

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНАКТИВАЦИИ ШИКИМАТКИНАЗЫ У РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ *BACILLUS SUBTILIS* 168wt21CSA И *B. SUBTILIS* 5434p4SA

ЧАО ЮЙ<sup>1)</sup>, Е. О. КОРИК<sup>1)</sup>, А. В. ЛАГОДИЧ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Прототрофные штаммы *Bacillus subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434 трансформированы рекомбинантными конструкциями, содержащими фрагмент гена шикиматкиназы. За счет гомологичной рекомбинации осуществлена интеграция векторных конструкций в состав бактериальной хромосомы трансформируемых штаммов с образованием рекомбинантных штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. Конструктивные отличия между полученными штаммами обусловлены механизмом инактивации гена шикиматкиназы: при использовании конструкции рMTL21CΔaroK (штамм *B. subtilis* 168wt21CSA) реализована необратимая инактивация, а при использовании конструкции рMUTIN4ΔaroK (штамм *B. subtilis* 5434p4SA) – регулируемая (индуцируемая ИПТГ) экспрессия гена шикиматкиназы. Изучены морфофизиологические и биохимические особенности штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. У обоих штаммов в нативных условиях отмечены утрата прототрофных свойств и приобретение способности к повышенному синтезу шикимовой кислоты. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA продемонстрирован эффект восстановления прототрофных свойств у части клеток бактериальной популяции при активации экспрессии гена шикиматкиназы в присутствии ИПТГ. Выявлена зависимость изменения числа клеток с активированным геном шикиматкиназы от концентрации индуктора в среде. С применением метода ВЭЖХ показано, что у полученных штаммов-кандидатов шикимовая кислота синтезируется эффективнее, чем у соответствующих штаммов-предшественников: ее содержание в культуральной среде может достигать 564 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA и 732 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 5434p4SA, т. е. более чем в 2,5 раза превышать таковые значения для исходных штаммов.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*; гомологичная рекомбинация; инактивация шикиматкиназы; метаболический путь шикимата; тест на синтрофизм; индуктор ИПТГ; промотор *Pspac*.

### Образец цитирования:

Чао Юй, Корик ЕО, Лагодич АВ. Оценка эффективности инактивации шикиматкиназы у рекомбинантных штаммов – продуцентов шикимовой кислоты *Bacillus subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;2:52–64.  
EDN: MKDCZJ

### For citation:

Chao Yu, Korik EO, Lahodzich AV. Evaluation of the efficiency of shikimate kinase inactivation in recombinational strains – producers of shikimic acid *Bacillus subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;2:52–64. Russian.  
EDN: MKDCZJ

### Авторы:

**Чао Юй** – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – А. В. Лагодич.  
**Елена Олеговна Корик** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.  
**Алексей Викторович Лагодич** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

### Authors:

**Chao Yu**, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.  
[cygoodluck1989@gmail.com](mailto:cygoodluck1989@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-1647-3377>  
**Elena O. Korik**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.  
[korik@bsu.by](mailto:korik@bsu.by)  
<https://orcid.org/0000-0002-7888-4518>  
**Aliaksei V. Lahodzich**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.  
[lagodichav@bsu.by](mailto:lagodichav@bsu.by)  
<https://orcid.org/0000-0002-6837-2439>

## EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF SHIKIMATE KINASE INACTIVATION IN RECOMBINATIONAL STRAINS – PRODUCERS OF SHIKIMIC ACID *BACILLUS SUBTILIS* 168wt21CSA AND *B. SUBTILIS* 5434p4SA

CHAO YU<sup>a</sup>, E. O. KORIK<sup>a</sup>, A. V. LAHODZICH<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. V. Lahodzich (lagodzichav@bsu.by)

