

УДК 579.25

Юй Чао¹, Алексей Викторович Лагодич²¹соискатель 5-го года обучения каф. генетики
Белорусского государственного университета²канд. биол. наук, доц., доц. каф. генетики Белорусского государственного университета
Yu Chao¹, Aliaksei Lahodzich²

5th Year Applicant of the Department of Genetics of Belarusian State University

²Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
Associate Professor of the Department of Genetics of Belarusian State University
e-mail: ¹cygoodluck1989@gmail.com; ²LagodichAV@bsu.by**ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ БАКТЕРИЯМИ
BACILLUS SUBTILIS С ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНОМ ШИКИМАТКИНАЗЫ**

В результате выполнения настоящего исследования у штаммов бактерий с инактивированным геном шикиматкиназы *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA была произведена оценка эффективности синтеза шикимовой кислоты в зависимости от условий культивирования и состава питательной среды. В условиях прерывистого культивирования оценен вклад влияния концентраций источника углерода (глюкозы) и концентраций аминокислот на титр шикимовой кислоты в ферментационной среде. Продemonстрировано, что в проанализированном диапазоне концентраций источника углерода биомасса бактерий и выработка шикимовой кислоты прямо пропорциональны внесённому количеству глюкозы. L-Phe, L-Trp и L-Tyr как конечные продукты пути метаболизма шикимовой кислоты при более высокой концентрации могут оказывать ингибирующее действие на продукцию шикимовой кислоты, вероятно, по принципу ретроингибирования. Эти результаты позволили подобрать условия для синтеза шикимовой кислоты (2 % глюкозы и 12,5 мкг/мл аминокислот), позволяющие увеличить ее содержание в культуральной среде до 808 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA и до 1385 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 5434p4SA.

Ключевые слова: шикимовая кислота, шикиматный путь, оптимизация состава ферментационной среды, концентрация аминокислот, концентрация глюкозы, ретроингибирование.

**Features of Shikimic Acid Synthesis by *B. Subtilis* Strains
with Inactive Gene of Shikimate Kinase**

In this work, the effectiveness of the synthesis of shikimic acid was evaluated in bacterial strains with the inactivated shikimate kinase gene *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA, depending on the cultivation conditions and the composition of the nutrient medium. Through experimental comparison, it is found that within a suitable range, the concentration of carbon source (glucose) is directly proportional to the growth of bacteria and the production of shikimic acid. L-Phe, L-Trp and L-Tyr are the terminal products of the shikimic acid metabolism pathway, which at a higher concentration can feedback inhibit the production of shikimic acid. These results demonstrate that flask cultivations of the derivative strains with inactivated shikimate kinase gene *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA in the optimized fermentation (2 % glucose and 12,5 µg/ml amino acid) respectively leads to the maximal accumulation of SA increased to 808 µg/ml and 1385 µg/ml.

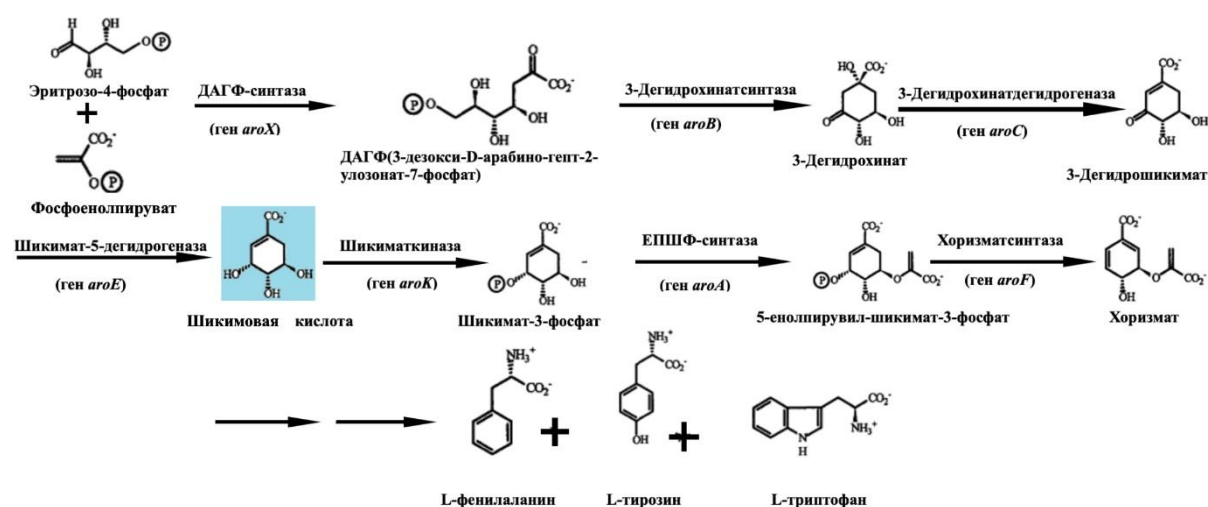
Key words: shikimic acid, shikimic acid metabolic pathway, optimization of the composition of the fermentation medium, amino acid concentration, glucose concentration, feedback inhibition.

