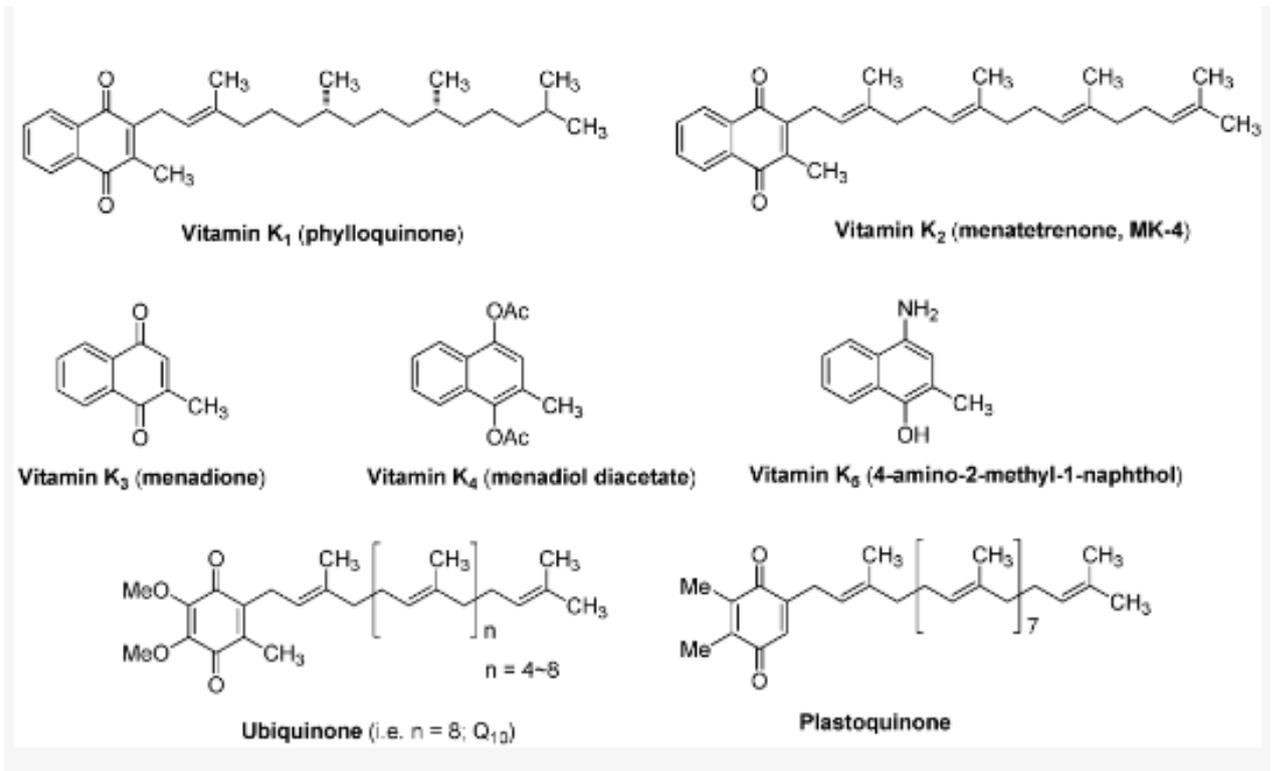


Рис. 2.2. Назви хінонів та структури природних бензохінонів (убіхінон та пластохінон) та нафтохінонів (вітамін K₁ та K₂) і репрезентативних синтетичних вітамінів K (вітамін K₃, K₄ та K₅) [13].

2.2 Механізми біосинтезу менахінонів.

Менахінони є компонентами цитоплазматичних мембран бактерій та виконують ключові функції в транспорті електронів, окислювальному фосфорилуванні, активному транспорті і формуванні ендоспор у деяких грампозитивних мікроорганізмах.

У живих організмах група цих сполук виконує функцію кофактора для ферменту, відповідального за посттрансляційне карбоксилювання залишків глутамінової кислоти (Glu), включених до поліпептидного ланцюга, що призводить до утворення залишків гаммакарбоксиглутамату (Gla). Було виявлено, що близько 8 молекул білка, отриманих під час цього процесу, пов'язані із згортанням крові, тоді як роль решти восьми білків виходить за межі кровоносної системи. Внаслідку цієї посттрансляційної модифікації білок здатний зв'язувати іони кальцію в кістках і тканинах, що передбачає важливу роль цього вітаміну в метаболізмі кісток [6, 17, 19, 35].

Біосинтетичні етапи, що призводять до утворення менахінону, були ретельно вивчені в *E. Coli*. В *E. coli* синтез менахінону здійснюється сімома ферментами (MenA-MenG). Ці ферменти кодуються 2 кластерами генів. Кластер генів *men* складається з *menB, C, D, E, F* та окремого кластера, що містить *menA* та *menG* [9, 17].

Біосинтез менахінону ініціюється з хоризмату (проміжного продукту для біосинтезу ароматичних амінокислот, похідних індолу, триптофану, саліцилової кислоти та багатьох алкалоїдів) та проходить через серію специфічних для менахінону реакцій (рис. 2.3).

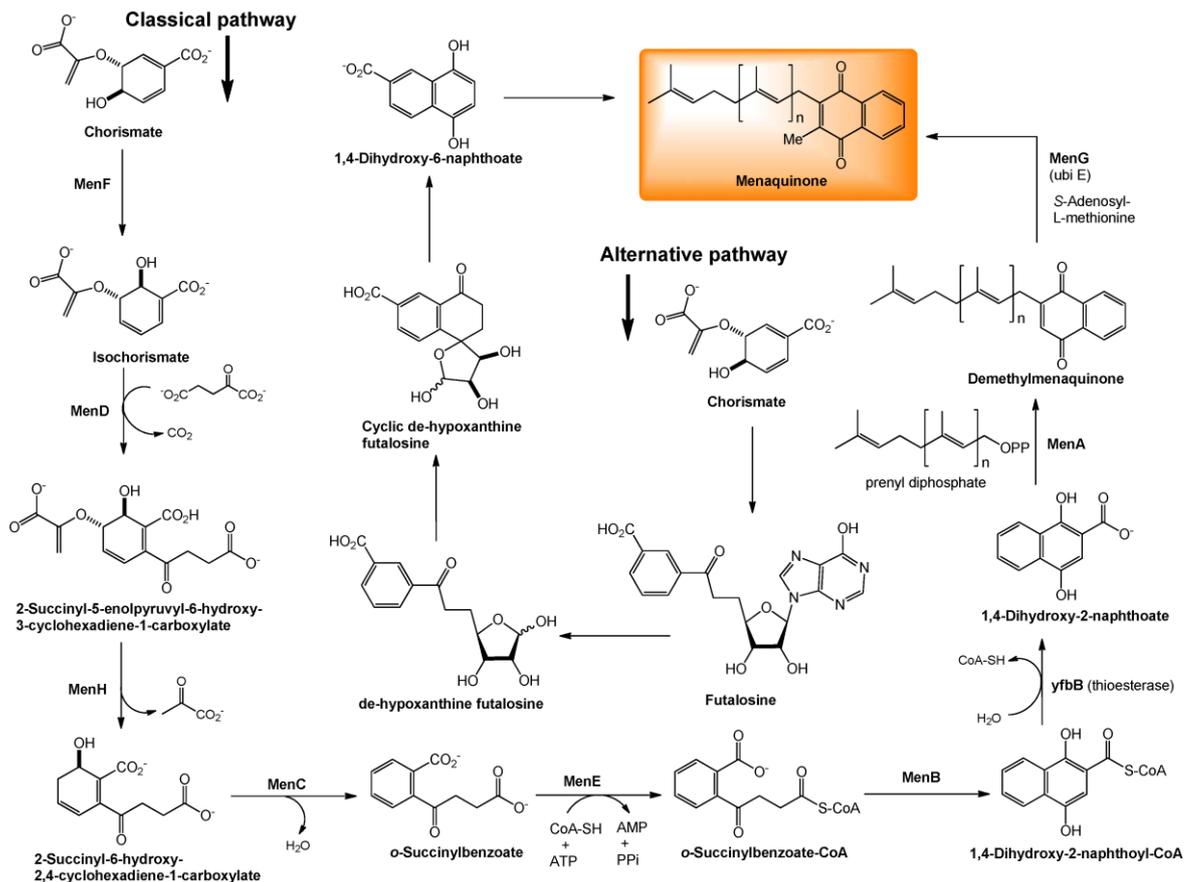


Рис. 2.3 Біосинтез менахінону [13].

2.3 Механізми фізіологічної дії менахінонів.

Роль вітамін К-залежної γ -глутамілкарбоксилази (GGCX) у каскаді згортання крові схематично показана на рис. 2.2. Цей фермент каталізує послідовне карбоксилювання залишків глутамату у низці білків, що беруть участь у згортанні крові та метаболізмі кісток.

На сьогодні описано кілька білків із залишками γ -карбоксиглутамінової кислоти (Gla), включаючи фактори згортання крові. Точна функція γ -карбоксиглутамінових залишків ще повністю не визначена, проте їх присутність є необхідною для функціональної активності білків.

Позаклітинний іон кальцію (Ca^{2+}) грає ключову роль у каскаді згортання крові: він забезпечує формування фібрину з фібриногену, сприяє перетворенню протромбіну в тромбін, а також виступає ко-фактором для факторів V, VII, VIII, IX, X та XIII. Всі вітамін К-залежні білки здатні зв'язувати Ca^{2+} , і γ -карбоксиглутамінові залишки у цих білках виконують

роль ефективних двовалентних аніонів, що забезпечують зв'язування іонів кальцію [6, 13, 19, 25, 34].

Дефіцит вітаміну К зустрічається рідко через два фактори:

- 1) синтез вітаміну К здійснюється кишковими бактеріями,
- 2) вітамін К постійно рециркулює в клітинах організму, що ілюструє цикл вітаміну К на рис. 2.4.