Prototrophic strains *Bacillus subtilis* 168wt and *B. subtilis* VKPM 5434 were transformed with recombinational constructs containing the fragment of shikimate kinase gene. The vector constructs were integrated into the bacterial chromosome of the transformed strains via homologous recombination resulting in recombinant strains *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA. The differences between the obtained strains are due to the mechanism of the shikimate kinase gene inactivation: complete knockout with the construct pMTL21CΔaroK (strain *B. subtilis* 168wt21CSA) and conditional (IPTG-inducible) expression of shikimate kinase gene with the construct pMUTIN4ΔaroK (strain *B. subtilis* 5434p4SA). The morphophysiological and biochemical features of the strains *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA were studied. For both strains under native conditions, the loss of prototrophic properties and the acquisition of ability to increase the synthesis of shikimic acid were noted. For the strain *B. subtilis* 5434p4SA, the effect of restoring prototrophic properties in some cells of the bacterial population was demonstrated upon activation of the expression of the shikimate kinase gene in the presence of IPTG. The dependence of the change in the number of cells with the activated shikimate kinase gene on the concentration of IPTG inductor in the medium was revealed. Using the HPLC method, we shown that mutant strains synthesise shikimic acid more efficiently than the corresponding parent strains: shikimic acid content in the culture medium can reach 564 μg/mL for the strain *B. subtilis* 168wt21CSA and 732 μg/mL for the strain *B. subtilis* 5434p4SA, i. e. more than 2.5 times exceed those for the original strains.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; homologous recombination; inactivation of shikimate kinase; the metabolic pathway of shikimat; syntrophism test; IPTG inductor; *Pspac* promoter.

### Введение

Шикиматный путь включает стадии синтеза всех трех ароматических аминокислот микроорганизмами, в ходе которых образуются продукты 3-дегидрошикимовой, шикимовой и хоризмовой кислот и их производные (рис. 1) [1; 2]. Ароматические аминокислоты, к которым относятся L-тирозин, L-триптофан и L-фенилаланин, востребованы в сельском хозяйстве и медицинской практике, поскольку выполняют множество жизненно важных функций в организме. Так, L-тирозин является предшественником гормонов дофамина, адреналина, норадреналина и тироксина. Препараты L-тирозина используются в качестве усилителя вкуса, помогают улучшить внимание, память, концентрацию, поддерживают работу нервной системы, стабилизируют артериальное давление и частоту сердечных сокращений у пациентов с болезнью Паркинсона [3], позволяют решить косметические проблемы обесцвечивания кожи за счет повышения синтеза меланина у пациентов с витилиго [4; 5]. Второй незаменимой аминокислотой является L-триптофан. Потребность рынка в L-триптофане растет с каждым годом [6]. Это обусловлено его широким использованием в качестве важного компонента кормов для животных, а также применением при производстве противоопухолевых препаратов, таких как виолацеин и деоксивиолацеин [6]. Третья аминокислота, L-фенилаланин, входит в состав подсластителя аспартама, который назначается пациентам с сахарным диабетом и лицам с избыточной массой тела [7]. Шикимовая кислота является одним из наиболее востребованных и самых ранних идентифицированных соединений в пути биосинтеза ароматических аминокислот [8]. Ее выделяют из растительного сырья, преимущественно из плодов звездчатого аниса. Также разработаны подходы для микробиологического синтеза, реализованные с использованием различных представителей про- и эукариот, таких как *Escherichia coli* [9; 10], *Saccharomyces cerevisiae* [11; 12], *Pseudomonas viridans* [13] и *Bacillus subtilis* [14]. Возросший интерес к шикимовой кислоте и поиск высокопродуктивных штаммов для ее синтеза обусловлены исключительными свойствами данной кислоты: она выступает основным хиральным центром при синтезе ряда востребованных фармацевтических препаратов и соединений, наиболее известным из которых является препарат «Тамифлю», применяемый для борьбы с различными штаммами гриппа, включая штамм птичьего гриппа H5N1.