Введение

Шикимовая кислота благодаря хиральным свойствам является ключевым элементом при синтезе ингибитора нейраминидазы, используемого в качестве основного компонента противовирусного препарата Осельтамивир [1]. Она является промежуточным продуктом пути биосинтеза ароматических аминокислот (L-Phe, L-Trp и L-Tyr) у микроорганизмов и растений, также у многих растений участвует в синтезе алкалоидов [2; 3].

Основным источником получения шикимовой кислоты являются химический синтез и экстракция из плодов бадьяна настоящего (*Illicium verum* Hook.f.), но эти процессы дороги и сложны в технологическом плане и не всегда обеспечивают высокий выход целевого продукта [4]. Во время пандемии свиного гриппа именно высокая стоимость и нехватка исходного сырья являлись основными причинами недостаточного

количества требуемых лекарственных препаратов [5; 6]. В качестве альтернативного источника получения шикимовой кислоты все чаще рассматриваются процессы, основанные на микробном синтезе, и в последние годы им уделяют все большее внимания. Подходы по модификации шикиматного пути были описаны в [7–14], и они оказались весьма рентабельны при использовании модифицированных штаммов бактерий *E. coli* и позволили существенно повысить выход целевого продукта [9–12]. Однако путь синтеза шикимовой кислоты хорошо исследован не только у *E. coli*, и соответственно, такие знания могут быть использованы для успешной коррекции метаболических путей и биосинтеза целевых продуктов и у других организмов [13; 14]. Для получения продуцентов шикимовой кислоты можно использовать перспективные в биотехнологическом плане бактерии *B. subtilis*, которые обладают статусом GRAS (Generally Recognized As Safe) [15], что в дальнейшем может упростит процедуру выделения и очистки целевых продуктов.



Примечание – На рисунке указаны гены, кодирующие ферменты шикиматного пути [10].

Рисунок 1 – Шикиматный путь у *B. subtilis*

Общая схема шикиматного пути у *B. subtilis* представлена на рисунке 1 [10]. Начинается путь с образования 3-деокси-D-арабиногептулозонат-7-фосфата (ДАГФ), которое катализируется продуктом гена *aroA* – ферментом ДАГФ-синтазой. Образующийся ДАГФ в результате трех ферментативных реакций превращается в шикимовую кислоту. В свою очередь, шикимовая кислота далее под действием продукта гена *aroK* – фермента шикиматкиназы – превращается в шикимат-3-фосфат. Далее шикимат-3-фосфат превращается в хоризмат и через ряд реакций используется для синтеза ароматических аминокислот и других продуктов ароматического пути.

Материалы и методы исследований

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использовали штаммы *B. subtilis*: 168wt (прототроф, ревертант, дикий фенотип) и ВКПМ 5434 (характеризующийся повышенным уровнем синтеза триптофана) и их производные, полученные путем гомологичной рекомбинации, приведшей к инаktivации гена шикиматкиназы 168wt21CSA и 5434p4SA [16].

Параметры культивирования в ферментационной среде и пробоподготовка для ВЭЖХ. Бактериальные штаммы культивировали в бульоне LB при 37 °C и 200 об/мин. в течение 14–16 ч. В качестве инокулята использовали культуральный

бульон. Вносили 10 %–20 % об. инокулята в 5–50 мл ферментативного бульона (минимальная среда Spizizen: 0,5 %–2 % глюкозы; 1,4 % K_2HPO_4 ; 0,6 % KH_2PO_4 ; 0,072 % безводного $MgSO_4$; 0,2 % $(NH_4)_2SO_4$; 0,19 % цитрата натрия-2H₂O [17] с 12,5–50 мкг/мл тирозина, 12,5 мкг/мл–50 мкг/мл триптофана, 12,5 мкг/мл–50 мкг/мл фенилаланина и 0,5 %–2 % глюкозы). После внесения инокулята бактерии культивировали при 37 °С, 200 об/мин. в течение 72–96 ч.

По истечении 72–96 ч. культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин. в течение 15 мин. на центрифуге *Thermo Scientific® Heraeus Fresco*. Супернатант отбирали, определяли его объем и использовали для последующего определения содержания шикимовой кислоты; полученную бактериальную суспензию использовали для прямого определения количества биомассы. Отобранный супернатант пропускали через фильтр 0,45 мкм *CHROMAFIL®Xtra PES-45/25*. Для ВЭЖХ объем инъекции составлял 5 мкл, инъекции проводили трижды.

Определение оптической плотности бактериальной культуры проводили при длине волны 600 нм против стерильной среды культивирования. Показания прибора для каждой пробы снимали три раза. Измерения осуществляли на спектрофотометре Carry 60 (*Agilent Technologies*), используя программу Cary Win UV / Simple Reads.

Подготовка стандарта шикимовой кислоты для ВЭЖХ-анализа. Образец стандарта шикимовой кислоты растворяли в метаноле до концентрации 2 мг/мл. Полученный раствор отфильтровывали с помощью шприцевого бактериального фильтра 0,45 мкм *CHROMAFIL®Xtra PES-45/25*. Для работы использовали трехкратные инъекции по 5 мкл, согласно [18; 19].

Количественный анализ шикимовой кислоты методом ВЭЖХ. Рост клеток контролировали путем измерения оптической плотности при длине волны 600 нм (OP_{600}) с помощью УФ спектрофотометра Carry 60, используя программу Cary Win UV / Simple Reads.