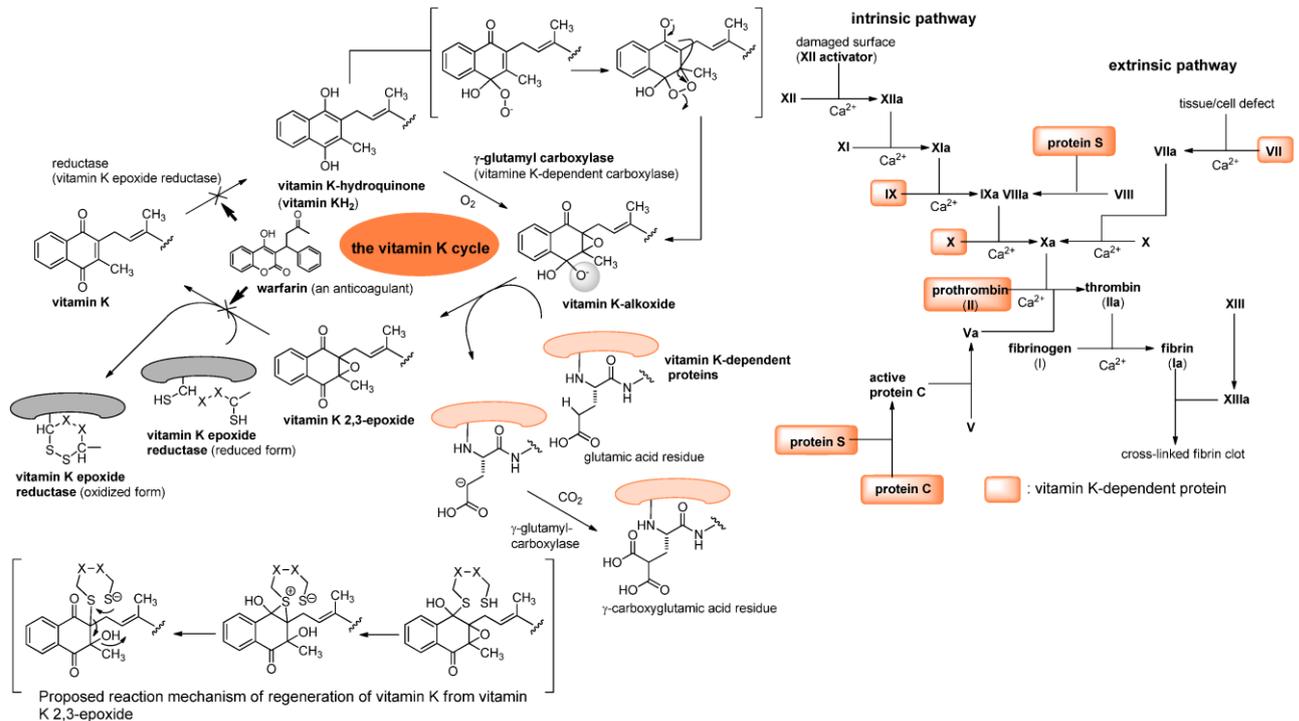


Рис. 2.4. Вітамін К як кофактор у системі згортання крові [13].

Менахінон у відновленій формі (МКН₂) є кофактором γ -глутамілкарбоксилази (GGCX) та забезпечує перетворення Glu \rightarrow Gla (γ -карбоксиглутамат), який окиснюється до епоксиду й знову відновлюється до активної форми за участю залишків цистеїну та епоксидредуктази вітаміну К (VKOR). Це цикл вітаміну К.

γ -карбоксилювання Gla-білків — центральний механізм фізіологічної дії менахінонів

Основний і класичний механізм дії менахінонів — участь у γ -карбоксилюванні глутамінової кислоти в складі специфічних білків.

Функціональні наслідки γ -карбоксилювання в тому, що карбоксильовані Gla-білки набувають здатності:

- зв'язувати іони Ca^{2+} ;
- фіксувати кальцій у потрібних тканинах;
- взаємодіяти з фосфоліпідами мембран.

Ідентифіковано сімнадцять білків, активованих GGCX. Існує три групи вітамін-К-залежних білків (VKDP).

Одна група - остеокальцин (OC), матриксний Gla-білок (MGP) та специфічний для затримки росту білок 6 (Gas6), які виробляються позапечінково та не пов'язані з процесом згортання крові. Gla-білки періостин та періостиноподібний фактор виробляються під впливом травми та беруть участь у ремоделюванні тканин. Існують також трансмембранні та багаті на пролін Gla-білки, але їхні функції не встановлені.

Друга група - білки, що виробляються в печінці та беруть участь у згортанні крові, включає антикоагулянти. Таким чином, прийом вітаміну К за фізіологічних умов не впливає на фактори згортання крові, але підвищує рівень позапечінкових VKDP [6].

Вплив на кісткову тканину

Менахінони:

- активують остеокальцин через карбоксилювання;
- підвищують мінералізацію кісток;
- зменшують ризик остеопорозу.

МК-7 має:

- ✓ довший період напіввиведення;
- ✓ вищу біодоступність;
- ✓ стабільніший рівень у плазмі порівняно з K_1 та МК-4.

Регуляція ремоделювання кістки

Менахінони:

- пригнічують активність остеокластів;
- підтримують диференціацію остеобластів;
- діють синергічно з вітаміном D_3 .

Серцево-судинна система і кальцифікація

Білок MGP — ключовий інгібітор судинної кальцифікації; відкладення кальцію в м'яких тканинах. Менахінони забезпечують його повне карбоксилювання, знижують жорсткість артерій, асоціюються зі зменшеним ризиком атеросклерозу

МК-7 ефективніший за K_1 у запобіганні кальцифікації. Це пов'язано з тривалішою циркуляцією в крові [6].

Антиоксидантні та редокс-механізми

Менахінони здатні переходити між окисленою та відновленою формами, можуть діяти як переносники електронів та зменшувати окиснювальний стрес у мембранах.

Особливо це актуально для мітохондрій, нейрональної тканини, клітин з високим рівнем енергетичного метаболізму [6].

Протизапальна та імуномодуюча дія

Менахінони пригнічують продукцію прозапальних цитокінів, зменшують NF- κ B-залежну активацію, опосередковано знижують хронічне запалення. Ці ефекти посилюються при тривалому надходженні МК-7 [6].

Значення хімічної структури

Біологічна активність вітаміну К визначається не лише ядром нафтохінону, а передусім довжиною та насиченістю ізопренового ланцюга:

- короткі МК надають швидку дію, але мають низьку стабільність;
- довгі МК (МК-7, МК-9) мають тривалу дію та кращу тканинну доступність [6].

Узагальнюючи викладення, можна сформулювати схему механізмів менахінону. Менахінони діють через:

- γ -карбоксилювання Gla-білків;
- регуляцію кальцієвого гомеостазу;
- активацію ядерних рецепторів;
- антиоксидантні редокс-цикли;
- протизапальні сигнальні шляхи.

2.4 Окисно-відновний цикл вітаміну К.

Попри те, що вітамін К належить до жиророзчинних вітамінів, його запаси в організмі є мінімальними й швидко виснажуються без постійного надходження з їжею. Через обмежену здатність до накопичення, організм підтримує його рівень завдяки циклу вітаміну К-епоксиду (рис. 2.5), який забезпечує багаторазове використання невеликих кількостей вітаміну К для карбоксилювання білків, зменшуючи потребу в зовнішньому надходженні [12].

У цьому процесі гідрохінон вітаміну К (відновлена форма) окиснюється до епоксиду (окисненої форми), що дозволяє ферменту γ -глутамілкарбоксилазі каталізувати карбоксилювання специфічних залишків глутамінової кислоти у вітамін К-залежних білках. Далі епоксидна форма перетворюється назад у гідрохінон через послідовні реакції відновлення: спочатку утворюється хінон вітаміну К, а потім гідрохінон вітаміну К (KH₂). Ключову роль у цьому відіграє фермент вітамін К-епоксидредуктаза (VKOR), який каталізує зворотне відновлення. Саме варфарин, відомий антикоагулянт, діє як антагоніст вітаміну К, пригнічуючи активність VKOR і тим самим блокуючи повторне використання вітаміну К у циклі (рис. 2.4) [6, 12].

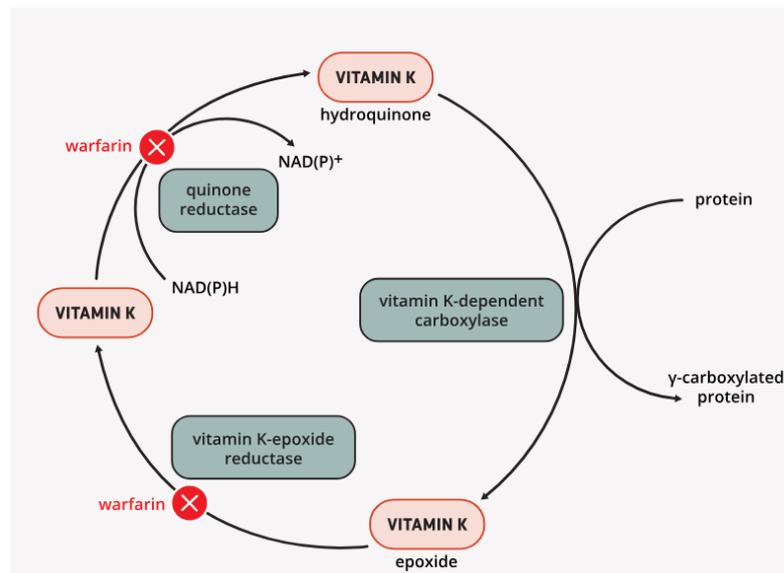


Рис. 2.5. Окисно-відновний цикл вітаміну К [12].

