menA 过表达菌株构建及两阶段 pH 控制促进 VK_2 合成

刘 艳[1,2]， 杨自名[1]， 薛正莲[1]， 杨超英[1]， 胡刘秀[1,2]， 程良成[2]，
王 洲[1]， 丁秀敏[1]

（1. 安徽工程大学 生物与化学工程学院，安徽 芜湖 241000；2. 芜湖张恒春药业有限公司，安徽 芜湖 241009）

摘要： 为提高纳豆芽孢杆菌合成维生素 K_2 的能力，构建了纳豆芽孢杆菌体内维生素 K_2 合成途径中的关键酶—1,4-二羟基-2-萘甲酸-聚异戊二烯转移酶(MenA)—过表达菌株，并在 5 L 发酵罐水平考察了不同 pH 对该过表达菌株生长和维生素 K_2 合成能力的影响。结果表明：*menA* 基因的过量表达能使 *Bacillus subtilis natto* 维生素 K_2 合成量提高 51%。单一恒定的 pH 不能满足既能使菌株生长充分，又能最大化产物合成的条件。通过分析不同 pH 下发酵过程曲线和动力学参数，提出了两阶段 pH 控制策略：即在发酵前期 0~40 h 控制 pH 7.0，发酵后期 40~80 h 控制 pH 4.0，菌体生物量和维生素 K_2 合成量分别达到了(11.46±0.67) g/L 和(63.60±1.81) mg/L，是原始菌分批发酵 pH 自然状态下的 1.5 倍和 2.6 倍。

关键词： 纳豆芽孢杆菌；过表达；控制策略；pH；维生素 K_2

中图分类号：Q 786　**文章编号：**1673-1689(2019)12-0031-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.005

Enhance Vitamin K_2 Production Via *menA* Gene Overexpression and a Two-Stage pH Control Strategy

LIU Yan[1,2], *YANG Ziming*[1], *XUE Zhenglian*[1], *YANG Chaoying*[1], *HU Liuxiu*[1,2], *CHENG Liangcheng*[2], *WANG Zhou*[1], *DING Xiumin*[1]

(1. College of Biochemical and ChemicalEngineering, Anhui Polytechnic University, 241000, Wuhu, China; 2. Wuhu Zhanghengchun Medicine Co., Ltd., 241009, Wuhu, China)

Abstract: To improve vitamin K_2 production, 1,4-dihydroxy-2-naphthoicacid polyprenyltransferase (MenA)which was a key enzyme for vitamin K_2 synthesis in *Bacillus subtilis natto* was overexpressed. The effects of pH on cell growth and vitamin K_2 production was also investigated in a 5 L fermentator. It was shown that the vitamin K_2 production was enhanced by 51% when *menA* gene was overexpressed. The mono-control of pH could not balance the cell growth and vitamin K_2 production. A two-stage pH control strategy was employed, i.e. pH was controlled at 7.0 between 0~40 h and switched to 4.0 between 40~80 h. The biomass and vitamin K_2 production reached (11.46±0.67)g/L

收稿日期： 2017-07-21

基金项目： 国家自然科学基金青年基金项目(31871781, 31772081, 31501465)；安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2018A0106)；国家级大学生创新创业项目(201910363042, 201810363046, 2016103630055)；省级大学生创新创业项目(201710363178)。

*** 通信作者：** 刘艳(1981-)，女，理学博士，教授，主要从事食品科学与工程研究。E-mail：liuyan@ahpu.edu.cn

引用本文：刘 艳，杨自名，薛正莲，等. *menA* 过表达菌株构建及两阶段 pH 控制促进 VK_2 合成[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(12)：31-38.

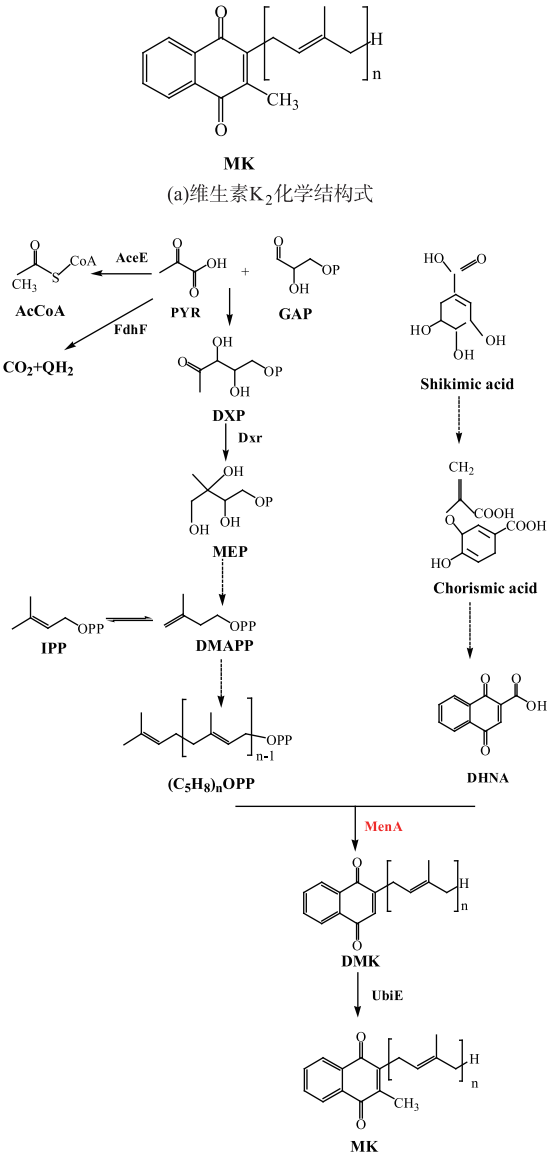
and (63.60±1.81) mg/L, which were 1.5 and 2.6 times of that of pH uncontrolled condition by original strain, respectively.