Сырую биомассу клеток, полученных в ферментационной среде, определяли как прямым методом (осаждение, промывка, взвешивание), так и с использованием калибровочной кривой зависимости величины OP_{600} от биомассы и количества клеток.

Супернатанты анализировали с помощью ВЭЖХ на хроматографе LCMS-2020 (*Shimadzu*, Япония) с использованием колонки Allure C18 (4,6 мм × 150 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) и детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M20A (*Shimadzu*, Япония). Разделение веществ проводили градиентным элюированием при температуре колонки 40 °С и скорости потока 0,5 мл/мин. на протяжении 20 мин.

На основании анализа собственных результатов [16] и протоколов, представленных в работах [10; 18; 19], были изменены условия градиента мобильной фазы. Исходные и модифицированные условия представлены в таблицах 1 и 2 соответственно, что позволило повысить чувствительность метода. Обнаружение и измерение концентрации шикимовой кислоты проводили при длине волны 210 нм с помощью детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M20A, как описано в работах [10; 16; 18; 19].

Таблица 1 – Условия хроматографического разделения, %

Время, мин	H ₂ O	Метанол	1 %-ная муравьиная кислота
0–12	88–80	2–10	10
12–13	80–0	10–90	10
13–15	0	90	10
15–20	88	2	10

Примечание – стандарт шикимовой кислоты элюировался на 2,9 минуте [10; 16; 18; 19].

Таблица 2 – Модифицированные условия хроматографического разделения, %

Время, мин.	H ₂ O	Метанол	1 %-ная муравьиная кислота
0–12	97–92	2–7	1
12–13	92–4	7–95	1
13–15	4	95	1
15–20	97	2	1

Примечание – стандарт шикимовой кислоты элюировался на 2,7 минуте.

Результаты и их обсуждение

Оценка влияния концентрации источника углерода (глюкозы) на выход шикимовой кислоты. В серии экспериментов мы определяли эффективную концентрацию глюкозы как предпочтительного источника углерода и энергии для синтеза шикимовой кислоты мутагенизированными штаммами *B. subtilis* 168wt21CSA и 5434p4SA.

Вариациям подвергались исходная концентрация глюкозы и ароматических кислот в ферментационной среде, объемная доля инокулята и время культивирования. На рисунках 2–6 отражена информация об эффективности накопления шикимовой кислоты в культуральной жидкости в зависимости от состава среды и параметров культивирования.

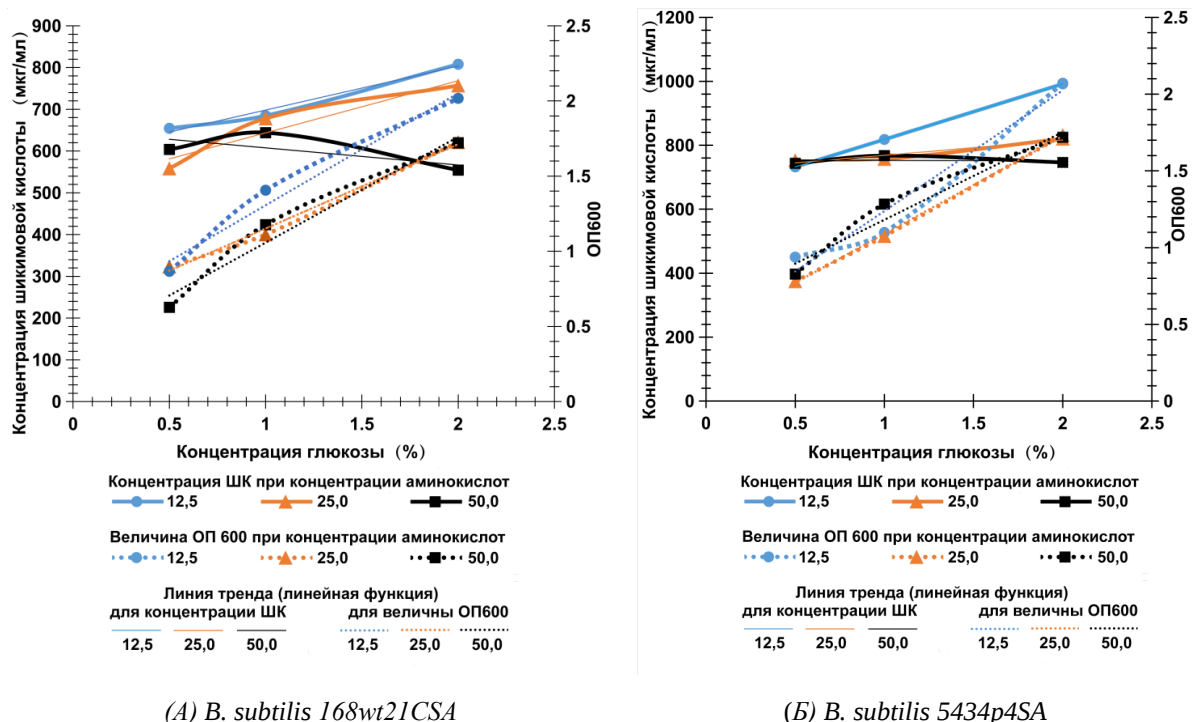


Рисунок 2 – Влияние концентрации источника углерода на рост бактерий и выход шикимовой кислоты у штаммов (А) *B. subtilis* 168wt21CSA и (Б) *B. subtilis* 5434p4SA