Відновлена форма вітаміну К (гідрохінон) передає пару електронів вітамін К-залежній карбоксилазі (відомій як γ -глутамілкарбоксилаза), яка

карбоксилне залишки глутамінової кислоти у специфічних вітамінів К-залежних білках. Отримана окислена форма вітаміну К (епоксид) перетворюється назад на гідрохінон у двоступеневій реакції. Перший крок, який перетворює епоксид вітаміну К на вітамін К, каталізується вітаміном К-епоксидредуктазою; другий крок каталізується або вітаміном К-епоксидредуктазою, або, найімовірніше, іншою ще не визначеною редуктазою. Цей шлях інгібується антагоністом вітаміну К та антикоагулянтним препаратом варфарином. Відновлення вітаміну К до гідрохінону також, можливо, каталізується NAD(P)H-залежною редуктазою, стійкою до варфарину (рис. 2.5) [12].

2.5 Методи досліджень.

У дослідженні використано бібліосемантичні методи для аналізу та систематизації інформації з наукових публікацій, баз даних (PubMed, Scopus, Google Scholar) щодо перспектив використання та особливостей біосинтезу менахінону-7 (вітаміну К₂) штаммами-продуцентами. Застосовано абстрактно-логічний метод для узагальнення даних, формулювання висновків та обґрунтування вибору технологічних рішень. Технологічний метод використано для розробки та моделювання схеми ферментаційного виробництва менахінону-7 з використанням бактерій роду *Bacillus* як найбільш перспективного продуцента.

Висновок до 2 розділу:

У цьому розділі розглянуто основні біохімічні та фізіологічні особливості вітаміну К₂ (менахінону), його структуру та механізми участі у клітинних процесах. Встановлено, що менахінони є важливими компонентами бактеріальних мембран, беруть участь у транспорті електронів, окисному фосфорилуванні та енергетичному обміні, а також виконують ключову роль у підтриманні нормального функціонування організму людини.

Проаналізовано будову вітаміну К, яка зумовлює його здатність брати участь в окисно-відновних реакціях. Зокрема, наявність хінонового кільця забезпечує участь у процесах переносу електронів та карбоксилюванні білків.

Особлива увага приділена окисно-відновному циклу вітаміну К, який дозволяє організму багаторазово використовувати невеликі кількості цього вітаміну. Цей цикл забезпечує відновлення активної форми вітаміну після карбоксилювання білків і є основним механізмом підтримання його біологічної активності.

Отже, сукупність розглянутих біохімічних властивостей, структурних особливостей і механізмів перетворення вітаміну К свідчить про його надзвичайно важливу роль у регуляції фізіологічних процесів, зокрема згортання крові, метаболізму кісткової тканини та енергетичного обміну клітин.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Біотехнологічні підходи до виробництва вітаміну K₂.

Харчова біотехнологія є однією з галузей науки, які найбільш динамічно розвиваються. Вона займається розробкою нових технологій для виробництва продуктів харчування. Біотехнологія об'єднує в собі методи мікробіології, генетики, біохімії та харчових технологій, що дозволяє створювати продукти, які не лише смачні, але й корисні для здоров'я.

Вітамін K₂ (менахінон) є важливою біологічно активною сполукою, що відіграє ключову роль у процесах згортання крові, метаболізмі кісткової тканини та кальцієвому гомеостазі організму. На відміну від філохінону (вітаміну K₁), який надходить переважно з рослинної їжі, вітамін K₂ синтезується мікроорганізмами, зокрема представниками родів *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* та *Propionibacterium*. Саме завдяки цьому мікробному походженню останніми роками біотехнологічні методи його отримання набувають особливої актуальності.

Зростання попиту на вітамін K₂ обумовлене розширенням його застосування у фармацевтичній, харчовій та косметичній промисловості. Традиційні хімічні методи синтезу є енергозатратними, екологічно небезпечними та економічно не вигідними, що стимулює пошук більш сталих біотехнологічних альтернатив. Сучасні підходи базуються на використанні природних або генетично модифікованих мікроорганізмів-продуцентів, оптимізації умов культивування, застосуванні ферментативних систем і метаболічної інженерії.

Аеробні та анаеробні дихальні системи забезпечують клітинам можливість транспортувати електрони до термінальних акцепторів електронів, підтримуючи енергетичний баланс клітини. Центральним компонентом електронотранспортного ланцюга є хіноновий пул, представлений убіхіноном або менахіноном. У більшості грампозитивних бактерій саме вітамін K₂ (менахінон) виступає єдиним хіноном, що

забезпечує перенесення електронів у дихальному ланцюзі. Тому ще одним цікавим напрямом є дослідження ферментів, які каталізують біосинтез менахінону, як перспективних мішеней для створення нових антибактеріальних засобів, здатних вибірково порушувати енергетичний метаболізм патогенних мікроорганізмів [11, 13].

3.2. Аналіз продуцентів та шляхів їх удосконалення.

З літературних джерел відомо, які бактерії продукують вітамін К₂, та які способи ферментації використовують для підвищення ефективності виробництва вітаміну К₂.

Серед продуцентів відомі *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis natto*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, молочнокислі бактерії, зокрема *L. lactis ssp. Cremoris*, *Eubacterium lentum*, *Veillonella*, *Enterobacterium*, *Bacteroides* та ін. Дані про здатність деяких з них синтезувати менахінони з різною довжиною бічного ланцюга, продуктивність, шляхи їх модифікації та особливості культивування наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Бактерії-продуценти та методи ферментації для виробництва вітаміну К₂ [1-5, 9, 10, 15-17, 20-24]

Бактерії-продуценти	Тип вітаміну К ₂	Концентрація (мг/л)	Особливості оптимізації виробництва вітаміну К ₂
1	2	3	4
<i>Flavobacterium sp.</i> 238-7-k3-15	МК-4	155	Додавання кедрової олії до середовища для культивування з додаванням мийних засобів
	МК-6	27	Немає даних
Молочнокислі бактерії	МК-7 МК-8 МК-9 МК-10	0,123	Штами вирощують або у відновленому сухому знежиреному молоці, або у середовищі на основі соєвого молока
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> штам MG1363 або NZ9000	МК-3, МК-7-9	33	В молоці з глюкозою, триптоном та антибіотиками

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4
<i>B. subtilis</i> BCRC 14715	МК-7	7,8	Модифікація функціональних складових має значний вплив на процес ферментації та оптимізований вихід МК-7 з чорної сої за температури 40–45 °С
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	МК-7	11,7 ± 0,6	Додавання 4% гліцерину підвищує вихід МК-7 при 43°С у ферментаційному середовищі Чонгукчан
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KCTC11712BP	МК-4	0,8	Немає даних
<i>Bacillus subtilis natto</i>	МК-7	62,3	Централізований композитний дизайн із оптимізованим поживним субстратом (5% дріжджового екстракту, 18,9% соєвого пептону, 5% гліцерину та 0,06% K ₂ HPO ₄)
<i>Bacillus subtilis natto</i>	МК-7	140	Математична модель прогнозує оптимальні умови (температуру та активність води) для оптимізації виходу МК-7 у твердофазному біореакторі
<i>Bacillus subtilis natto</i>	МК-7	40,96	Поверхнево-активні речовини регулюють проникність мембрани <i>B. subtilis</i> для максимального виходу МК-7
<i>Bacillus subtilis natto</i> (NF1)	МК-7	14,7 ± 1,4	Біоплівковий реактор сприяє підвищенню вмісту МК-7 у <i>B. subtilis natto</i> , ферментованому гліцерином, дріжджовим екстрактом і соєвим таніном
<i>Bacillus subtilis</i> 168	МК-7	360	Для динамічного контролю синтезу МК-7 використовується двофункціональна система кворум-сенсорів <i>phr60-rap60-spo0A</i>
<i>Bacillus subtilis</i> 168	МК-7	69,5 ± 2,8	Модульні конструкції метаболічної інженерії покращують біосинтез МК-7, коли <i>B. subtilis</i> 168 використовується як шасі

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4
<i>Bacillus subtilis</i> 168	МК-7	50	Ферменти, що лімітують швидкість (<i>dxs</i> , <i>dxr</i> , <i>idi</i> та <i>menA</i>), надмірно експресуються в різних комбінаціях для генетичної модифікації штамів <i>B. subtilis</i> 168
<i>Bacillus subtilis</i> BS20	МК-7	415	П'ять генів МЕР-шляху надмірно експресуються в <i>B. subtilis</i> BS20
<i>Bacillus subtilis</i> MM26	МК-7	442	Середовище, що містить лактозу, гліцин, з рН 7, температурою 37 °С та розміром інокуляту 2,5%, біопроцесна оптимізація. Продуктивний на дешевих субстратах (гліцерин, соя, дріжджовий екстракт тощо)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	МК-7	281,4 ± 5,0	Рекомбінантний штам BSMK11 з одночасною надмірною експресією генів <i>glpK</i> , <i>glpD</i> , <i>aroGfbr</i> , <i>pyrGfbr</i> , <i>hepS</i> , <i>vgb</i> та нокаутом <i>mgsA</i> і <i>araM</i>
<i>Bacillus subtilis</i> 168	МК-7	310	Оксалатдекарбоксилаза (<i>OxdC</i>) впливає на генерацію електронів і синтез МК-7 при зниженій транскрипції NADH-дегідрогенази у статичній культурі
<i>Escherichia coli</i>	МК-7	1350 мг/л	Альтернативний метод виробництва МК-7 з біовідновлюваної сировини (глюкози)

Найбільш перспективні продуценти вітаміну K₂ у формі МК-7 з проаналізованих даних включають штами *Bacillus subtilis* MM26 (рекомбінантний з модифікацією MenD/MenA та ARTP-мутагенезом), *Escherichia coli* (метаболічно модифікована), *Bacillus cereus* KMV07 та *Lactococcus lactis ssp. cremoris* штам MG1363 або NZ9000 (інженерний). Ці мікроорганізми обрані за високий вихід МК-7, GRAS-статус (Generally Recognized As Safe) та потенціал промислового масштабування [4, 9, 10, 15, 16, 21, 22, 24].

Bacillus subtilis MM26 демонструє найвищу продуктивність — 442 мг/л після біопроцесної оптимізації (RSM, Response Surface Methodology), що

у 3,8 раза перевищує базові рівні. *Переваги*: висока стабільність, природний метаболічний шлях менахінонів, толерантність до умов ферментації (глюкоза/гліцерин), низька вартість субстратів. *Недоліки*: потреба в точній оптимізації рН/температури (30–37°C), можливе накопичення побічних метаболітів, обмежена генетична доступність для подальшої модифікації [16].