Keywords: *Bacillus subtilis natto*, overexpression, control strategy, pH, vitamin K_2

维生素 K_2(MK, VK_2)是一类重要的甲萘醌系列脂溶性维生素,在医药和食品领域都有重要应用。健康人群适量补充富含维生素 K_2 食品,可有效减少骨折发病率[1]。研究发现,日本儿童没有其它国家儿童普遍存在的生长痛,是因为从小吃纳豆,而纳豆中富含维生素 K_2,导致儿童的骨密度高、骨骼强壮。另外,对于不足 6 个月大的婴儿来说,维生素 K 缺乏引起的婴儿出血疾病是一个非常严重的世界性问题[2]。并且,近几年国内外学者在 Science 和 Nature 等顶级国际期刊发表的研究报道都表明,同辅酶 Q 相似,维生素 K_2 作为一种膜结合电子载体,具有修复损伤细胞线粒体的功能[3-5],这对于人类免受帕金森症折磨起着重要的作用。基于这 3 方面的应用,国际市场对功能性食品维生素 K_2 的需求量近年来不断增长。

由于化学法合成维生素 K_2 存在安全问题,在欧盟和部分亚洲国家被限制不能直接将其用于食品中;此外,微生物发酵合成维生素 K_2,因具有反应条件温和、发酵原料价格低廉、环境污染小,同时因为原料来源于生物,合成的产品具有高生物活性和高生物相容性等优点,成为维生素 K_2 合成的首选方法。国内外用于合成维生素 K_2 的菌株主要有黄杆菌和纳豆芽孢杆菌,分别生产在 C3 位侧链上带有 4 个和 7 个异戊二烯单位的维生素 K_2 同系物(MK-4 和 MK-7)[6-18]。MK-7 在人体血液中具有较长的半衰期[19],并且纳豆芽孢杆菌来源于食品,因此利用纳豆芽孢杆菌发酵获得的维生素 K_2 更有市场前景。

随着分子生物学技术的快速发展和基因组测序技术的进步,菌体内维生素 K_2 的基础代谢研究也在不断被推进和深入。维生素 K_2 的化学结构式为 2-甲基-3-烯基-1,4-萘醌,分别由主链 1,4-二羟基-2-萘甲酸(DHNA)和侧链聚异戊二烯组成(图 1(a))。1982 年 Bentley 和 Meganathan 详细综述了维生素 K_2 在细菌体内生物合成途径中的代谢中间物、关键酶以及催化反应机理,提出维生素 K_2 中主链底物萘醌骨架主要通过莽草酸途径(图 1(b)),由 *men* 系列基因编码的酶系催化合成[20];乙酰 CoA 进入甲羟戊酸途径形成侧链底物聚异戊二烯焦磷酸(OPP)。作为桥连主链和侧链底物合成维生素 K_2 的酶,过量表达 1,4-二羟基-2-萘甲酸-聚异戊二烯转移酶(MenA)对于促进维生素 K_2 在菌体内的代谢合成具有十分显著的效果[21-22]。然而,目前的研究还只限于大肠杆菌和解淀粉芽孢杆菌,并且也尚未见有对 *menA* 基因过表达菌株进行深入地发酵过程调控方面的研究。



(a)维生素K_2化学结构式

(b)维生素K_2代谢合成途径

图 1 维生素 K_2 化学结构式及代谢合成途径

Fig. 1 Structure formula of vitamin K_2 and its metabolic pathway

作者考察了纳豆芽孢杆菌 *menA* 基因过表达对维生素 K_2 合成能力的影响,检测并分析恒定 pH 对分批发酵培养过程中维生素 K_2 合成动力学参数,并在此基础上提出两阶段 pH 控制策略,为维生素 K_2 的大规模生产提供了理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株与质粒 纳豆芽孢杆菌为本实验室诱变获得。大肠杆菌BH5α,质粒 pHY-P43 保藏于本实验室。

1.1.2 培养基 斜面培养基(g/L):牛肉膏 3,蛋白胨 10,NaCl 5,琼脂粉 20;pH 7.0~7.2。

种子培养基(g/L):甘油 10,蛋白胨 10,NaCl 5;pH 7.2~7.4。

发酵培养基(g/L):甘油 10.5,K2HPO4 0.4,蛋白胨 20,酵母提取物 25;pH7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件 种子培养:按照 108 个/mL 的接种量吸取菌体溶液于 100 mL 种子培养基中,37 ℃,200 r/min 摇床培养36 h。