(объемная доля инокулята 10 %; 72 ч.; 200 об/мин., $\varphi = 20$ мм 37 °С)

Как видно из линий тренда, представленных на рисунке 2, для штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и 5434p4SA при следующих условиях культивирования (37 °С, 10 % инокулята, ферментация 72 ч) характерна прямая линейная зависимость оптической плотности культуры от концентрации глюкозы. То есть при одинаковых параметрах концентраций аминокислот в ферментационной среде биомасса бактерий (прирост оптичес-

ской плотности) увеличивалась с увеличением концентрации глюкозы и прямо пропорциональна концентрации глюкозы в ферментационной среде в пределах изучаемого диапазона (0,5–2,0 %). Таким образом, при концентрации глюкозы 2,0 % клетки достигли максимальной оптической плотности (рисунок 2).

При условии концентрации аминокислот 12,5–25 мкг/мл в диапазоне концентраций глюкозы 0,5–2,0 %, концентрация шикимата в ферментационной среде увеличивалась по мере увеличения концентрации глюкозы, и была прямо пропорциональна концентрации глюкозы. Однако, согласно данным рисунка 2, при условии начальной концентрации аминокислот в 50 мкг/мл в диапазоне изученных концентраций глюкозы в ферментационной среде оптимальной для выхода шикимовой кислоты является концентрация глюкозы в 1,0 %. При концентрации глюкозы в 1,0 % были достигнуты максимальные значения концентраций шикимата в ферментационной среде; при превышении этого значения выход шикимовой кислоты у штамма *B. subtilis* 168wt21CSA значительно снижался, а у штамма *B. subtilis* 5434p4SA снижался незначительно.

Наблюдаемые для штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA закономерности могут быть объяснены следующим образом: глюкоза является источником углерода, необходимым для роста *B. subtilis*, и достаточное количество источника углерода способствует росту бактерий. Однако при наличии в среде ароматических аминокислот в высоких концентрациях (50 мкг/мл и более) может возникать выраженный эффект ретроингибирования. Штамм *B. subtilis* 5434p4SA является производным от штамма *B. subtilis* ВКПМ5434, обладающего способностью к сверхсинтезу триптофана, и унаследовал от него пониженную чувствительность ДАГФ-синтазы к ретроингибированию продуктами шикиматного пути [16]. Таким образом, регуляторные системы штамма *B. subtilis* 5434p4SA должны быть в меньшей степени подвержены ингибированию продуктами шикиматного пути и обеспечивать больший выход шикимовой кислоты по сравнению с интактной системой регуляции штамма *B. subtilis* 168wt21CSA, что мы и наблюдали на практике. При культивировании изучаемых штаммов в средах с концентрацией глюкозы 1 % и более и высоким содержанием ароматических аминокислот (50 мкг/мл и более) падение показателей накопления шикимовой кислоты в среде культивирования наблюдается для обоих штаммов *B. subtilis* 5434p4SA и *B. subtilis* 168wt21CSA, однако более выражено для штамма 168wt21CSA.

Оценка влияния начального содержания ароматических аминокислот в среде культивирования на эффективность синтеза шикимовой кислоты и ее накопление в культуральной среде. В штаммах *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA ген шикиматкиназы (*aroK*) был инактивирован [16]. Такая инактивация блокирует возможность синтеза трех аминокислот, располагающихся в цепочке метаболических превращений после шикимат-3-фосфата, образуемого под действием шикиматкиназы (рисунок 1). То есть у штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA шикимат не может выступать предшественником для синтеза ароматических аминокислот, и поэтому они были дополнительно введены в среду.

Далее в работе нами было изучено влияние различных концентраций этих аминокислот на эффективность накопления биомассы (контроль по оптической плотности) и накопление шикимата в среде культивирования штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA.

Из линии тренда на рисунках 3(А) и 3(Б) видно: при постоянной концентрации глюкозы с изменением концентрации аминокислот в изучаемом диапазоне 12,5–50 мкг/мл значение оптической плотности клеток *B. subtilis* и продукции шикимовой кислоты уменьшались с увеличением концентрации аминокислот. То есть в этом случае мы наблюдаем обратную зависимость между исходной концентрацией аминокислот в среде культивирования и уровнем синтеза шикимовой кислоты. Также можно отметить,

что при концентрации конечных продуктов метаболического пути – триптофана, фенилаланина и тирозина, равной 50 мкг/мл, – наблюдается эффект ретроингибирования, выражающийся в уменьшении уровня синтеза шикимовой кислоты при наблюдаемой тенденции незначительного снижения биомассы клеток *B. subtilis*.

Так, в ферментационной среде у штамма *B. subtilis* 168wt21CSA (рисунок 3(А)), максимальная оптическая плотность ($ОП_{600} = 2,02$) и титр шикимата (807,96 мкг/мл) были получены при концентрации аминокислот 12,5 мкг/мл.

В ферментационной среде у штамма *B. subtilis* 5434p4SA при концентрации аминокислоты 12,5 мкг/мл (рисунок 3(Б)) накопление биомассы (оптическая плотность) достигали значений $ОП_{600} = 2,07$ при титре шикимата в 992,01 мкг/мл. Повышение концентраций аминокислот выше этого уровня демонстрировало проявление ингибирующего эффекта.