Рекомбінантний *Bacillus subtilis* з контролем MenD/MenA досягає >200 мг/л шляхом стабілізації ключових ензимів (MenA) та регуляції MenD, що посилює флюкс метаболізму (швидкість перетворення молекул у метаболічному шляху, що визначається діяльністю ферментів). *Переваги*: генетична стабільність, комбінація з біоплівками для безперервної ферментації, потенціал продуктивності до 500+ мг/л у біореакторах. *Недоліки*: складність трансформації (спороутворення *B. subtilis* ускладнює плазмідні), регуляторні бар'єри для ГМО в харчовій промисловості, вища вартість генної інженерії [2, 10, 15].

***B. subtilis* з ARTP-мутагенезом** поєднує плазмову мутацію з метаболічною інженерією для підвищення синтезу МК-7. *Переваги*: швидка селекція високопродуктивних мутантів без трансгенів, синергія з ферментацією (вихід до 300 мг/л). *Недоліки*: варіабельність мутантів, потреба в скринінгу, менша передбачуваність порівняно з генною інженерією [24].

***Escherichia coli* (метаболічно модифікована)** продукує високу кількість при культивуванні з глюкозою. *Переваги*: добре вивчена генетика, швидке зростання, дешеві вектори. *Недоліки*: відсутність природного шляху МК-7 (вимагає повної реконструкції), проблеми з інклюзійними тілами, не-GRAS статус для їжі, чутливість до умов [9].

***Bacillus cereus* КМV07** при ферментації сої дає середній вихід. *Переваги*: натуральна ізоляція з ферментованої сої, GRAS-подібний. *Недоліки*: низька продуктивність (~50–100 мг/л), потенційна патогенність (токсини), обмежена масштабованість [22].

Lactococcus lactis ssp. cremoris штам MG1363 та NZ9000 після комбінованої надмірної експресії *mvk*, *preA* та *menA* (модифікації ендогенного промотора оперону *preA – menA*) збільшує синтез K_2 у 2, 3 та 4 рази. *Переваги*: безпечний для молочних продуктів, можна використовувати для ферментації молока, пробіотичний потенціал. *Недоліки*: низький базовий вихід (<50 мг/л), повільне зростання, утруднене отримання чистого МК-7 через утворення інших форм менахінонів [4].

На основі проведеного аналізу визнаний найбільш перспективним для промислового використання штам *Bacillus subtilis* MM26 завдяки рекордній продуктивності 442 мг/л, простоті оптимізації без складної генетики та промисловій готовності (досліджені умови культивування в біореакторі, доступність субстрату - гліцерин). Він перевершує інших за співвідношенням вихід/вартість, GRAS-статусом та сумісністю з харчовим виробництвом (натто-подібні процеси). Перспективний для комерціалізації з подальшим мутагенезом до досягнення продуктивності >500 мг/л. Інші штами (рекомбінантні *B. subtilis*) є альтернативними для подальших досліджень, але обраний штам MM26 оптимальний для швидкого впровадження.

Взагалі, *Bacillus subtilis* — грампозитивна спороутворююча бактерія, що широко поширена у ґрунтових екосистемах. Завдяки своїй добре вивченій генетичній структурі цей мікроорганізм активно використовується у молекулярній мікробіології та біотехнологічних дослідженнях. Основні переваги *B. subtilis* полягають у відсутності патогенних властивостей і ендотоксинів, що забезпечує її статус безпечного мікроорганізму (GRAS), високій швидкості росту, яка дозволяє ефективно застосовувати її як клітинну фабрику для синтезу ферментів і вітамінів, а також у простоті генетичної модифікації, що робить її перспективною платформою для промислового виробництва біопродуктів [1, 10, 23].

Більше того, *Bacillus subtilis* здатна синтезувати широкий спектр ізоформ вітаміну K_2 , серед яких переважає менахінон-7 (МК-7), частка якого

становить понад 90% від загальної кількості утворених менахінонів [1, 17, 19].

3.3. Шляхи підвищення продуктивності мікробного синтезу вітаміну K₂ модифікацією мікроорганізмів.

Традиційним підходом до підвищення продуктивності продуцентів бактеріального МК-7 є мутаційна селекція. Цей метод протягом тривалого часу застосовувався як класичний інструмент оптимізації біосинтезу МК-7 у мікроорганізмів. Суть підходу полягає у цілеспрямованому модифікуванні клітин шляхом впливу фізичних (наприклад, ультрафіолетового опромінення) або хімічних мутагенів, що спричиняють генетичні зміни. На ефективність процесу впливають такі чинники, як тривалість опромінення, тип мутагенного агента, його концентрація та час експозиції. Основним недоліком мутаційної селекції є складність і трудомісткість скринінгу позитивних мутантів з підвищеним синтезом МК-7. У зв'язку з цим останніми роками цей метод поступово витісняється сучасними молекулярно-генетичними та біотехнологічними підходами, що забезпечують більш точне й ефективне підвищення продуктивності *Bacillus subtilis* [1, 4, 9, 10, 16, 19, 24].

Сучасні досягнення у сфері генної інженерії сприяли створенню високоефективних стратегій редагування геному *Bacillus subtilis* як одного із найпоширеніших продуцентів ферментів, вітамінів та інших біологічно активних сполук. Завдяки вдосконаленню методів генної модифікації *B. subtilis* перетворилася на надзвичайно продуктивну мікробну фабрику для біосинтезу МК-7, демонструючи переваги перед іншими промисловими мікроорганізмами, такими як *Escherichia coli*. Оптимізація біосинтетичного шляху утворення МК-7 є одним із найефективніших підходів до підвищення його продуктивності. Цього досягають шляхом надекспресії або делеції ключових генів метаболічного каскаду, а також шляхом точного перепрограмування біосинтетичних шляхів за допомогою гомологічної

рекомбінації з використанням маркерів антибіотикорезистентності та контрелективних елементів [1, 9, 10, 16, 19, 24].

У *B. subtilis* біосинтез МК-7 відбувається через дев'ять ферментативних реакцій. Перші шість ферментів кодуються опероном *menFDHBC*, а ген *menG* є частиною оперону *hepS-menG-hepT*, у якому *hepS/hepT* кодують all-trans гептапренілдіфосфатсинтазу в шляху MEP, тоді як *menA* та *menI* знаходяться в окремих локусах геному [10, 19].

Дослідники надмірно експресували кожен із вищезазначених цистронів, використовуючи сильні промотори в *B. subtilis* 168, і результати показали, що лише ступінчаста реакція MenA, тобто пренілювання DHNA до ДМК, була етапом, що лімітує швидкість, у шляху МК-7. Інші автори посилили синтез попередників МК-7 у *B. Subtilis* шляхом надмірної експресії *menFBE*, але результати показали, що кодовані ферменти не каталізують етап біосинтезу МК-7, що лімітує швидкість. Збільшення кількості копій *menA* в іншому локусі збільшило титр МК-7 на 42 мг/л порівняно з вихідним штамом. Ці результати показують, що *MenA* є критичним ферментом, який може визначати ефективність шляху синтезу МК-7 [1, 10, 19].

Надмірно експресують гени *GlpD*, *MenA*, *Dxs*, *Dxr* та *YacM-YacN*, а також видаляють ген *dhbB* для посилення біосинтезу МК-7 через метаболізм гліцерину. Оптимальна комбінація генів *menA-dxs-dxr-ypgA* збільшує продукцію МК-7 в 11 разів (50 мг/л) порівняно зі стандартним вектором. Наразі розроблено кілька стандартизованих методів для регулювання експресії генів *B. Subtilis* [1, 10, 16, 19].

Основні ліганди та попередники пов'язані з ізопреноїдним шляхом та коферментами, що беруть участь у переносі метаболітів. У *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* та ін. відбувається формування активованих проміжних коферментів, які згодом перетворюються на МК-7 під дією специфічних ензимів.

На відміну від класичного шляху, де використовується хоризман, деякі бактерії для дихання та енергетичного обміну використовують

альтернативний біохімічний механізм синтезу менахінону, де ключовим посередником є футалозин. Процес каталізується набором ферментів, кодованих генами *mqn* (*MqnA*, *MqnB*, *MqnC*, *MqnD*). Цей шлях використовують небезпечні патогени, такі як *Helicobacter pylori* (викликає виразку та рак шлунка), *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis* (хламідіоз) та деякі види *Streptomyces*. Блокування синтезу менахінону через футалозин призводить до зупинки дихання бактерії та її загибелі, тому цей шлях є об'єктом активних досліджень, оскільки це робить його перспективним для нових вузькоспецифічних антибіотиків або гербіцидів. Людський організм та багато корисних кишкових бактерій не мають цього шляху, тому ліки, що блокують його, потенційно не будуть токсичними для людини. Хоча на цей час не було проведено жодних досліджень метаболічної інженерії футалозинового шляху для збільшення виходу менахінону, поєднання цих двох шляхів біосинтезу МК може бути перспективною стратегією для біосинтезу вітаміну К₂ [11, 13].

Збільшення потоку вуглецю в шляху синтезу МК-7 також може збільшити вміст МК-7.

Для ілюстрації шляхів модифікації в табл. 3.2 наведено ключові стратегії, гени та ефекти покращення продуцентів МК-7.