摇瓶发酵培养:将 5 mL 种子液接入含 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,37 °C,200 r/min 摇床培养 80 h。

5 L 发酵罐小试发酵:种子液培养 24 h 后以10%体积分数的接种量倒入发酵罐中,装液量为 2 L,控制通气量为 1.0~2.0 vvm,200 r/min 37 °C 下发酵 80 h。每间隔 8 h 测定发酵过程中各项生化指标,包括培养基中残余甘油量、菌体生物量、pH 变化和维生素 K_2 含量等。

1.2.2 *menA* 过表达菌株的构建 以纳豆芽孢杆菌全基因组为模板,PCR 扩增得到 *menA* 基因片段,设计引物序列如下:

F 5′-CGGGGTACCATGGGGCAGATCCT TTGGCAGTTAACCCG-3′ KpnI

R 5′-CCGGAATTC TTATCGGAAATAG CTGATCAATAATCC -3′ EcoRI

扩增得到的 PCR 产物与质粒 pHY-P43 连接,得到重组质粒 pHY-P43/*menA*。酶切连接后获得含有 *menA* 基因的重组表达质粒。参照经典的芽孢杆菌转化法(即 spizizen 转化法)[23],上述构建好的重组质粒经酶切验证正确后,转化到 *B. subtilis natto* 菌株中,挑取阳性克隆。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定 取一定量发酵液于 8 000 r/min 下离心10 min,下层沉淀用水洗涤 2~3 次,105 °C烘至恒重后称重。

1.3.2 甘油含量的测定[24] 不同比色管中分别放置不同浓度的甘油标准品溶液各 1 mL,然后分别加入 1 mL 0.015 mol/L 高碘酸钠溶液,混匀后室温放置 10 min,然后加入 2 mL 0.1 g/dL L-鼠李糖溶液,再分别加入 4 mL Nash 试剂,53 °C 水浴中加热 15 min 后于 412 nm 处测其吸光度。以甘油不同浓度为横坐标,吸光值 OD 为纵坐标,作甘油浓度对 OD 的标准曲线。8 000 r/min 离心发酵后的培养基 5 min,上清液稀释至适当的浓度,按照甘油标品检测方法,利用标准曲线计算发酵液中甘油的含量。

1.3.3 维生素 K_2 提取及检测 吸取 10 mL 纳豆芽孢杆菌发酵液,并加入异丙醇和正己烷的混合液(1:2:4,体积比),摇床 220 r/min 震荡 30 min 后静置分层,取上清液旋蒸,记录产物的质量并用异丙醇将其洗出,定容到 10 mL 的棕色容量瓶中。高效液相色谱进行维生素 K_2 的定量检测。液相色谱工作条件[14]:色谱柱:Brava-BDS C18 (250 mm×4.6 mm,5 μm) 柱;流动相:甲醇:二氯甲烷=9:1;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:248 nm。

1.3.4 动力学参数计算 利用 Origin 软件对菌体生长、产物合成数据进行插值计算(时间步长为 0.1 h),拟合得到不同 pH 下比生长速率 μ、维生素 K_2 比合成速率 q、菌体得率系数 $Y_{x/s}$、以菌体细胞为基准的产物得率系数 $Y_{p/x}$、生物量生成速率 Q_x、产物比生成速率 Q_P。计算公式分别为:

$$\mu=\frac{1}{X}\frac{dx}{dt} \quad (1)$$

$$q=\frac{1}{X}\frac{dp}{dt} \quad (2)$$

$$Y_{x/s}=-\frac{dx}{ds} \quad (3)$$

$$Y_{p/s}=-\frac{dp}{dt} \quad (4)$$

$$Q_x=\frac{dx}{dt} \quad (5)$$

$$Q_p=\frac{dp}{dt} \quad (6)$$

其中,x 为菌体质量浓度 (g/L);p 为维生素 K_2 质量浓度(mg/L);s 为发酵液中残留甘油质量浓度(g/L);