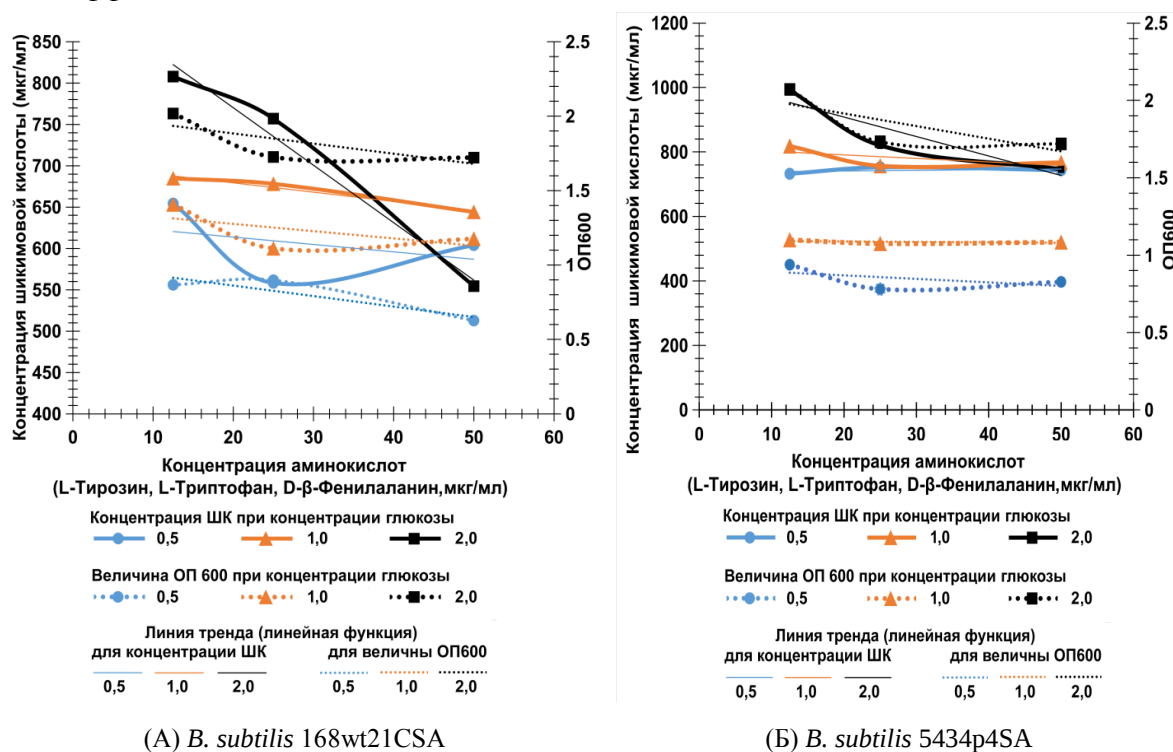


Рисунок 3 – Влияние концентрации аминокислот на рост бактерий и выход шикимовой кислоты у штаммов (А) *B. subtilis* 168wt21CSA и (Б) *B. subtilis* 5434p4SA (объемная доля инокулята 10 %; 72 ч.; 200 об/мин., $\phi = 20$ мм 37 °С)

Таким образом, анализ данных, приведенных на рисунках 3(А) и 3(Б), показывает, что биомасса бактерий и выход шикимовой кислоты обратно пропорциональны концентрации ароматических аминокислот в ферментационной среде. Объяснить наблюдаемое явление можно как проявление ретроингибирования, и наиболее вероятно, что именно такой эффект на ДАГФ-синтазу оказывают высокие концентрации вводимых аминокислот, которые являются более поздними интермедиатами шикиматного пути. Чем выше концентрация в среде поздних метаболитов шикиматного пути (L-тирозина, L-триптофана, D-β-фенилаланина), тем ниже выход шикимовой кислоты.

Основываясь на закономерностях, продемонстрированных на рисунках 2 и 3, можно сделать вывод, что чем выше концентрация глюкозы (в изученном диапазоне 0,5–2,0 %) и меньше концентрация аминокислот (в диапазоне 12,5–50 мкг/мл), тем выше значение оптической плотности культуры и выход шикимовой кислоты. Таким образом, при концентрации глюкозы 2 % и концентрации аминокислот 12,5 мкг/мл значе-

ние оптической плотности и выход шикимовой кислоты у штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и 5434p4SA должны быть наиболее высокими, что мы и наблюдаем. Так, для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA выход шикимовой кислоты составил 807,96 мкг/мл, а для штамма *B. subtilis* 5434p4SA – 992,01 мкг/мл.

Оценка влияния накопления бактериальной массы (эффективность роста, контроль по оптической плотности) на выход шикимовой кислоты. Данные, представленные на рисунках 2 и 3, демонстрируют положительную корреляцию между ростом бактериальной культуры (контроль по ОП₆₀₀) и выходом шикимовой кислоты. Чтобы найти оптимальное время ферментации и достичь цели по оптимизации условий для увеличения выхода шикимовой кислоты, мы культивировали исходные штаммы *B. subtilis* 168wt, ВКПМ 5434 и полученные на их основе производные 168wt21CSA и 5434p4SA в ферментационной среде (минимальная среда Spizizen с концентрацией аминокислот 12,5 мкг/мл и 2,0 % глюкозы) в течение 96 часов. Измерение оптической плотности среды проводили сразу после внесения инокулята и далее через 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 и 96 ч культивирования (рисунок 4).