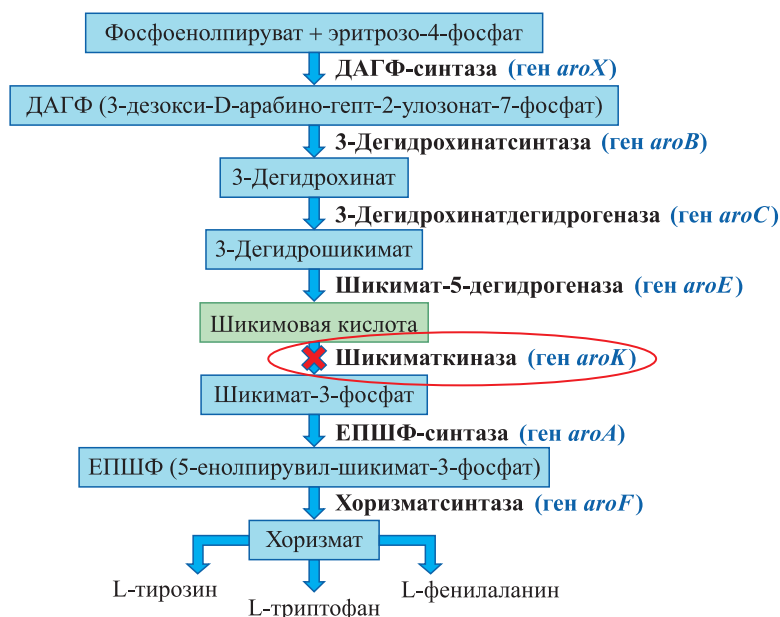


Рис. 1. Общая схема шикиматного пути у *B. subtilis* (составлено на основе данных источников [15–17] с дополнениями). Названия генов приведены для генома *B. subtilis* 168 (сборка NC\_000964.3)

Fig. 1. General scheme of the shikimate pathway in *B. subtilis* (compiled on the basis of data from sources [15–17] with additions). The names of the genes are given for *B. subtilis* 168 genome (assembly NC\_000964.3)

Ранее с использованием двух плазмидных конструкций (pMTL21CΔaroK [18; 19] и pMUTIN4ΔaroK [20; 21]), содержащих в своем составе области для гомологичной рекомбинации с бактериальной хромосомой клеток *B. subtilis*, были получены генно-инженерные штаммы-кандидаты, которые оценивались как штаммы – продуценты шикимовой кислоты. С применением метода гиперосмотической электротрансформации описанные выше конструкции введены в клетки штаммов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434 [19] и путем гомологичной рекомбинации интегрированы в бактериальную хромосому с образованием рекомбинантных штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA соответственно.

У используемых в работе исходных прототрофных штаммов шикиматный путь обеспечивает образование L-триптофана, L-фенилаланина и L-тирозина, а шикимовая кислота является промежуточным продуктом этого пути [14]. Однако у полученных штаммов-кандидатов работа гена шикиматкиназы (*aroK*) должна быть нарушена, что обусловит блокировку превращения шикимата в шикимат-3-фосфат и невозможность образования L-триптофана, L-фенилаланина и L-тирозина [21].

Предполагается, что избыток шикимовой кислоты (целевой продукт) в клетках штамма *B. subtilis* 168wt21CSA будет достигаться за счет нарушения целостности гена *aroK*. Это приведет к отсутствию шикиматкиназной активности в клетках полученного штамма и, как следствие, к накоплению шикимата в клетке в концентрациях, превышающих физиологическую норму, с последующим пассивным транспортом во внеклеточную среду. Сходный эффект должен проявляться и у штамма *B. subtilis* 5434p4SA, однако при получении этого штамма реализован ряд конструктивных особенностей. Так, интеграция конструкции pMUTIN4ΔaroK в состав бактериальной хромосомы должна была приводить не к нарушению целостности гена *aroK*, а к изменению эффективности его экспрессии путем постановки под индуцируемый ИПТГ промотор *Pspac*. Привнесение терминаторов  $t_1$ ,  $t_2$  и  $t_0$  перед промоторным регионом должно было исключить фоновую экспрессию гена *aroK* с других промоторов в отсутствие индукции промотора *Pspac*. Сниженная чувствительность к ретроингибированию ДАГФ-синтазы продуктами шикиматного пути, характерная для исходного штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434, должна была обеспечить более высокий выход шикимовой кислоты, чем у немутагенизированного штамма *B. subtilis* 168wt (рис. 2) [19].

Таким образом, при отсутствии в среде индуктора ИПТГ у штамма *B. subtilis* 5434p4SA должна отсутствовать экспрессия гена шикиматкиназы (*aroK*) и, как следствие, наблюдаться полная или частичная утрата шикиматкиназной активности в клетках, приводящая как к развитию ауксотрофности по ароматическим аминокислотам, так и к накоплению в клетке шикимата в концентрациях, превышающих физиологическую норму, с последующим пассивным транспортом во внеклеточную среду. Ожидается, что при наличии в среде индуктора ИПТГ промотор *Pspac* обеспечит экспрессию подконтрольного ему гена *aroK*, в случае его функциональной целостности это приведет к образованию функционально активного белкового продукта гена *aroK* и восстановлению шикиматкиназной активности в клетке.