t 为时间(h)。

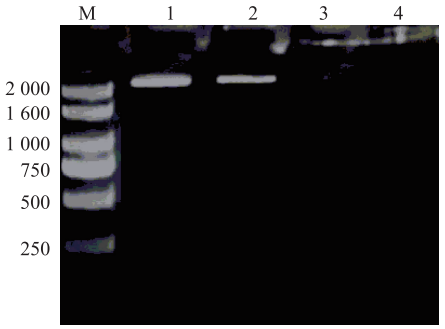
2 结果与分析

2.1 *menA* 过表达菌株的构建及验证

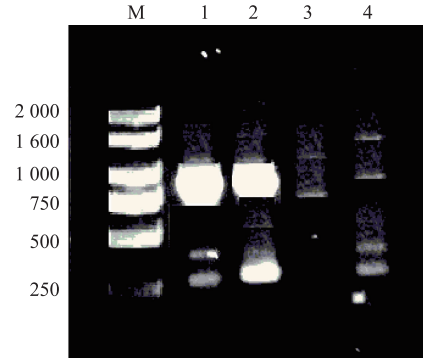
以提取得到的纳豆芽孢杆菌全基因组（图 2(a)）为模板，通过 PCR 扩增获得 *menA* 片段(图 2(b))，与 pHY-P43 质粒连接，得到重组质粒 pHY-P43/*menA*。重组质粒转入纳豆芽孢杆菌后，挑取阳性克隆并提取其中的重组质粒，KpnI 和 EcoRI 双酶切，酶切后电泳图如图 2(c)。重组质粒的单酶切产物约 6 000 bp，双酶切产物中大片段与 pHY-P43 质粒的双酶切产物碱基对数相近，在 5 100 bp 左右；小片段约 885 bp，与 *menA* 基因碱基对数相仿。由此我们认为 pHY-P43-*menA* 重组质粒构建成功。重组质粒 pHY-P43-*menA* 经上海生工测序，测序报告中 *menA* 序列与 NCBI 数据库中 *menA* 基因序列比对结果 100%相同，再次验证了 *menA* 基因在构建过程中没有发生突变。Western blot 验证带有空载体纳豆芽孢杆菌、原始菌以及含 pHY-P43-*menA* 重组质粒菌株中 MenA 蛋白表达情况，从图 2(d)中可以清晰看出含 pHY-P43-*menA* 重组质粒菌株中 MenA 表达量明显高于原始菌和只转入空载体的纳豆芽孢杆菌。含氨苄青霉素抗性的 LB 培养基平板上筛选含 pHY-P43-*menA* 重组质粒的阳性菌株，划线转接 3 次阳性单菌落，均能提取得到重组质粒 pHY-P43-*menA*，说明该菌株可用于下一步发酵。

2.2 纳豆芽孢杆菌产维生素 K_2 分批发酵过程

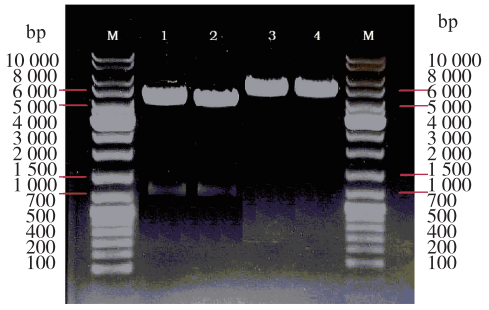
通过 5 L 发酵罐小试，原始菌和 *menA* 基因过表达菌株均于 8 h 进入对数生长期迅速生长，40 h 时进行稳定生长期(图 3)。2 株菌均在 40 h 开始在体内大量累积维生素 K_2，72 h 左右其质量浓度趋于稳定。说明该次级代谢物与其结构类似物辅酶 Q10 相似，不属于生长耦联型[25]。*menA* 过表达菌株在合成维生素 K_2 的过程中，菌体生成、底物(甘油)消耗、产物(维生素 K_2)合成均与原始菌呈现相似的趋势，说明 *menA* 基因的过量表达并没有对菌体生理特性造成影响。虽然 *menA* 基因过表达菌株的生物量与较原始菌相比略有下降((6.84±0.28) g/L vs(7.86±0.31) g/L)，但维生素 K_2 合成量却是原始菌的 1.51 倍((38.07±1.81) mg/L vs (25.21±0.81) mg/L)，说明 *menA* 的过量表达对提高纳豆芽孢杆菌体内侧链底物 DPP 与主链底物 1,4-二羟基-2-萘甲酸(DHNA) 结合能



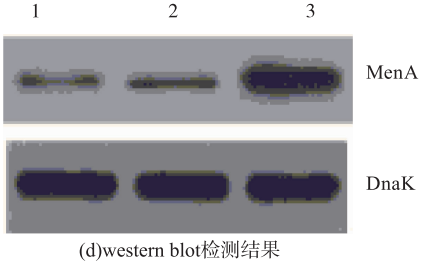
(a)基因组DNA电泳图



(b)PCR产物电泳图



(c)双酶切产物电泳图



(d)western blot检测结果

M 为核酸 marker；(a)(b) 中 1、2 为待测样，3、4 为阴性对照；(c)中 1、2 为双酶切产物，3、4 为单酶切产物；(d)中 1 为空质粒转入纳豆芽孢杆菌，2 为原始菌，3 为 menA 过表达菌株。

图 2 基因组 DNA、PCR 产物、双酶切产物电泳图以及 western blot 检测结果

Fig. 2 The electrophoresis results of genomic DNA, PCR product, restriction enzyme digestion and result of western blot.