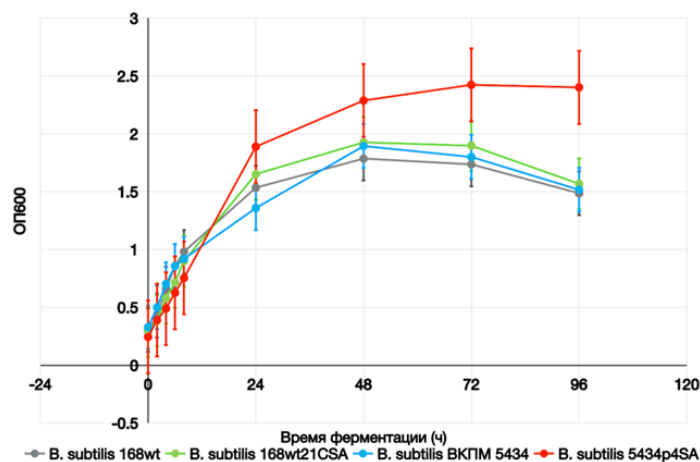
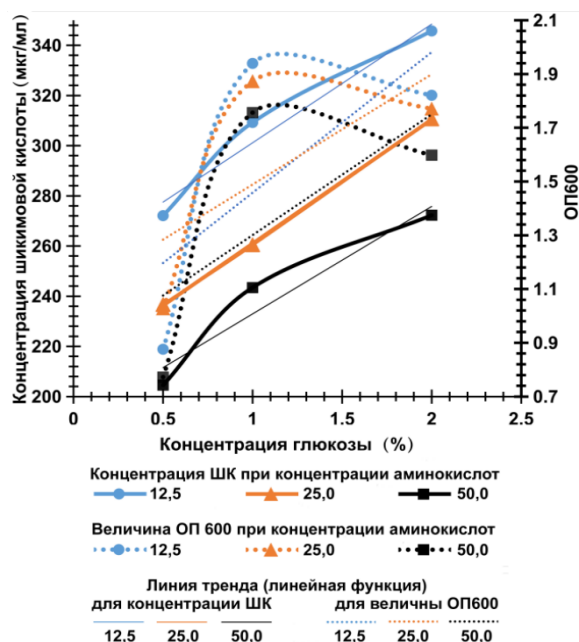


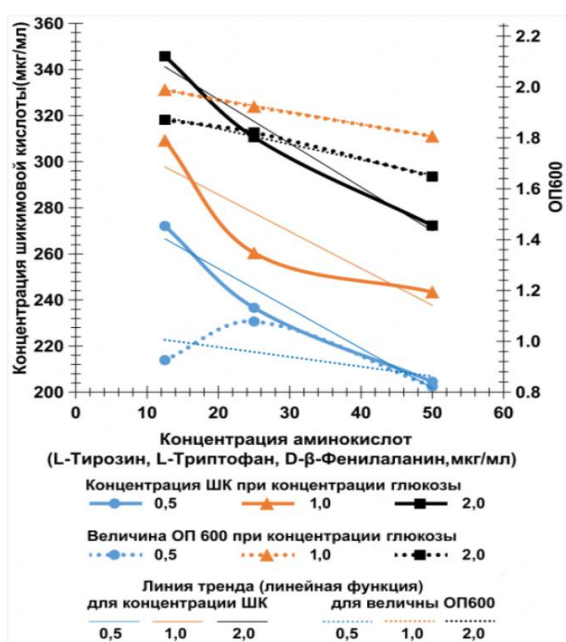
Рисунок 4 – Изменение оптической плотности культуры клеток от времени культивирования (объемная доля инокулята 10 %; 96 ч.; 200 об/мин., φ = 20 мм, 37 °C)

Анализ кривых роста, представленных на рисунке 4, позволил заключить, что для исходных штаммов *B. subtilis* 168wt, ВКПМ 5434 и производного 168wt21CSA характерно достижение наибольших значений оптической плотности после 48 ч культивирования с характерным выходом на плато и последующим снижением вследствие старения культуры. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA характерны несколько иные физиологические особенности, заключающиеся в более продолжительном адаптационном периоде, сменяющемся эффективным ростом. Наибольшие значения оптической плотности и, следовательно, прирост биомассы для этого штамма наблюдали после 72–96 ч культивирования. Следует отметить, что высокий показатель оптической плотности для этого штамма сохранялся и на 5–6-е сут. периодического культивирования, тогда как для других штаммов показатель оптической плотности культуры на этих сроках значительно снижался (данные на рисунке 4 не представлены).

Так как была отмечена положительная корреляция между приростом биомассы и выходом шикимовой кислоты, для следующей серии экспериментов был выбран штамм *B. subtilis* 5434p4SA, как обладающий наилучшими показателями роста в ферментационной среде. В следующей серии экспериментов наряду с оценкой вклада содержания в среде источника углерода и аминокислот на выход шикимовой кислоты оценивался и вклад условий культивирования, а именно количества внесенного инокулята и продолжительность культивирования (рисунки 5 и 6).