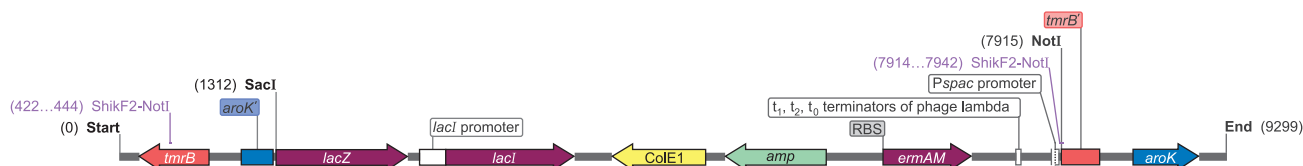


Рис. 2. Ожидаемая организация фрагмента бактериального генома клеток *B. subtilis* после интеграции плазмиды pMUTIN4ΔaroK.

Последовательности генов *tmrB* и *aroK* обозначены заливкой красного и синего цвета соответственно. Для восстановленных после интеграции последовательностей генов указано направление открытых рамок считывания. Фрагменты генов *tmrB* и *aroK*, представленные начальной областью открытой рамки считывания, обозначены заливкой красного и синего цвета и подписаны как *tmrB'* и *aroK'*

Fig. 2. Expected organisation of a fragment of the bacterial genome of *B. subtilis* after integration of the plasmid pMUTIN4ΔaroK.

The *tmrB* and *aroK* gene sequences are indicated by red and blue shading respectively. For the sequences obtained after integration are shown the direction of the open reading frames. Fragments represented by the initial region of the *tmrB* and *aroK* genes (open reading frames) are indicated by red and blue shading and signed as *tmrB'* and *aroK'*

Цель и задачи настоящего исследования заключались в следующем: путем гиперосмотической электротрансформации ввести генетическую конструкцию pMTL21CΔaroK в клетки штамма *B. subtilis* 168wt и отобрать рекомбинантные клетки, полученные в результате интеграции конструкции pMTL21CΔaroK в состав бактериальной хромосомы; оценить эффективность экспрессии генов шикиматного пути с промотора Pspac в клетках штамма *B. subtilis* 5434p4SA; изучить морфофизиологические и биохимические особенности полученных штаммов (эффективность роста на средах различного состава, целостность шикиматного пути, эффективность синтеза и накопления шикимата).

## Материалы и методы исследования

**Бактериальные штаммы и плазмиды.** В ходе работы использовались:

- штамм *B. subtilis* ВКПМ 5434 (является высокопродуктивным продуцентом L-триптофана, устойчивым к хлорамфениколу; предоставлен Национальным биоресурсным центром «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (Москва));
- штамм *B. subtilis* 5434p4SA (характеризуется тем, что ген *aroK* находится под контролем промотора Pspac, и отличается устойчивостью к эритромицину и хлорамфениколу; получен из штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 в результате интеграции конструкции pMUTIN4ΔaroK в бактериальную хромосому);
- штамм *B. subtilis* 168 (характеризуется мутацией гена *trpC2* [22]);
- штамм *B. subtilis* 168wt (является прототрофом; получен путем трансформации штамма *B. subtilis* 168 фрагментированным геномом *B. natto*);
- штамм *B. subtilis* 168wt21CSA (характеризуется необратимой инактивацией гена *aroK* и устойчивостью к хлорамфениколу; получен из штамма *B. subtilis* 168wt в результате интеграции конструкции pMTL21CΔaroK в бактериальную хромосому);
- плазмиды pMTL21CΔaroK и pMUTIN4ΔaroK (получены из плазмид pMTL21C [18] и pMUTIN4 [20] соответственно путем клонирования последовательности для обеспечения их интеграции в хромосому *B. subtilis* в целях инактивации гена *aroK* [19]).

**Электротрансформация клеток штамма *B. subtilis* 168wt.** Ночную культуру штамма *B. subtilis* 168wt, выращенную на среде LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl) [23], разводили средой для выращивания LBS (среда LB, содержащая 0,5 моль/л сорбитола) до достижения бактериальной культурой оптической плотности 0,01 при длине волны 600 нм, после чего культивировали при температуре 37 °C и скорости вращения 200 об/мин до достижения культурой оптической плотности 0,5 при длине волны 600 нм. Далее бактериальные клетки 10 мин охлаждали на льду, а затем осаждали центрифугированием в течение 10 мин при ускорении 5000 g. Полученный осадок промывали ледяной гиперосмотической средой для электротрансформации SMG (концентрация сорбита 1 моль/л, концентрация маннита 0,5 моль/л, объемная доля глицерина 1,5 %). После четырехкратной промывки клетки ресуспензировали в среде для электротрансформации (объем среды составлял 1,25 % от исходного объема культуры). Электрокомпетентные клетки либо сразу использовали для электротрансформации, либо замораживали и хранили при температуре –80 °C. Для электротрансформации брали 60 мкл электрокомпетентных клеток, добавляли к ним 65 нг ДНК плазмиды pMTL21CΔaroK (1,083 нг/мкл), а затем переносили полученную суспензию в охлажденную на льду кювету для электропорации с зазором между электродами 1 мм. После инкубации в течение 5 мин клетки подвергали воздействию одиночного электрического импульса