力，促进维生素 K_2 的代谢合成具有非常重要的意义。Kong 等同样发现 *menA* 过表达能将大肠杆菌合成维生素 K_2 的能力提高 2 倍，远远高于单独过表达 *men* 家族的其它基因[22]。并且，作者前期的研究发现在黄杆菌中 4-羟苯甲酸-聚异戊二烯转移酶（UbiA）某些氨基酸位点的突变会导致 MenA 蛋白表达量的增加，而 MenA 蛋白表达量的增加最终能提高维生素 K_2 的合成量[26]。因此，接下来我们针对 *menA* 过表达菌株，对其发酵过程进行研究，以期进一步提高维生素 K_2 的产量。

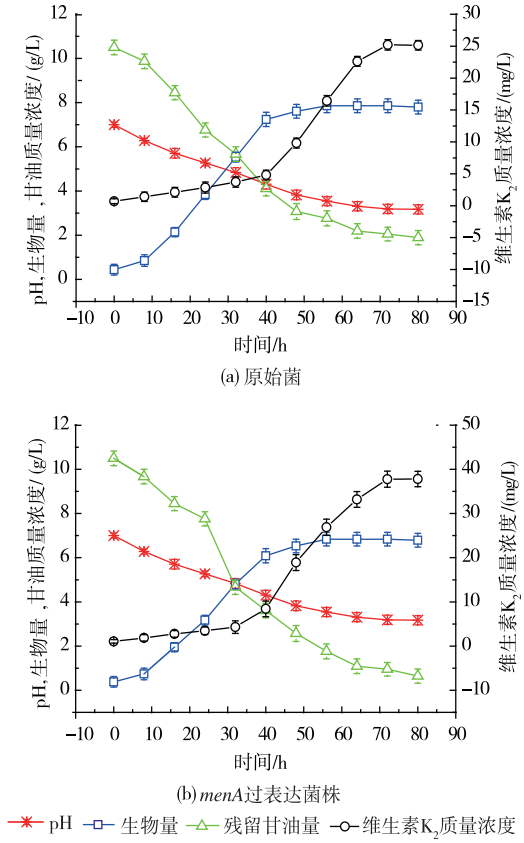
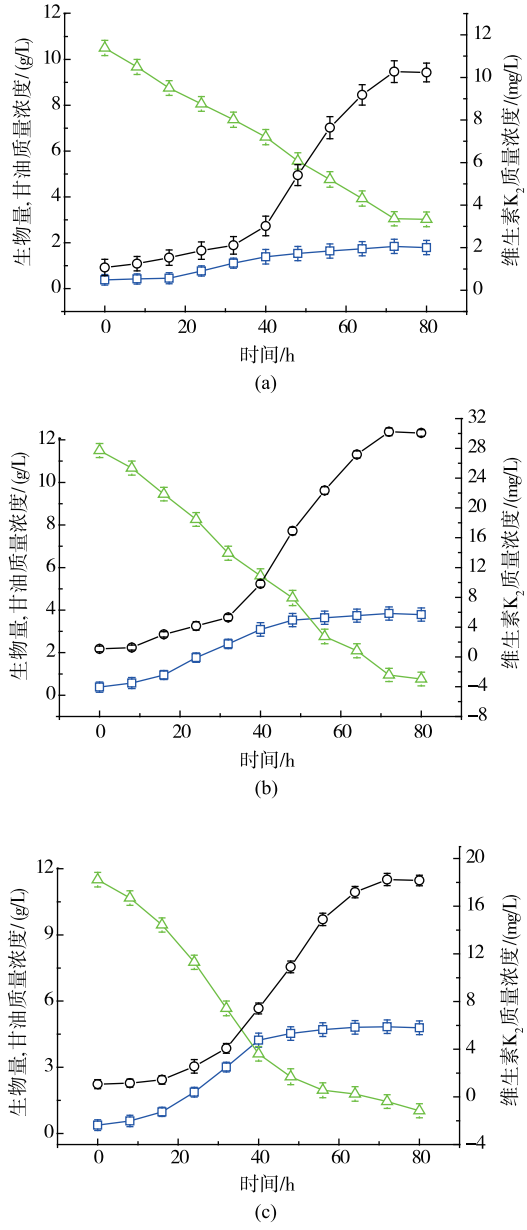


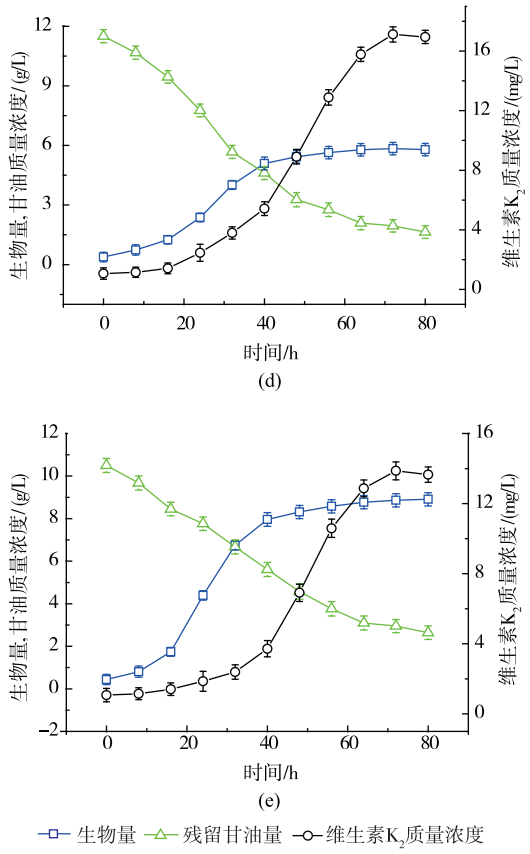
图 3　原始菌和 *menA* 过表达菌株产维生素 K_2 分批发酵过程曲线

Fig. 3　Batch fermentation time course of vitamin K_2 production by original and *menA* over-expression strain of *Bacillus subtilis natto*