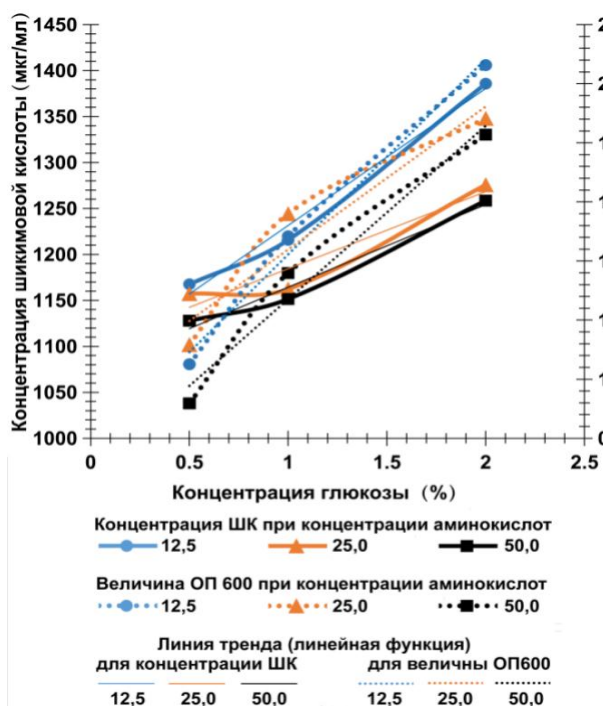


(А) Влияние концентрации источника углерода на рост бактерий и выход шикимовой кислоты

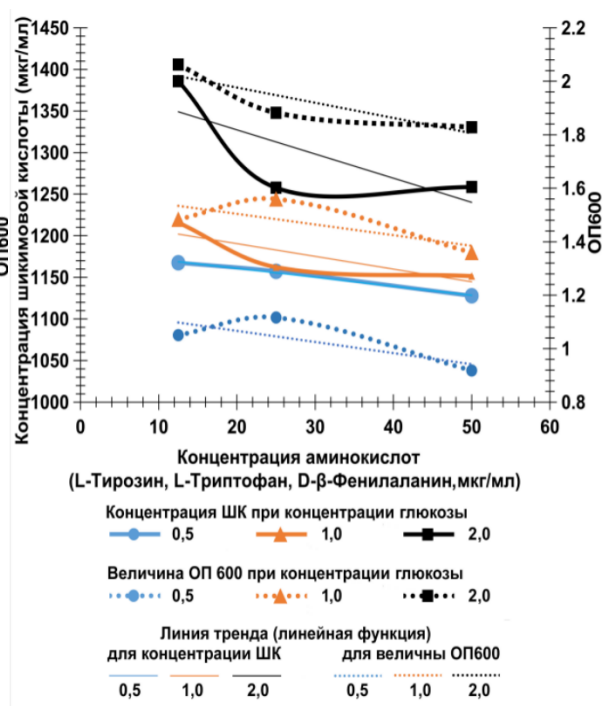


(Б) Влияние концентрации аминокислот на рост бактерий и выход шикимовой кислоты

Рисунок 5 – Зависимость эффективности роста бактерий и накопления шикимовой кислоты в культуральной жидкости от состава ферментационной среды и параметров культивирования штамма *B. subtilis* 5434p4SA (объемная доля инокулята 5 %; 48 ч.; 200 об/мин, $\varphi = 20$ мм, 37 °C)



(А) Влияние концентрации источника углерода на рост бактерий и выход шикимовой кислоты



(Б) Влияние концентрации аминокислот на рост бактерий и выход шикимовой кислоты

Рисунок 6 – Зависимость эффективности роста бактерий и накопления шикимовой кислоты в культуральной жидкости от состава ферментационной среды и параметров культивирования у *B. subtilis* 5434p4SA (Объемная доля инокулята 20 %; 72 ч.; 200 об/мин., $\varphi = 20$ мм, 37 °C)

Как видно из данных, представленных на рисунках 5 и 6, помимо состава среды существенный вклад на выход шикимата оказывает как время культивирования, так и способ получения биомассы в среде культивирования. Так, при использовании небольших количеств инокулята (объемная доля инокулята 5 %; 48 ч.; 200 об/мин., $\varphi = 20$ мм, 37 °C) максимальное значение оптической плотности культуры штамма *B. subtilis* 5434p4SA составило 1,94, однако выход шикимовой кислоты значительно сократился и составил 345,74 мкг/мл. При увеличении количества вносимой биомассы бактерий в среду культивирования (объемная доля инокулята 20 %; 72 ч.; 200 об/мин., $\varphi = 20$ мм, 37 °C) максимальное значение оптической плотности культуры штамма *B. subtilis* 5434p4SA составило 2,02, а выход шикимовой кислоты превысил получаемые ранее значения и составил 1385,78 мкг/мл.

Результаты, представленные на рисунках 5 и 6, свидетельствуют об эффективности предложенных условий культивирования для увеличения выхода шикимовой кислоты. Также можно предположить, что, вероятно, наиболее рациональными будут процессы культивирования, направленные на снижение потребления ресурсов среды для обеспечения ростовых показателей штамма, т. к. последние эксперименты демонстрируют, что эффективность синтеза шикимовой кислоты напрямую зависит от количества внесенной биомассы штамма-продуцента.