с использованием электропоратора Gene Pulser Xcell (*Bio-Rad*, США), при этом длительность импульса составляла 4,0–5,5 мс, напряженность электрического поля – 23 кВ/см, электрическая емкость – 25 мкФ, а сопротивление достигало 200 Ом. После воздействия электрического импульса в кювету вносили 1 мл среды для восстановления (среда LB, содержащая 0,5 моль/л сорбитола и 0,38 моль/л маннитола). По истечении 6 ч инкубации при температуре 37 °С клетки высевали на агаризованную среду LB с концентрацией эритромицина 5 мкг/мл и культивировали при температуре 37 °С. Отбор и анализ полученных трансформантов проводили на 2-е сутки культивирования [19].

**Оценка продукции L-триптофана у различных штаммов *B. subtilis*.** Для выявления у штаммов способности синтезировать L-триптофан были использованы различные варианты посева анализируемых штаммов и тест-культуры, реализуемые при постановке теста на синтрофизм (рис. 3), а также метод перпендикулярных штрихов, наиболее часто применяемый для оценки антагонистической активности [24].

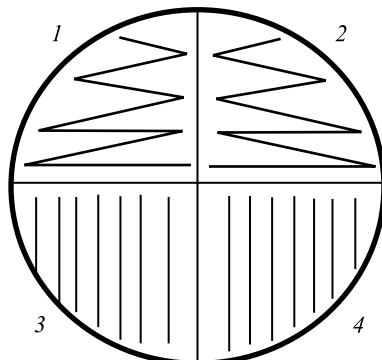


Рис. 3. Определение продукции L-триптофана с помощью ауксотрофического теста. В сектора 1 и 2 высевались анализируемые штаммы *B. subtilis* (непрерывный штрих), в сектора 3 и 4 высевалась тест-культура *B. subtilis* 168 trpC2 (параллельные штрихи)

Fig. 3. Determination of L-tryptophan production using the auxotrophic test. In sectors 1 and 2 were seeded the analysed strains of *B. subtilis* (solid stroke), in sectors 3 and 4 was seeded a test culture of *B. subtilis* 168 trpC2 (parallel strokes)

При использовании метода перпендикулярных штрихов на поверхность минимальной агаризованной среды в чашке Петри штрихом высевали исследуемый штамм и помещали чашку в термостат при температуре 37 °С. Продолжительность культивирования определяли по эффективности прироста биомассы продуцента. После завершения роста культуры и диффузии продуцируемого L-триптофана в агаризованную среду перпендикулярно к штриху выросшего штамма штрихами подсеивали тест-культуру, начиная от краев чашки, затем снова помещали чашку в термостат на 48 ч. Если изучаемый микроорганизм синтезировал и выделял диффундирующий в среде L-триптофан, то это было видно по ростостимулирующему действию в отношении используемой тест-культуры ауксотрофного штамма *B. subtilis* 168, зона роста которого начиналась в непосредственной близости от зоны роста самого продуцента. Чем дальше от точки роста целевого штамма был возможен рост тестируемого штамма, тем с меньшей эффективностью проявлялась инактивация целевого гена. При полной утрате шикиматкиназной активности исследуемыми штаммами рост тест-культуры, равно как и рост исследуемого штамма, был либо невозможен, либо возможен только в области непосредственного контакта с анализируемым образцом [24]. Сходные результаты получены при использовании схемы посева культур, применяемой в тесте на синтрофизм (см. рис. 3). Учет результатов проводили после 72 ч культивирования при температуре 37 °С.

**Выявление в популяции доли клеток с активным промотором *Pspac*.** Эффективность экспрессии (долю клеток, экспрессирующих ген шикиматкиназы с промотора *Pspac*) определяли при культивировании клеток в жидкой среде и на агаризованных средах. При приготовлении сред с заданными концентрациями индуктора использовали метод серийных разведений [24].