2.3　不同 pH 下过表达菌产维生素 K_2 发酵过程曲线及动力学参数比较

整个发酵过程中培养基 pH 值在持续下降，而菌体生长和次级代谢产物生成的最适 pH 值往往不同，见图 3(a)和 3(b)。因此，作者考察了在分批发酵过程中恒定发酵液的 pH，分别恒定为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0，得到的发酵过程曲线见图 4。可以看出，不同 pH 下 *menA* 基因过表达菌株与原始菌在菌体生长与维生素 K_2 合成曲线上的趋势基本对应相同。在 pH 为 7.0 时生物量相对较高，为（8.91±0.31）g/L。pH 为 6.0 时次之，并且生物量随着 pH 值的下降，也在不断降低。说明培养基的酸性越大越不利于菌体生长。然而，与生物量的变化趋势不同，维生素 K_2 合成量随着 pH 值的不断下降，呈现出先上升后下降的趋势。维生素 K_2 合成量最高值（30.23±0.44）mg/L 出现在 pH 值为 4.0 时。也就是说，虽然 pH 4.0 不能保证最大的菌体生成量，但最有利于维生素 K_2 合成。由于是胞内产物，而相对较少的生物量也限制





(a)(b)(c)(d)和(e)的 pH 值分别为 3、4、5、6 和 7

图 4　不同恒定 pH 条件下维生素 K_2 发酵过程曲线

Fig. 4　Time courses of vitamin K_2 production by *Bacillus subtilis natto* at various pH value

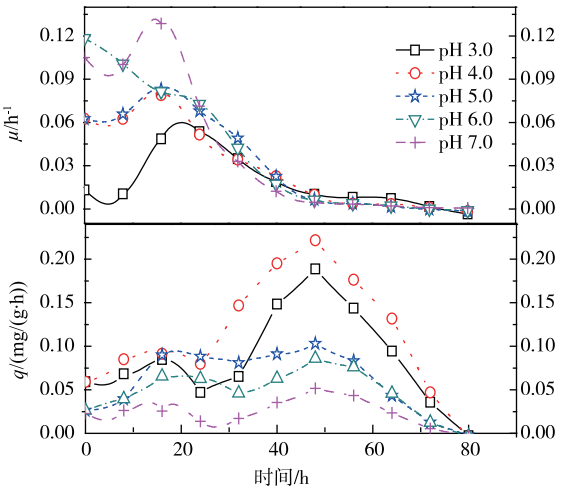


图 5　不同恒定 pH 值下纳豆芽孢杆菌产维生素 K_2 的动力学参数比较

Fig. 5　Comparison of kinetic parameters in vitamin K_2 production by *Bacillus subtilis natto* at various constant pH value

了维生素 K_2 的大量合成。这说明单一 pH 不能同时保证最大菌体生长和次级代谢产物得率。

图 5 和表 1 列出了 pH 为 3.0~7.0 时的发酵过程动力学参数。通过比较可以发现，比生长速率 μ 和维生素 K_2 比合成速率 q 在不同 pH 下的变化趋势相似。不同 pH 下 μ 都在发酵前期(24 h)达到最大值,而 q 的最大值出现在发酵后期(48 h)。原因可能是发酵前期主要用于合成菌体和初级代谢产物，当二者达到一定值后,菌体以前期积累的初级代谢产物为前体,启动合成次级代谢物。与其它 pH 值相比,当 pH 为 7.0 时,μ_{max}(0.129 h^{-1})最高。生物量生成速率 Q_x 同样在 pH 为 7.0 时数值最高，为 0.11 g/L·h。菌体进入稳定期的时间为 40 h，说明在发酵前期(40 h)控制 pH 在 7.0 有利于菌体充分生长。相较于 pH7.0,pH 为 4.0 时菌体的比生长速率 μ_{max} 和生物量生成速率 Q_x 均较低,分别为 0.079 h^{-1} 和 0.05 g/L·h，但是 q 在整个发酵过程中都较高,且增加幅度随着时间的延长,也在逐渐增大,增幅明显高于其它 pH 下的对应值,在 48 h 达到最大值 0.222 mg/g·h。这说明 pH 为 4.0 虽然不利于菌体生长,但却促进了维生素 K_2 的生成。以上结果表明,发酵过程中设定单一 pH,不能使菌体生长和产物合成都能达到最理想状态。