Таблиця 3.2

Деякі шляхи модифікації продуцентів МК-7

Стратегія модифікації	Ключові гени/елементи	Ефект та продуктивність МК-7	Джерела
1	2	3	4
Мутаційна селекція	Фізичні/хімічні мутагени (УФ, мутаційні агенти)	Підвищення синтезу через випадкові мутації; трудомісткий скринінг	[1, 4, 9, 10, 16, 19, 24]
Надекспресія генів біосинтетичного шляху	<i>menA</i> , <i>menFBE</i> , <i>GlpD</i> , <i>Dxs</i> , <i>Dxr</i> , <i>YacM</i> - <i>YacN</i>	Збільшення титру (до 42–50 мг/л); подолання лімітуючих етапів	[1, 10, 16, 19]
Делеція конкурентних генів	<i>dhbB</i>	Перенаправлення метаболітів; зростання в 11 разів	[1, 10, 16, 19]

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4
Посилення ізопреноїдного (MEP) шляху	<i>hepS/hepT, menG</i>	Збільшення потоку прекурсорів; регуляція нутрієнтами	[1, 9, 10, 16, 19, 24]
Поєднання шляхів (перспектива)	Класичний + футалозиновий	Потенційне підвищення виходу; не досліджено	[11, 13]

3.4. Оптимізація технологічних процесів мікробного синтезу вітаміну K₂.

Протягом останнього десятиліття спостерігається інтенсивний розвиток і поглиблене вивчення технологій біопроектної інженерії, спрямованих на удосконалення промислового виробництва МК-7 [2, 3].

Оптимізація методів культивування

Отримання МК-7 передбачає використання методів виробництва, що охоплюють твердофазну або рідкофазну ферментацію.

Рідкофазна ферментація (Liquid-State Fermentation, LSF) є найпоширенішим методом у промисловості. Вона забезпечує простий контроль параметрів (температура, рН, аерація) та легкість масштабування. Але має певні недоліки як висока вартість енергії на попередню обробку, велика кількість стічних вод, складність екстракції вітаміну з розведеного середовища [2, 3].

Твердофазна ферментація (Solid-State Fermentation, SSF) передбачає використання твердих субстратів (частіше це соєві боби). Має вищу продуктивність, менше споживання енергії та утворення відходів. Готовий продукт (натто) можна використовувати як харчову добавку без екстракції вітаміну. Але при цьому спосібі відмічено складність контролю вологості та аерації в глибині субстрату, важкість автоматизації процесу [2, 3].

Ці методи статичної ферментації *Bacillus subtilis natto* широко розповсюджені, але основними проблемами масового виробництва є низький вихід ферментації, утворення біоплівки та використання органічних розчинників для екстракції вітамінів [2, 3].

Окремим високоефективним напрямком є перехід від періодичної до безперервної ферментації, зокрема в біоплівкових реакторах [2].

Біоплівкові реактори (Biofilm Bioreactors) є більш ефективними завдяки використанню здатності *Bacillus subtilis* до формування плівок. Біоплівки захищають клітини від стресу та забезпечують тривалий синтез у безперервному режимі, дозволяють утримувати велику кількість клітин у реакторі без ризику їх вимивання, що критично для безперервних процесів. Процес відділення продукту від біомаси стає простішим, оскільки клітини залишаються закріпленими на носії (наприклад, пористих мембранах або гідрогелях). А можливість тривалого використання біомаси в безперервному режимі знижує загальні витрати на виробництво [2, 7].

Тому біоплівкові реактори розглядаються як стабільна та ефективна альтернатива традиційним системам з вільними клітинами [2, 15].

До недоліків цього виду ферментації відносять обмеження дифузії, спричинене градієнтами концентрації кисню та поживних речовин через неконтрольоване формування плівок («pellicles»), утворенням товсту біоплівку, що призводить до неоднорідності метаболічного стану популяції. Моніторинг та регулювання росту біоплівки всередині реактора є технологічно складнішим завданням порівняно з гомогенними культурами. Відмічають також неконтрольоване відмирання або відшарування частин біоплівки, що може призводити до нестабільності процесу та забруднення вихідного потоку [15].

Отже, біоплівкові реактори перспективні для промисловості завдяки неперервності та високій продуктивності, але потребують оптимізації носіїв та моніторингу контамінації.

Оптимізація живильних середовищ

Інженерія середовища є критичним етапом удосконалень. Ключові стратегії включають підбір джерел вуглецю та азоту.

Джерела вуглецю. Дослідження показують ефективність використання гліцерину як субстрату та ряду гексоз (глюкоза та ін.) Гліцерин часто демонструє кращі результати для формування стабільних біоплівки [15].

Джерела азоту. Соєве борошно, пептон та дріжджовий екстракт є критичними для росту бактерій та синтезу МК-7.

Значна увага приділяється оптимізації концентрації солей та інших компонентів середовища для посилення синтезу саме біоактивного ізомеру МК-7 [3, 14, 16, 23].

Також розглядаються альтернативні джерела, такі як ферментована соя [3, 22].

Новим трендом є використання наночастинок оксиду заліза (Fe_3O_4). Вони можуть виступати як стресові фактори або носії, що стимулюють метаболічні шляхи синтезу вітаміну та допомагають у зміщенні рівноваги в бік біологічно активного *транс*-ізомеру [3, 15].

Оптимізація параметрів культивування

Ефективність ферментації залежить від точного налаштування температури, рН, режиму аерації. Ключові особливості для керування цими чинниками:

- *B. subtilis* є аеробом, тому насичення киснем є критичним. Однак надмірне перемішування може руйнувати структуру біоплівки.
- температурний режим зазвичай підтримується в межах 37–40 °С для оптимального росту штамів.
- оптимальним є нейтральне середовище (рН близько 7.0), хоча в процесі ферментації воно може змінюватися, що потребує автоматичного коригування [3, 14, 16, 23].

Ще одним з напрямів оптимізації технологічного процесу є використання методів іммобілізації клітин [7, 21].

Аналіз джерел свідчить, що майбутнє промислового виробництва вітаміну K_2 полягає в інтеграції метаболічної інженерії штамів із

інноваційними способами їх культивування, удосконаленням середовищ та оптимізацією параметрів культивування [1-3, 10, 14-16, 19, 21-24].

3.5. Схема технологічного процесу отримання вітаміну K₂.

Біотехнологічний процес отримання менахінонів складається з низки взаємопов'язаних стадій, кожна з яких потребує точного контролю параметрів: якості сировини, стерильності, технологічних режимів, а також ефективності екстракції та очищення продукту. Правильна організація цих етапів визначає кінцеву концентрацію біомаси, рівень синтезу МК-7 та чистоту готової субстанції.

Запропонована технологічна схема відображає всі основні стадії виробництва — від підготовки живильного середовища та вирощування посівного матеріалу до екстракції, очищення, контролю якості та пакування.

Опис стадій технологічного процесу

Стадія 1. Приготування живильного середовища.

Готують живильне середовище у резервуарах-змішувачах. Склад середовища: джерела вуглецю (глюкоза, гліцерин, 20–40 г/л), азоту (пептон, амонійні солі або соєвий гідролізат (30 г/л)), фосфору (калію дигідрофосфат (KН₂PO₄ 2 г/л), мікроелементи, вітаміни. Переважним є використання гліцерину, який уникає репресії CodY, підвищує титр МК-7. Встановлюють необхідний рівень рН (7,0), стерилізують середовище *in situ*. Контролюють якість сировини та стерильність середовища.

Стадія 2. Отримання посівного матеріалу.

Вирощують посівний матеріал з штаму *B. subtilis* MM26, отриманого з кріобанку, в колбах при 30 °С, 12–18 год. на орбітальному шейкері. Масштабують в бутлях та барботажній колоні накопичення біомаси не менш 10⁸ КУО/мл для інокуляції. Контролюють під час культивування температуру, рН та рівень аерації, в готовому посівному матеріалі густину мікробної суспензії (OD₆₀₀ 1.0–2.0), рН 6,0–6,5, чистоту культури (мікроскопія).

Стадія 3. Основне культивування

Внесення інокуляту (5–10%) у ферментер. Проведення ферментації у фед-бач режимі (глюкоза 1–2 г/л·год) при аерації та перемішуванні. Відбувається біосинтез вітаміну К₂ у біомасі. Ці умови оптимальні для *B. subtilis* та забезпечують максимальний синтез МК-7 (442 мг/л) за 30–36 год. Контролюють розчинений кисень (Dissolved Oxygen, DO), вимірюваний у відсотках від насичення у ферментаційному середовищі біореактора, температуру (32 °С), рН (6,5–7,0), швидкість аерації (1.5 vvm) та перемішування (200–800 грт, залежить від конструкції), рівень МК-7 (метод ВЕРХ (HPLC), кожні 6 год під час синтезу).

Запропоновано підтримувати DO на рівні 40–60% від початку до 12 год культивування (лаг та логарифмічна фаза) для накопичення максимальної біомаси. На стаціонарній фазі (12–36 год) для максимального синтезу МК-7 знизити до DO 30–40%.

Стадія 4. Відділення біомаси.

Відокремлення клітин від культуральної рідини шляхом фільтрування або центрифугування до концентрації біомаси (50–70 г/л сухої речовини) для подальшої екстракції. Контролюють швидкість обертання (8000 g), сухий залишок (20 %), прозорість надосадової рідини.

Стадія 5. Екстракція менахінону-7.

Екстрагують вітамін К₂ з біомаси за допомогою органічних розчинників (гексан, етанол, ізопропанол) на соникаторі-екстректорі (20 кГц, кавітація підвищує вихід на 20%) або на екстракторі періодичної дії при вакуумуванні (вакуум 0,01 МПа), або на ротаційному барабані безперервної дії.

Запропоновано екстракцію гарячим ізопропанолом (60±5 °С, співвідношення 1:8-10). Ізопропанол (2-пропанол) — оптимальний розчинник для екстракції менахінону-7 через його ліпофільність. Дає вихід МК-7 до 95 %. Легко упаровується, має температуру кипіння 82 °С. Хоча температура кипіння у гексана нижче – 69 °С, він має певні недоліки -

токсичність (відсутність статусу GRAS), повільне упаровування, низький вихід МК-7 (до 80 %). До недоліків етанолу відноситься занадта полярність, що приводить до розчинення білків та цукрів, від яких треба очищувати екстракт, та ще більш низький вихід - до 75 %.

Після відфільтрування (5 мкм) нерозчинного залишку отримують сирий екстракт (МК-7 0,5–2 мг/мл). Далі проводять упарювання екстракту. Для невеликих об'ємів застосовують роторні випарники, для промислових масштабів тонкоплівкові вакуум-випарники або випарники з падаючою плівкою. Упарювання веде до отримання концентрату з 20-30 % сухих речовин.