**Определение эффективности индукции экспрессии гена шикиматкиназы при культивировании клеток в жидкой среде.** В несколько стерильных пробирок вносили по 2 мл минимальной глюкозо-солевой среды SMS. В первую пробирку, содержащую 4 мл среды, вносили ИПТГ до достижения конечной концентрации 2,4 ммоль/л и тщательно перемешивали. После этого 2 мл жидкости из первой пробирки переносили во вторую пробирку и повторяли перемешивание, затем 2 мл содержимого второй пробирки переносили в третью пробирку и т. д. Из предпоследней пробирки удаляли 2 мл раствора для выравнивания объема и обеспечения одинаковых условий культивирования. При таком способе

разведения в каждой последующей пробирке концентрация ИПТГ была в 2 раза меньше, чем в предыдущей. Последняя пробирка со средой не содержала ИПТГ и являлась контрольной. Во все пробирки вносили по 0,1 мл суспензии отмытых бактериальных клеток с плотностью  $10^4$ – $10^5$  клеток на 1 мл. Через 16–18 ч культивирования в оптимальных условиях проводили анализ роста микроорганизмов как путем визуальной оценки (помутнение среды), так и с использованием спектрофотометрического метода. Помутнение среды трактовали как наличие высокой численности бактерий (более  $10^7$  клеток на 1 мл).

**Определение доли клеток, экспрессирующих ген шикиматкиназы с промотора Pspac при различных концентрациях индуктора.** Применяя сходный с описанным выше подход, готовили чашки с агаризованной минимальной глюкозо-солевой средой и концентрацией ИПТГ 0; 0,3; 0,6; 1,2 и 2,4 ммоль/л. Для подсчета общего числа жизнеспособных клеток использовали чашки Петри с полноценной питательной средой. Во все чашки вносили по 0,1 мл суспензии отмытых бактериальных клеток с плотностью  $10^4$ – $10^5$  клеток на 1 мл. Через 16–18 ч культивирования в оптимальных условиях проводили подсчет числа КОЕ, которое соответствовало числу клеток с активным промотором Pspac.

**Состав среды и условия культивирования, используемые для оценки уровня синтеза шикимовой кислоты клетками *B. subtilis* с помощью метода ВЭЖХ.** Выращенные на среде LB ночные культуры штаммов *B. subtilis* 168wt, *B. subtilis* 168wt21CSA были использованы для инокуляции (объемная доля 5 %) в 4 мл среды для ферментации, полученной на основе минимальной среды Спидайзена (1,4 %  $K_2HPO_4$ , 0,6 %  $KH_2PO_4$ , 0,01 %  $MgSO_4$ , 0,2 %  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,1 %  $Na_3C_6H_5O_7$ ) [22; 25].

По окончании культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при ускорении 13 000 g. Полученный супернатант отбирали и очищали от остатков бактериальных клеток и их обломков с помощью шприцевого бактериального фильтра с размером пор 0,45 мкм (*Macherey-Nagel*, Германия). Для загрузки колонки использовали 5 мкл отфильтрованной культуральной жидкости.

**Подготовка стандарта шикимовой кислоты для ВЭЖХ-анализа.** Образец стандарта шикимовой кислоты растворяли в метаноле до концентрации 2 мг/мл. Полученный раствор очищали с помощью шприцевого бактериального фильтра с размером пор 0,45 мкм. Выполняли трехкратные инъекции по 5 мкл [26; 27].

**Количественный анализ шикимовой кислоты методом ВЭЖХ.** Супернатанты анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе LCMS-2020 (*Shimadzu*, Япония) с использованием колонки Allure C18 (диаметр 4,6 мм, длина 150 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) (*Restek*, США) и детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M20A (*Shimadzu*). Разделение веществ проводили градиентным элюированием при температуре колонки 40 °C и скорости потока 0,5 мл/мин на протяжении 20 мин. На основании анализа собственных результатов [19] и протоколов, представленных в работах [14; 26; 28], были изменены условия градиента мобильной фазы. Модифицированные условия градиента мобильной фазы представлены в табл. 1. Обнаружение шикимовой кислоты и измерение ее концентрации проводили при длине волны 210 нм с помощью детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M20A [26; 28].