2.4　两阶段 pH 控制策略强化纳豆芽孢杆菌发酵产维生素 K_2

为保证菌体在充分生长的同时提高维生素 K_2 合成量，从上述分析中提出一种两阶段 pH 控制策略：在发酵前期 0~40 h 控制 pH 7.0，在发酵后期 40~80 h 控制 pH 恒定为 4.0 进行分批发酵。由图 6 和表 2 可知,在发酵前期菌体生长速率较 pH 自然状态下明显提高,最大生物量达到了(11.46±0.67) g/L,比 *menA* 过表达菌 pH 自然状态下的最大生物量提高了 67.54%,比原始菌提高了 45.80%。值得一提的是,当经过过表达 *menA* 基因,并采用了两阶段 pH 控制后,维生素 K_2 的产量有了大幅度提高,分别是原始菌和过表达菌自然状态下的 2.6 和 1.7 倍。说明在此策控制策略下，不仅提高了菌体生物量,还提高了维生素 K_2 产量，为大规模生产维生素 K_2 提供了基础条件。李珊等[27]发现两阶段 pH 控制对于哈茨木霉合成 β-1,3-葡聚糖内切酶同样具有非常明显的促进作用,说明该策略在提高特定发酵产品总体产量方面具有一定的适用性。

表 1　不同 pH 下维生素 K_2 分批发酵过程动力学参数比较

Table 1　Comparison of fermentation kinetic parameters at various pH value

pH	X_{max}/(g/L)	μ_{max}/h^{-1}	Q_x/(g/L·h)	$Y_{x/s}$/(g/g)	P_{max}/(mg/L)	Q_P/(mg/L·h)	$Y_{P/x}$/(mg/g)	q_{max}/(mg/g·h)
3.0	1.84±0.31	0.054	0.04	0.24	10.23±0.44	0.13	5.72	0.189
4.0	3.83±0.29	0.079	0.05	0.35	30.23±0.43	0.38	7.98	0.222
5.0	4.84±0.25	0.083	0.06	0.46	18.24±0.51	0.23	3.79	0.103
6.0	5.84±0.28	0.118	0.07	0.59	17.12±0.32	0.21	2.93	0.086
7.0	8.91±0.42	0.129	0.11	1.13	13.87±0.25	0.17	1.53	0.052

表 2　不同发酵过程下维生素 K_2 发酵动力学参数比较

Table 2　Comparison of fermentation kinetic parameters at various fermentation process

pH	X_{max}/(g/L)	Q_x/(g/L·h)	P_{max}/(mg/L)	Q_P/(mg/L·h)
原始菌自然状态	7.86±0.31	0.10	25.21±0.81	0.31
menA 过表达菌自然状态	6.84±0.31	0.09	37.81±1.74	0.47
menA 过表达菌两阶段控制	11.46±0.67	0.14	63.60±1.81	0.80
提高百分率/%(较原始菌)	45.80	40.00	152.28	158.06
提高百分率/%(较 *menA* 过表达菌自然状态)	67.54	66.67	68.21	70.21

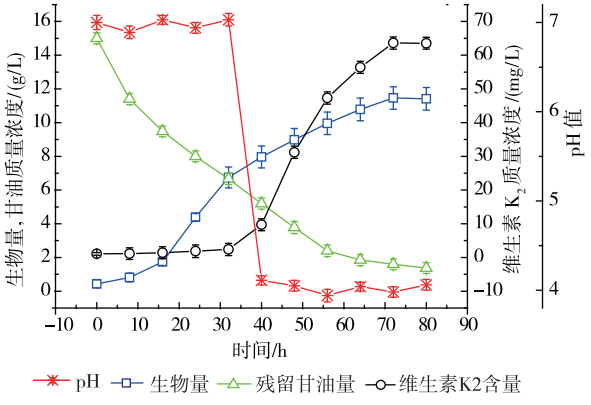


图 6　两阶段 pH 控制 *Bacillus subtilis natto* 产维生素 K_2

Fig. 6　Time course of vitamin K_2 production by *Bacillus subtilis natto* using two-stage pH control strategy

3 结　语

过量表达 *menA* 基因能使 *Bacillus subtilis natto* 维生素 K_2 合成量提高 51%。发酵过程中最适菌体生长和维生素 K_2 合成 pH 分别为 7.0 和 4.0。作者采用两阶段 pH 控制策略，将发酵前期 0~40 h 的 pH 控制为 7.0，确保得到能充分合成维生素 K_2 的菌体量。在发酵后期 40~80 h 控制 pH 为 4.0，确保在得到最大菌体生物量的同时最大程度合成维生素 K_2。采用 *menA* 过表达和两阶段 pH 控制，菌体生物量和维生素 K_2 的产量分别达到了(11.46±0.67) g/L 和 (63.60±1.81) mg/L，分别是原始菌分批发酵 pH 自然状态下的 1.5 倍和 2.6 倍。

参考文献：

[1] KANEKI M，HEDGES S J，HOSOI T，et al. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K_2：Possible implications for hip-fracture risk[J]. **Nutrition**，2001，(17)：315-321.

[2] SHEARER M J，SMITH C B. The UK food data-base for vitamin K and why we need it[J]. **Food Chemistry**，2000，68(2)：213-218.

[3] BHALERAO S，CLANDININ T R. Vitamin K_2 takes charge[J]. **Science**，2012，336：1241-1242.