Стадія 6. Очищення продукту.

На стадії здійснюють хроматографічне очищення, видалення домішок, концентрування. Метод флеш-хроматографії із використанням силікагелю як наповнювача та елюентів гексан:ізопропанол (95:5) дозволяє видалити домішки (МК-4, пігменти) та досягнути чистоти продукту не менше 95 %.

Стадія 7. Сушіння та стабілізація.

Проводять сушіння концентрату (вакуумне або розпилювальне), додають речовини-стабілізатори для запобігання окисленню. Використовують розпилювальні сушарки з температурою сушильного агента на вході 160 °С, на виході 80 °С. Запропоновано використання 0,5 % токоферолу як антиокиснювача. Контролюють вміст вологи у порошок – не більше 2%, ступінь окиснення МК-7 (не більш 0,5 мг/кг).

Окиснення визначають за допомогою TBARS - теста на речовини, реактивні з тіобарбітуровою кислотою (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Вимірює вторинні продукти перекисного окислення ліпідів (альдегіди, малоновий діальдегід) у процесі сушіння/стабілізації МК-7. Запропонований рівень TBARS відповідає вимогам до фармацевтичних субстанцій.

Стадія 8. Упакування і зберігання.

Проводять фасування у герметичні контейнери під азотом для захисту від світла та кисню. Обладнання: автомат фасування. Контролюють тиск інертного газу (азот), номінальну масу наповнення, герметичність контейнерів.

Наповнені контейнери в груповій упаковці переміщують на карантинний склад до отримання результатів аналізу на відповідність за всіма показниками НТД. Зберігають готову продукцію в темному, прохолодному місці для запобігання деградації.

Кожен етап супроводжується переліком необхідних матеріалів і точок контролю, що визначені для відповідних стадій. Такий структурований підхід дозволяє чітко представити технологічний ланцюг виробництва вітаміну К₂ та забезпечує розуміння основних вимог до інженерії біопроектів.



Рис. 3.1 - Технологічна схема виробництва вітаміну К₂ (менахінону-7).



Рис. 3.1 Продовження технологічної схеми виробництва вітаміну К₂ (менахінону-7).

3.6. Напрями подальших досліджень.

Проведений аналіз літературних джерел виявив, що майбутнє за інтегрованим підходом до організації виробництва МК-7 мікробним синтезом, який включає дослідження на таких напрямках:

1. Удосконалення штамів-продуцентів.

Удосконалення методів кріоконсервації для запобігання спонтанних мутацій при зберіганні штамів-продуцентів.

Дослідження ARTP/UV-мутагенезу для збільшення продуктивності більш 600 мг/л.

CRISPR-інтеграція генів *menA-dxs* у хромосому, що дозволить уникнути проблеми втрати плазмід через ряд поколінь, позбавитися необхідності використовувати антибіотичні маркери, як при використанні плазмідної селекції.

Скринінг нових штамів з ферментованих сої (натто).

2. Удосконалення живильних середовищ.

Використання дешевих субстратів та відходів, як відходи біодизеля (містять більш 95% гліцерину), гідролізат кукурудзи, патока тощо.

Використання CO₂-інгібіції глюкози. Це регуляторний механізм, який застосовують, коли накопичення CO₂ у ферментаційному середовищі пригнічує метаболізм глюкози, перенаправляючи вуглець на синтез МК-7.

Оптимізація середовищ додаванням наноматеріалів для покращення транспорту та контрольованого потрапляння поживних речовин.

Використання статистичних методів побудови математичної моделі залежності виходу (МК-7, мг/л) від множинних факторів (азот/фосфор).

3. Удосконалення способів та умов культивування.

Використання сучасних біореакторів для проведення безперервної ферментації, зокрема в біоплівкових реакторах, наприклад, у вигляді ротаційних барабанів.

Використання фід-бач з AI-управлінням DO/pH.

Перфузійна ферментація (клітинна ретенція).

4. Прогрес способів виділення та очищення.

SMB-хроматографія (симульована рухома фаза) для МК-7/МК-4 розділення.

Застосування методів ультрафільтрації та нанофільтрації на заміну використання органічної фази (ізопропанолу).

Використання суперкритичного CO₂ для уникнення органічних розчинників.

Застосування CFD-моделювання (Computational Fluid Dynamics) для прогнозування поведінки потоків у промислових установках.

Комплексне використання різних факторів удосконалення та оптимізації біотехнологічного процесу отримання МК-7 дозволить знизити собівартість і зробити його доступнішим для ринку функціональних харчових продуктів та фармацевтичних препаратів.

Висновок до 3 розділу:

У межах даного розділу було комплексно розглянуто сучасні підходи до біотехнологічного виробництва вітаміну K₂, із особливим акцентом на промисловий синтез найбільш цінної форми — менахінону-7 (МК-7). Аналіз біотехнологічних стратегій показав, що мікробне виробництво є провідним напрямом завдяки його екологічності, економічній ефективності та здатності забезпечувати високий рівень чистоти кінцевого продукту.

Вивчення продуцентів підтвердило, що штами *Bacillus subtilis* є найбільш перспективними мікроорганізмами для синтезу МК-7. Удосконалення продуцентів шляхом класичної селекції, генетичних модифікацій та метаболічної інженерії дозволяє суттєво підвищити продуктивність та покращити стабільність біосинтезу.

Результати аналізу технологічних процесів свідчать, що оптимізація параметрів культивування, складу живильного середовища, рівня аерації, рН та температурного режиму є критичними факторами для максимізації виходу вітаміну K₂. Застосування метаболічної інженерії, зокрема редизайну шляхів

ізопреноїдного метаболізму, дозволяє спрямовано збільшити потік попередників у бік синтезу менахінонів.

Представлена схема технологічного процесу відображає всі ключові етапи отримання вітаміну K₂ — від підготовки сировини та посівного матеріалу до ферментації, екстракції, очищення й контролю якості. Узагальнюючи, можна стверджувати, що успішне промислове виробництво МК-7 ґрунтується на комплексній взаємодії біотехнологічних, інженерних та аналітичних рішень, що у поєднанні забезпечують високу ефективність та якість кінцевого продукту.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано біохімічні характеристики вітаміну K_2 та встановлено, що менахінони, зокрема форма МК-7, відіграють ключову роль у регуляції кальцієвого обміну, підтримці здоров'я кісткової та серцево-судинної систем, що зумовлює їх високу біологічну та нутрицевтичну цінність.
2. Розглянуто особливості біосинтезу менахінонів у бактеріальних клітинах та встановлено, що мікроорганізми родів *Bacillus*, *Lactococcus* є найбільш перспективними продуцентами вітаміну K_2 , здатними до синтезу біологічно активних транс-ізомерів МК-7.
3. Проаналізовано сучасні біотехнологічні та метаболічні інженерні підходи до підвищення продуктивності мікробного синтезу менахінону, зокрема оптимізацію шляхів центрального вуглецевого метаболізму, шляхів шикімату та МЕР-шляху, що дозволяє суттєво збільшити вихід МК-7.
4. Узагальнено технологічні прийоми культивування, вилучення та очищення вітаміну K_2 , показано ефективність застосування органічних розчинників та хроматографічних методів для отримання високочистого продукту, придатного для використання у нутрицевтичних формах.
5. Проаналізовано сучасний стан та тенденції ринку вітаміну K_2 в Україні та світі, встановлено зростання попиту на продукти з МК-7 у зв'язку з його високою біодоступністю, природним походженням та науково підтвердженими корисними властивостями.
6. Запропоновано узагальнену технологічну схему мікробіологічного синтезу вітаміну K_2 , яка може бути використана як основа для подальшої розробки промислових біотехнологій.
7. У роботі комплексно та ґрунтовно виконано всі поставлені у вступі завдання. Отримані результати свідчать про високу перспективність мікробіологічного отримання МК-7 для використання у нутрицевтиці, оскільки такий підхід забезпечує отримання біологічно активного, безпечного та конкурентоспроможного продукту. Подальший розвиток цього напрямку є надзвичайно актуальним та має значний потенціал для практичного впровадження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Advances in Enhanced Menaquinone-7 Production From *Bacillus subtilis* / C. Liao et al. *Front Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 9. P. 695526. DOI: 10.3389/fbioe.2021.695526.
2. Berenjian A., Mahdinia E. Demirci A. Sustainable menaquinone-7 production through continuous fermentation in biofilm bioreactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2024. Vol. 47. P. 1107–1116. DOI: 10.1007/s00449-024-03040-1.
3. Berenjian A., Yazdanpanah N. Unveiling the Latest Breakthroughs in Menaquinone-7 Research through Fermentation-Based Production. *Processes.* 2023. Vol. 11(9). P. 2593. DOI: 10.3390/pr11092593.
4. Bøe C. A., Holo H. Engineering *Lactococcus lactis* for Increased Vitamin K2 Production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. P. 191. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00191.
5. Bonaldo F., Leroy F. Review: Bacterially produced vitamin K2 and its potential to generate health benefits in humans. *Trends in Food Science Technology.* 2024. Vol. 147. P. 104461. DOI: 10.1016/j.tifs.2024.104461.
6. Bus K., Szterk A. Relationship between Structure and Biological Activity of Various Vitamin K Forms. *Foods.* 2021. Vol. 10(12). P. 3136. DOI: 10.3390/foods10123136.
7. Enhancement of menaquinone- 7 production through immobilization with hydrogel-based porous membranes / Q. H. Zhang et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2025. Vol. 109. P. 121. DOI: 10.1007/s00253-025-13493-3.
8. Exploring the Link Between Vitamin K and Depression: A Systematic Review / M. H. Hashim et al. *Medicina.* 2025. Vol. 61(5). P. 861. DOI: 10.3390/medicina61050861.
9. Highly Efficient Production of Menaquinone-7 from Glucose by Metabolically Engineered *Escherichia coli* / Q. Gao et al. *ACS Synthetic Biology.* 2021. Vol. 10(4). P. 756–765. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00568.