Таблица 1

Условия хроматографического разделения

Table 1

Conditions for chromatographic separation

Время, мин	Доля компонентов мобильной фазы, %		
	Вода	Метанол	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

Примечания: 1. В ходе анализа использовалась 1 % муравьиная кислота. 2. В этих условиях стандарт шикимовой кислоты элюировался на 162-й секунде.

## Результаты и их обсуждение

**Оценка эффективности роста и способности к синтезу триптофана у исходных штаммов и штаммов-кандидатов.** У отобранных штаммов-кандидатов с использованием теста на синтрофизм продемонстрировано появление неспособности к подращиванию клеток тест-штамма *B. subtilis* 168, нуждающегося в L-триптофане, что и должно быть характерно для этих штаммов вследствие нарушения целостности шикиматного пути (рис. 4).

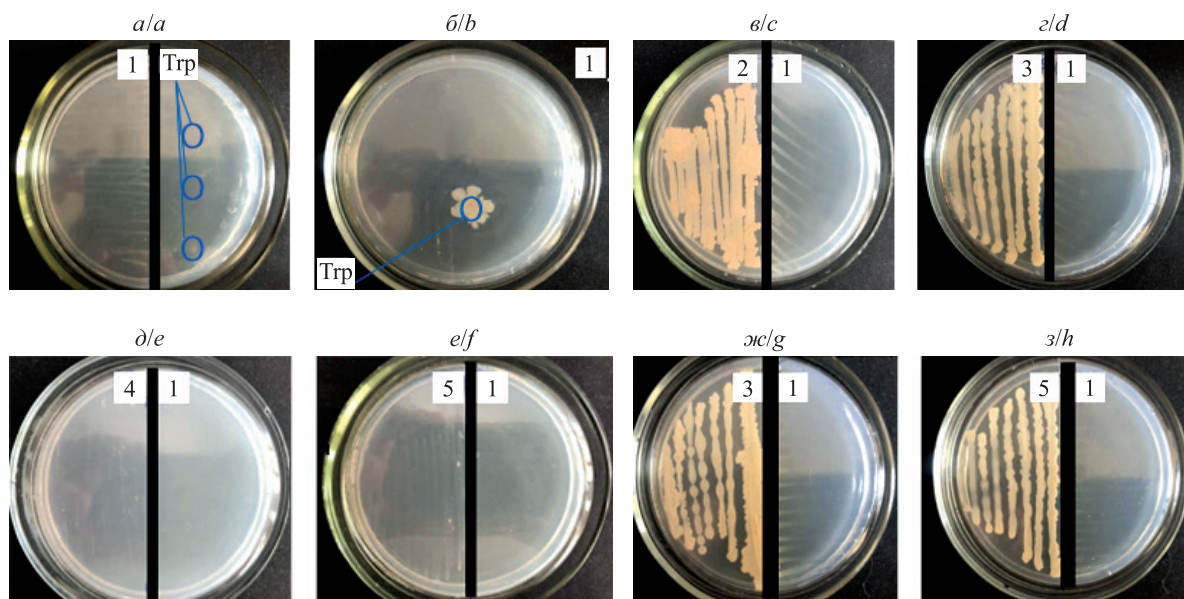


Рис. 4. Оценка эффективности роста и способности к синтезу L-триптофана у исходных штаммов и штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA (чашки инкубировали при температуре 37 °С, учет результатов проводили через 72 ч):  
 а – оценка эффективности роста тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде (тест-штамм высеян параллельными штрихами на половину чашки Петри, в другую половину чашки внесен L-триптофан (Trp) (маркером синего цвета отмечены области наслаивания раствора L-триптофана на агаризованную среду, в каждую область внесено 20 мкл 25 ммоль/л раствора L-триптофана));  
 б – оценка эффективности роста тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде (тест-штамм высеян методом Коха, затем в отмеченную маркером синего цвета область уколком внесено 5–10 мкл 25 ммоль/л раствора L-триптофана (Trp));  
 в – оценка эффективности роста штамма-прототипа *B. subtilis* 168wt (2) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;  
 г – оценка эффективности роста штамма-прототипа *B. subtilis* ВКПМ 5434 (3) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;  
 д – оценка эффективности роста штамма-кандидата *B. subtilis* 168wt21CSA (4) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;  
 е – оценка эффективности роста штамма-кандидата *B. subtilis* 5434p4SA (5) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде;  
 ж – оценка эффективности роста штамма-прототипа *B. subtilis* ВКПМ 5434 (3) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде в присутствии 2,4 ммоль/л ИПТГ;  
 з – оценка эффективности роста штамма-кандидата *B. subtilis* 5434p4SA (5) и его способности к подращиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 (1) на минимальной глюкозо-солевой среде в присутствии 2,4 ммоль/л ИПТГ