Таким образом, в серии экспериментов, направленных на оптимизацию условий культивирования полученного нами штамма *B. subtilis* 5434p4SA – продуцента шикимовой кислоты, нам удалось подобрать условия культивирования, обеспечивающие выход шикимовой кислоты на конкурентоспособном уровне.

В условиях периодического культивирования штамма *B. subtilis* 5434p4SA при соблюдении следующих параметров культивирования: объемная доля инокулята 20 %; периодичность – 72 ч.; 200 об/мин., $\varphi = 20$ мм, 37 °C, концентрация глюкозы – 2 %, ароматических аминокислот – 12,5 мкг/мл – количество шикимовой кислоты, выявляемой в культуральной среде, составляет 1385,79 мкг/мл.

Заключение

В результате выполнения настоящей работы было продемонстрировано, что для штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA с инактивированным геном шикиматкиназы характерен повышенный уровень синтеза шикимовой кислоты, способной накапливаться в культуральной среде. Путем прямого измерения концентрации шикимовой кислоты в среде культивирования осуществлена оценка эффективности использования различных условий культивирования полученных штаммов (продуцентов шикимовой кислоты) и определены оптимальные условия для ее синтеза. Обнаружено, что эффективность синтеза шикимовой кислоты в ферментационной среде находится в прямой зависимости от концентрации глюкозы в среде культивирования и количества внесенной биомассы бактерий и в обратной от концентрации в среде культивирования ароматических аминокислот. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA подобраны условия, позволяющие получить шикимовую кислоту в количестве 1385,79 мкг/мл культуральной среды в условиях периодического культивирования.

Авторы выражают глубокую благодарность Елене Олеговне Корик, доценту кафедры биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета, за неоценимую помощь при проведении анализа методом ВЭЖХ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Jennifer, L. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance / L. Jennifer, B. McKimm // Influenza Other Respir Viruses. – 2013. – P. 25–36.

2. Bradley, D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic / D. Bradley // *Nat Rev Drug Discov.* – 2005. – Vol. 4. – P. 945–946.
3. Liquidambar styraciflua: a renewable source of shikimic acid / L. B. Enrich [et al.] // *Tetrahedron Lett.* – 2008. – Vol. 49. – P. 2503–2505.
4. An interactive study of influential parameters for shikimic acid production using statistical approach, scale up and its inhibitory action on different lipases / G. Rawat [et al.] // *Bioresour Technol.* – 2013. – Vol. 144. – P. 675–679.
5. A natural isolate producing shikimic acid: isolation, identification and culture condition optimization / G. Rawat [et al.] // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2013. – Vol. 169. – P. 2290–2302.
6. Rawat, G. Expanding horizons of shikimic acid: recent progresses in production and its endless frontiers in application and market trends / G. Rawat, P. Tripathi, R. K. Saxena // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97. – P. 4277–4287.
7. Ghosh, S. Production of shikimic acid / S. Ghosh, Y. Chisti, U. C. Banerjee // *Bio-technol. Adv.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1425–1431.
8. Kai, C. Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate pathway in *E. coli* / C. Kai // *Bioresource Technology.* – 2012. – Vol. 119. – P. 141–147.
9. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system / A. Escalante [et al.] // *Microb Cell Fact.* – 2010. – Vol. 9, № 1. – P. 21–33.
10. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains / D. F. Liu [et al.] // *Microbial Cell Factories.* – 2014. – Vol. 13, nr 1. – P. 40–51.
11. Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate pathway in *E. coli* / K. Chen [et al.] // *Bioresour. Technol.* – 2012. – Vol. 119. – P. 141–147.
12. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving shikimate synthesis from glucose / X. Chen [et al.] // *Bioresour Technol.* – 2014. – Vol. 166. – P. 64–71.
13. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid / M. Kramer [et al.] // *Metab. Eng.* – 2003. – Vol. 5. – P. 277–283.
14. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid / D. R. Knop [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – № 123. – P. 10173–10182.
15. US Food and Drug Administration. Carbohydrase and protease enzyme preparations derived from *Bacillus subtilis* or *Bacillus amyloliquefaciens* // *Affirmation of GRAS Status as direct food ingredients.* – 1999. – Vol. 64, nr 78. – P. 19887–18895.
16. Chao, Y. Analysis of the efficiency factors of electro-transformation of *Bacillus subtilis* to inactivate the *aroK* gene by the method of homologous recombination / Y. Chao, A. V. Lahodzich // *Journal of the Belarusian State University. Biology.* – 2021. – № 2. – P. 64–73.
17. Spizizen, J. Transfomtiom of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate / J. Spizizen // *Pathology And Microbiology.* – 1958. – Vol. 44, nr 10. – P. 1072–1078. – DOI: 10.1073/pnas.44.10.1072
18. Extraction and chromatographic determination of shikimic acid in Chinese conifer needles with 1-benzyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid aqueous solutions / F. L. Chen [et al.] // *Journal Of Analytical Methods in Chemistry.* – 2014. – P. 12.
19. Çiğdem, A. Quantification of shikimic acid in the methanolic extracts of three alnus taxons growing in Turkey / A. Çiğdem, E. Ö. Burçin, L. A. Mehmet // *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2016. – Vol. 13, nr 1. – P. 71–76.