[4] VOS M，ESPOSITO G，EDIRISINGHE J N，et al. Vitamin K_2 is a mitochondrial electron carrier that rescues Pink1 deficiency [J]. **Science**，2012，336：1306-1310.

[5] NAKAGAWA K，HIROTA Y，SAWADA N，et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme[J]. **Nature**，2010，468：117-121.

[6] YOSHIKI T，HISATAKA T. Extracellular production of menaquinone-4 by a mutant of *Flavobacterium* sp. 238-7 with a detergent-supplemented culture[J]. **J Ferment Bioeng**，1989，67(2)：102-106.

[7] HISATAKA T, TAKASHI S, CHIRANUN D, et al. Menaquinone-4 production by a sulfonamide-resistant mutant of *flavobacterium* sp. 238-7[J]. **Agric Biol Chem**, 1989, 53(11): 3017-3023.

[8] HISATAKA T, TAKASHI S, YOSHIKI T. Selective release of menaquinone-4 from cells of a mutant of *flavobacterium* sp. 238-7 with a detergent[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1995, 59(6): 1137-1138.

[9] TAN M, LIU H, LI Z M, et al. Optimization medium composition for vitamin K_2 by *Flavobacterium* sp. using response surface methodology and addition of *Arachis hypogaea*[J]. **Braz Arch Biol Technol**, 2016, 59: 1-13.

[10] SATO T, YAMADA Y, OHTANI Y, et al. Efficient production of menaquinone (vitamin K_2) by a menadione-resistant mutant of *Bacillus subtilis*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2001, (26): 115-120.

[11] SATO T, YAMADA Y, OHTANI Y, et al. Production of menaquinone (vitamin K_2)-7 by *Bacillus subtilis*[J]. **J Biosci Bioeng**, 2001, 91(1): 16-20.

[12] BERENJIAN A, MAHANAMA R, TALBOT A, et al. Efficient media for high menaquinone-7 production: response surface methodology approach[J]. **New Biotechnology**, 2011, 28(6): 665-672.

[13] BERENJIAN A, MAHANAMA R, TALBOT A, et al. Advances in menaquinone-7 production by *Bacillus subtilis natto*: fed-batch glycerol addition[J]. **Am J Biochem Biotech**, 2012, 8 (2): 105-110.

[14] BERENJIAN A, CHAN N L C, MAHANAMA R, et al. Effect of biofilm formation by Bacillus subtilis natto on menaquinone-7 biosynthesis[J]. **Mol Biotechnol**, 2013, 54(2): 371-378.

[15] BERENJIAN A, MAHANAMA R, TALBOT A, et al. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of menaquinone-7[J]. **Appl Biochem Biotech**, 2014, 11: 1347-1357.

[16] SONG J Y, LIU H X, WANG L, et al. Enhanced production of vitamin K_2 from *Bacillus subtilis* (*natto*) by mutation and optimization of the fermentation medium [J]. **Braz Arch Biol Technol**, 2014, 57(4): 606-612.

[17] BERENJIAN A, MAHANAMA R, TALBOT A, et al. Designing of an intensification process for biosynthesis and recovery of menaquinone-7[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2014, 172: 1347-1357.

[18] EBRAHIMINEZHAD A, VARMA V, YANG S Y, et al. Magnetic immobilization of *Bacillus subtilis natto* cells for menaquinone-7 fermentation[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2016, 100: 173-180.

[19] MAHDINIA E, DEMIRCI A, BERENJIAN A. Production and application of menaquinone-7 (vitamin K_2): a new perspective[J]. **World J Microbiol Biotechnol**, 2017, 33: 2.

[20] BENTLEY R, MEGANATHAN R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria [J]. **Microbiol Rev**, 1982, 46(3): 241-280.

[21] XU Jianzhong, WANG Yingshu, YAN Weiliu, et al. Effects of major enzymes in the biosynthetic pathway of vitamin K_2 on MK-7 production[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2016, 32(11): 248-254. (in Chinese)

[22] KONG M K, LEE P C. Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of *Escherichia coli* as a microbial platform for vitamin K production[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2011, 108(8): 1997-2002.

[23] AKAMATSU T, TAGUCHI H. Plasmid transformation of competent *Bacillus subtilis* by lysed protoplast DNA [J]. **J Biosci Bioeng**, 2012, 114: 138e143.

[24] BOK S H, DEMAIN A L. An improved colorimetric assay for polyols[J]. **Anal Biochem**, 1977, 81: 21-27.

[25] GU S B, YAO J M, YUAN Q P, et al. Kinetics of *Agrobacterium tumefaciens* ubiquinone-10 batch production[J]. **Process biochem**, 2006, 41(8): 1908-1912.

[26] LIU Y, DING X M, XUE Z L, et al. Site-directed mutagenesis of UbiA to promote menaquinone biosynthesis in *Elizabethkingia meningoseptica*[J]. **Process biochem**, 2017, 58: 186-192.

[27] LI Shan, ZHAN Xiaobei, ZHENG Zhiyong, et al. Enhancement of β-1, 3-Endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* using two-stage pH and agitation speed control strategy[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(11): 1146-1154. (in Chinese)