10. Increasing Vitamin K₂ Synthesis in *Bacillus subtilis* by Controlling the Expression of MenD and Stabilizing MenA / W. Huang et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2024. Vol. 72(41). P. 22672–22681. DOI: 10.1021/acs.jafc.4c07385.
11. Inhibition of the futasolone pathway for menaquinone biosynthesis suppresses *Chlamydia trachomatis* infection / B. M. Dudiak et al. *FEBS Lett*. 2021. Vol. 595(24). P. 2995–3005. DOI: 10.1002/1873-3468.14223.
12. Kaneria P. Vitamin K. *Virtual Internship Program UNC Nutrition Research Institute 2024 Student Journal*. Kannapolis, NC : UNC Nutrition Research Institute, 2024. P. 16–17. URL: <https://uncnri.org/wp-content/uploads/2024/07/VIP-layout.pdf> (Date of access: 23.11.2025).
13. Kurosu M., Begari E. Vitamin K₂ in Electron Transport System: Are Enzymes Involved in Vitamin K₂ Biosynthesis Promising Drug Targets? *Molecules*. 2010. Vol. 15. P. 1531–1553. URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Vitamin-K2-in-Electron-Transport-System%3A-Are-in-K2-Kurosu-Begari/4544a0c4cb2a5c63fee307a508b0db1fe89dc54b> (Date of access: 23.11.2025).
14. Lal N., Seifan M., Berenjian A. Optimisation of the fermentation media to enhance the production of the bioactive isomer of vitamin menaquinone-7. *Bioprocess Biosyst. Eng*. 2022. Vol. 45. P. 1371–1390. DOI: 10.1007/s00449-022-02752-6.
15. Mahdinia E., Demirci A., Berenjian A. Effects of medium components in a glycerol-based medium on vitamin K (menaquinone-7) production by *Bacillus subtilis* natto in biofilm reactors. *Bioprocess. Biosyst. Eng*. 2019. Vol. 42. P. 223–232. DOI: 10.1007/s00449-018-2027-8.
16. Maneesha M., Subathra D. C. A bioprocess optimization study to enhance the production of Menaquinone-7 using *Bacillus subtilis* MM26. *Microb. Cell. Fact*. 2025. Vol. 24. P. 109. DOI: 10.1186/s12934-025-02735-8.

17. Maneesha M., Subathra Devi C. Biosynthesis and therapeutic applications of MK-7: A comprehensive review. *Cogent Food Agriculture*. 2025. Vol. 11(1). DOI: 10.1080/23311932.2025.2509677.
18. Menaquinone-7 Supplementation Increases Multiple Advanced Glycation End-Products and Oxidation Markers in Zucker Diabetic Fatty Rats / I. Mrosewski et al. *Nutrients*. 2025. Vol. 17(17). P. 2733. DOI: 10.3390/nu17172733.
19. Metabolic Engineering Strategy for *Bacillus subtilis* Producing MK-7 / S. Wu et al. *Foods*. 2025. Vol. 14(23). P. 4150. DOI: 10.3390/foods14234150.
20. New aspects of microbial vitamin K₂ production by expanding the product spectrum / Z. Zhang et al. *Microb. Cell. Fact.* 2021. Vol. 20. P. 84. DOI: 10.1186/s12934-021-01574-7.
21. Optimization of Culture Condition for the Production of Menaquinone-7 by *Bacillus Subtilis* Natto / M. Sharifzadeh et al. *Research in Molecular Medicine*. 2022. Vol. 10(1). P. 37–46. DOI: 10.32598/rmm.10.1.1239.1.
22. Production of menaquinone – 7 by *Bacillus cereus* KMV07: a strain isolated from fermented *Glycine max* / K. Madhusoodanan et al. *J. Food. Sci. Technol.* 2025. Vol. 62. P. 697–705. DOI: 10.1007/s13197-024-06059-0.
23. Production of Vitamin K₂-7 from Soybean Using Bacterial Fermentation and its Optimization at Different Salt Concentrations / A. Dinker et al. *Industrial Biotechnology*. 2024. Vol. 20(2). P. 60. DOI: 10.1089/ind.2023.0032.
24. Synergistic Optimization of *Bacillus subtilis* for Efficiently Producing Menaquinone-7 (MK-7) by Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) Mutagenesis and Metabolic Engineering / M. Li et al. *Fermentation*. 2025. Vol. 11(3). P. 137. DOI: 10.3390/fermentation11030137.
25. Vitamin K / National Institutes of Health. URL: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminK-HealthProfessional/> (Date of access: 27.11.2025).
26. Vitamin K₂ (Menaquinone). *Supplementopedia*. URL: <https://supplementopedia.com/ingredients/vitamin-k2-menaquinone> (Date of access: 17.10.2025).

27. Vitamin K2 Market (2025–2030) : Size, Share Trends Analysis Report By Product (MK-4, MK-7), By Dosage Form, By Source, By Indication, By Application, By Distribution Channel, By Region, And Segment Forecasts. *Grand View Research*. URL: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/vitamin-k2-market-report> (Date of access: 15.10.2025).
28. Vitamin K2 Market Size, Share, and Industry Analysis By Product (MK-4 and MK-7), By Form (Capsules/Tablets, Softgels, Liquid, and Others), By Source (Natural and Synthetic), By Application (Bone Health, Heart Health, Blood Clotting, and Others), By Distribution Channel (Online and Offline) and Regional Forecast, 2026–2034. *Fortune Business Insights*. URL: <https://www.fortunebusinessinsights.com/vitamin-k2-market-112468> (Date of access: 15.10.2025).
29. Vitamin K₂. *Wikipedia*. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_K2 (Date of access: 15.10.2025).
30. Вітамін K₂. *Biotus.ua*. URL: <https://biotus.ua/ua/vitaminy/vitamin-k/vitamin-k2.html?srsId=AfmBOoriGqmzvXzqzgGXluwjr4eaJpVKCKbftihS2gcmwwDU4wFxyOss> (дата звернення: 11.09.2025).
31. Вітамін K₂. *Аптека 911*. URL: <https://apteka911.ua/ua/shop/substance/vitamin-k2-s8422> (дата звернення: 17.10.2025).
32. Вітамін K₂. *Добавки.ua*. URL: <https://dobavki.ua/ua/vitamin-k2/?srsId=AfmBOorGrwyqiguDytSUBkMyL7-V9muYnW9yL1p8dsrBYgQt4SSrK-Gd> (дата звернення: 11.09.2025).
33. Здоров'я жінки та остеопороз: сучасний погляд на проблему (Огляд літератури) / В. Кондратюк та ін. *Репродуктивне здоров'я жінки*. 2023. № 3. С. 83–89. URL: <https://repro-health.com.ua/article/view/283898> (дата звернення: 11.09.2025).
34. Роль вітамінів К і D у процесах ектопічної кальцифікації у хворих на хронічну хворобу нирок: сучасний стан проблеми / О. Б. Сусла та ін. *Український журнал нефрології та діалізу*. 2022. № 3. С. 73–82.

35. Роль вітаміну К у патології новонароджених та немовлят (огляд літератури) / Ю. Марушко та ін. *Здоров'я дитини*. 2024. № 19(6). С. 414–422. DOI: 10.22141/2224-0551.19.6.2024.1747.
36. Сидоренко Д. Д. Маркетингові дослідження у біотехнології та фармацевтиці. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : матеріали V Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 28 берез. 2025 р. Харків : НФаУ, 2025. С. 350–351.

ДОДАТОК**Публікації за темою роботи**

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

YOUTH PHARMACY SCIENCE

МАТЕРІАЛИ
VI ВСЕУКРАЇНСЬКОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ

10-11 грудня 2025 року
м. Харків

Харків
НФаУ
2025

Пігмент індиго є одним з найдавніших і найпоширеніших барвників, що використовується в текстильній промисловості для фарбування тканин, зокрема деніму. Традиційно індиго видобувається з рослин (наприклад, *Indigofera tinctoria*), але сучасне промислове виробництво базується на хімічному синтезі, який виробляє близько 80000 т на рік і передбачає використання токсичних речовин (анілін, формальдегід, ціанід водню, аміак), високих температур (180-300 °С) та генерує значні забруднення довкілля. Зростаюча глобальна криза екологічної стійкості та регуляторні вимоги стимулюють перехід до біотехнологічних методів виробництва. Мікробний синтез з використанням ціанобактерій є перспективним, оскільки дозволяє використовувати CO₂ як джерело вуглецю, світло як енергію, воду та солі, забезпечуючи економічність та екологічність виробництва. Ціанобактерії розглядаються як ідеальні «фабрики», оскільки вони є фотоавтотрофами – використовують вуглекислий газ як єдине джерело вуглецю, а сонячне світло як джерело енергії. Це значно здешевлює та спрощує їхнє вирощування порівняно з гетеротрофними бактеріями. Перспективними мікроорганізмами для мікробного синтезу індиго є генетично модифіковані ціанобактерії, наприклад штам *Synechocystis sp. PCC6803*, який є модельним для фотосинтетичного виробництва. На відміну від традиційних бактерій, що є робочими конячками у біотехнологіях, таких як *E. coli*, ціанобактерії регенерують NADPH через фотосинтез, дозволяючи світло-керований біокаталіз без додавання цукрів та антибіотиків.

Висновки. Виробництво пігментів мікробним синтезом є перспективним завдяки екологічній стійкості, економічній вигоді та багатофункціональності, з потенціалом для зменшення залежності від синтетичних барвників, зокрема для індиго як екологічної альтернативи хімічному синтезу.

СУЧАСНІ БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ К2 МІКРОБІОЛОГІЧНИМ СИНТЕЗОМ

Сидоренко Д.Д.

Науковий керівник: Двінських Н.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

Study2021darina@gmail.com

Вступ. Вітамін К2 (менахінон) є важливою біологічною сполукою, що виконує ключові функції у підтриманні нормального стану кісткової, серцево-судинної та кровотворної систем. Завдяки здатності активувати білки, залежні від γ -карбоксилювання, він бере участь у регуляції транспорту кальцію, процесах згортання крові та метаболічних реакціях клітин. Особливий інтерес викликає форма МК-7 (менахінон-7), яка характеризується високою біодоступністю, тривалим періодом напіввиведення та вираженим фізіологічним ефектом. На сьогодні найбільш перспективним напрямом отримання МК-7 є мікробний синтез, що забезпечує високу чистоту продукту та економічну ефективність виробництва.

У зв'язку з потребою фармацевтичної промисловості у високоякісному вітаміні К2 розробка та оптимізація біотехнологічних методів виробництва набуває особливого значення. Біотехнологічні підходи потребують розробки та контролю фізико-хімічних параметрів ферментації, застосування високопродуктивних штамів-продуцентів, застосування метаболічної інженерії для підвищення виходу цільового продукту. Дослідження сучасних

технологічних рішень та вивчення біохімічних особливостей біосинтезу МК-7 дозволяють створити ефективніші та безпечніші виробничі процеси.

Мета дослідження. Метою роботи є аналіз сучасних біотехнологічних підходів до промислового виробництва вітаміну К₂, вивчення властивостей та потенціалу різних продуцентів, дослідження можливостей удосконалення технологічних процесів на основі метаболічної інженерії та розробка узагальненої схеми технологічного процесу одержання МК-7 мікробним шляхом.

Матеріали та методи. У роботі застосовано методи порівняльного аналізу технологічних процесів мікробного синтезу, систематизації даних про штами-продуценти та методи їх оптимізації, а також методи структурно-логічного моделювання для формування узагальненої технологічної схеми виробництва вітаміну К₂.

Дослідження охоплювали такі групи матеріалів:

1. Біохімічні характеристики вітаміну К₂ та його фізіологічних форм.
2. Особливості біосинтезу менахінонів у бактеріальних клітинах.
3. Технологічні характеристики штамів *Bacillus spp.*, які є найпоширенішими продуцентами МК-7.
4. Основні методи метаболічної інженерії, що застосовуються для збільшення продуктивності мікробного синтезу.
5. Стадії промислової ферментації для виділення та очищення вітаміну К₂.

В дослідженні аналізували параметри ферментації (t, рН, аерація, концентрація субстратів), моделі проведення біопроектів, порівнювали ефективність різних технологічних рішень та систематизували дані щодо процесів екстракції і очищення МК-7.

Результати дослідження. Встановлено, що вітамін К₂ бере участь у ключових біохімічних реакціях організму, зокрема у γ -карбоксілюванні білків, що відповідають за згортання крові та мінералізацію кісткової тканини. Показано, що МК-7 є найбільш біологічно активною формою, що обумовлює його важливість для фармацевтичної промисловості.

Проаналізовано механізми біосинтезу менахінонів у бактерій, що включають реакції футарохінолінового шляху та модифікацію ізопреноїдного ланцюга. Встановлено, що найбільш перспективними продуцентами є штами *Bacillus subtilis* та споріднені види, здатні до високорівневого синтезу МК-7 у ході твердофазної та субмерсійної ферментації.

Виявлено, що застосування метаболічної інженерії (надекспресія генів *menaA*–*menaF*, пригнічення конкурентних шляхів, оптимізація переносу електронів) дозволяє збільшити вихід МК-7 на 30–80%. Запропоновано методи вдосконалення параметрів ферментації, включаючи контроль співвідношення джерел вуглецю та азоту, оптимізацію швидкості аерації та регулювання температури для максимізації синтезу ізопреноїдного ланцюга.

Розроблено узагальнену схему технологічного процесу одержання МК-7, що включає підготовку інокуляту, ферментацію, вилучення вітаміну з біомаси, очищення, концентрування та стандартизацію готового продукту. Така схема є універсальною для більшості сучасних біотехнологій мікробного виробництва вітамінів.

Висновки. У результаті проведеного дослідження встановлено, що мікробний синтез є найефективнішим методом виробництва вітаміну К₂, зокрема форми МК-7, яка характеризується високою біологічною активністю. Біотехнологічні підходи дозволяють забезпечити отримання продукту з високим ступенем чистоти, оптимізувати процеси ферментації та підвищити економічну ефективність виробництва.

Показано, що продуктивність мікробного синтезу значною мірою залежить від властивостей штаму-продуцента, умов культивування та коректно побудованої технологічної

стратегії. Метаболічна інженерія є перспективним інструментом для покращення виходу МК-7, завдяки можливості точного регулювання внутрішньоклітинних метаболічних потоків.

Узагальнена технологічна схема виробництва вітаміну К2 може бути використана як основа для впровадження сучасних біотехнологічних процесів у промисловість. Отримані результати підтверджують перспективність подальших досліджень у напрямі розробки високопродуктивних штамів та вдосконалення методів ферментації для стабільного промислового отримання МК-7.

АНАЛІЗ СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ВИРОБНИЦТВА СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ

Степаненко В.Д.

Науковий керівник: Калужная О.С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

Astrapharm-vostok@ukr.net

Вступ. Серратіопептидаза – це протеолітичний фермент (позаклітинна цинквмісна металопротеїназа) із молекулярною масою 53 кДа, що виробляється бактеріями *Serratia marcescens*. Фермент має значні терапевтичні застосування, включаючи протизапальну, антифібринолітичну та анальгетичну дію, а також використовується в промисловості (у миючих засобах, харчовій переробці, шкіряній та паперовій промисловості). На українському ринку наявні препарати переважно імпортного виробництва або з локальним пакуванням закордонної субстанції під такими торговими назвами: Серрата (ТОВ Кулум Фарм, Україна), Асартгаза (ТОВ Астрафарм, Україна), Мовіназа (Медітоп Фармасьютикал Лтд., Угорщина, Сава Хелскеа Лтд., Індія), Фібріназа-20 (Евертоджен Лайф Саєнсиз Лімітед, Індія), Рідексія (ТОВ Нутрімед, Україна), Серрапейн (ТОВ Здравофарм, Україна), Серратидез (ТОВ Здравофарм, Україна) тощо. Глобальний ринок серратіопептидази, як протеолітичного ферменту з широким терапевтичним (протизапальна, антифібринолітична, анальгетична дія) та промисловим застосуванням (миючі засоби, харчова переробка, шкіряна промисловість), прогнозовано зросте з 144 млн USD у 2025 році до 291 млн USD до 2033 року, що створює можливості для локального виробництва. В Україні відсутнє власне виробництво серратіопептидази, а препарати переважно імпортуються або виробляються з імпортих субстанцій на локальних заводах. Це призводить до вразливості ланцюгів постачань, особливо в контексті геополітичних ризиків, інфляції та реформ ринку. Розвиток біотехнологій, таких як пошук штамів, оптимізація ферментації та рекомбінантне виробництво, може сприяти економічній незалежності, створенню робочих місць та внеску в ВВП.

Мета дослідження. Аналіз сучасних біотехнологічних методів виробництва серратіопептидази з подальшою можливістю їх адаптації до українських виробничих потужностей для створення локального виробництва ферменту.

Матеріали та методи. Теоретичний аналіз та узагальнення сучасної наукової літератури за темою дослідження.

Результати дослідження. На сьогодні промислове виробництво серратіопептидази здійснюється з використанням природного штаму *Serratia marcescens*. Водночас застосування цього штаму пов'язане з численними викликами та проблемами, зокрема через його патогенну природу, труднощі з ферментацією та масштабуванням процесу на промисловому рівні. Крім того, будь-який промисловий штам при використанні протягом тривалого періоду має



**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
РАДА МОЛОДИХ ВЧЕНИХ ПРИ ХАРКІВСЬКІЙ ОБЛАСНІЙ ВІЙСЬКОВІЙ
АДМІНІСТРАЦІЇ
РАДА МОЛОДИХ ВЧЕНИХ
СТУДЕНТСЬКЕ НАУКОВЕ ТОВАРИСТВО**

ПРОГРАМА

**VI Всеукраїнської науково-практичної конференції
з міжнародною участю
«YOUTH PHARMACY SCIENCE»**

10-11 грудня 2025 р.

Харків – 2025

Кафедра біотехнології

Деякі аспекти нутригеноміки

1. Доповідач: ДРОЗДОВА Анастасія
Науковий керівник: Філіпцова О.В., д. біол. н., професор
2. **Синергічний ефект біоактивних компонентів у створенні функціонального напою з ноотропними та адаптогенними властивостями**
Доповідач: НІКІТЕНКО Віолета
Науковий керівник: Соловйова А.В., доктор філософії
3. **Розробка косметичного засобу з екстрактом мікроводоростей**
Доповідач: ПОНОМАРЕНКО Юлія
Науковий керівник: Соловйова А.В., доктор філософії
4. **Особливості технологічного процесу отримання менахінону (вітаміну K2)**
Доповідач: СИДОРЕНКО Дарина
Науковий керівник: Двінських Н.В., канд. фарм. н., старший науковий співробітник
5. **Виділення та характеристика метилотрофних бактерій з відходів сільськогосподарських виробництв для потенційної розробки біопрепарату**
Доповідач: ПРОНІН Ігор
Науковий керівник: Калюжная О.С., канд. фарм. н., доцент
6. **Аналіз сучасних біотехнологічних методів виробництва серратіопептидази**
Доповідач: СТЕПАНЕНКО Віталій
Науковий керівник: Калюжная О.С., канд. фарм. н., доцент
7. **«Косметичні» пробіотики: доцільність та ефективність застосування**
Доповідач: ГАВРИЛЕНКО Поліна
Науковий керівник: Калюжная О.С., канд. фарм. н., доцент
8. **Обеліски: загадкові РНК-елементи у бактеріях людини**
Доповідач: ЛОГВІНОВ Максим
Науковий керівник: Хохленкова Н.В., д. фарм. н., професор
9. **Trends in the development of production technologies for recombinant blood factor rFXIII**
Доповідач: ВІНОКУРОВА Марія
Науковий керівник: Калюжная О.С., канд. фарм. н., доцент
10. **Перспективність організації виробництва мийного засобу з пробіотиком**