Fig. 4. Evaluation of the growth efficiency and ability to synthesise L-tryptophan in the original strains and candidate strains *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA

(the plates were incubated at temperature of 37 °С, the results were recorded after 72 h):  
 а – evaluation of the growth efficiency of the test strain *B. subtilis* 168 (1) on the SMS medium (the test strain was seeded with parallel strokes on half of the Petri dish, L-tryptophan (Trp) was added to the other half of the dish (the points of layering of the L-tryptophan solution in the agar medium marked as blue areas, in each area 20 μL of 25 mmol/L solution of L-tryptophan were added);  
 б – evaluation of the growth efficiency of the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium (the test strain was inoculated by the Koch method, after which 5–10 μL of 25 mmol/L solution of L-tryptophan (Trp) was injected in the point marked as blue area);  
 в – evaluation of the growth efficiency of the prototype strain *B. subtilis* 168wt (2) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;  
 г – evaluation of the growth efficiency of the prototype strain *B. subtilis* VKPM 5434 (3) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;  
 е – evaluation of the growth efficiency of the candidate strain *B. subtilis* 168wt21CSA (4) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;  
 ж – evaluation of the growth efficiency of the candidate strain *B. subtilis* 5434p4SA (5) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium;  
 з – evaluation of the growth efficiency of the prototype strain *B. subtilis* VKPM 5434 (3) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium in the presence of 2.4 mmol/L IPTG;  
 и – evaluation of the growth efficiency of the candidate strain *B. subtilis* 5434p4SA (5) and its ability to grow the test strain *B. subtilis* 168 (1) on SMS medium in the presence of 2.4 mmol/L IPTG

Рост тест-штамма *B. subtilis* 168 на минимальной глюкозо-солевой среде возможен только в присутствии L-триптофана и наблюдается либо в области диффузии внесенного раствора L-триптофана (см. рис. 4, а), либо непосредственно в месте его введения (см. рис. 4, б). На рис. 4, в и г, продемонстрированы прототрофные свойства штаммов-прототипов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434, а также их способность к подрачиванию тест-штамма *B. subtilis* 168 на минимальной глюкозо-солевой среде: незначительный рост тест-штамма наблюдается в непосредственной близости от анализируемых штаммов, предположительно, в области диффузии синтезируемого ими L-триптофана. Эти данные подтверждают целостность шикиматного пути у штаммов-прототипов. Анализ рис. 4, д и е, отражающих эффективность роста штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA на минимальной глюкозо-солевой среде, позволяет заключить, что рост штамма *B. subtilis* 168wt21CSA на этой среде невозможен, а рост штамма *B. subtilis* 5434p4SA незначителен. Эти данные свидетельствуют о полной или частичной утрате прототрофных свойств рекомбинантными штаммами *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA. Следует отметить, что оба указанных штамма демонстрировали способность к росту на минимальной глюкозо-солевой среде при наличии в ней смеси трех ароматических аминокислот – L-тирозина, L-триптофана и L-фенилаланина. Потеря прототрофности у рекомбинантных штаммов, равно как и восстановление способности к росту на минимальной глюкозо-солевой среде при условии одновременного присутствия в ней конечных метаболитов шикиматного пути – L-тирозина, L-триптофана и L-фенилаланина, является прогнозируемой и ожидаемой. Стоит заметить, что наблюдаемая у штамма *B. subtilis* 5434p4SA незначительная способность к росту на минимальной глюкозо-солевой среде (см. рис. 4, е) также является прогнозируемой, она может быть объяснена характерной для промотора *Pspac* фоновой активностью [20]. С использованием чашечного метода для штамма *B. subtilis* 5434p4SA продемонстрирован следовой рост на минимальной глюкозо-солевой среде без формирования четких колоний, а при длительном культивировании в жидкой среде (продолжительность культивирования 48 ч, температура 37 °С, скорость вращения 200 об/мин) плотность культуры не превышала  $2,6 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. Добавление в среду ИПТГ восстанавливало прототрофные свойства организма и его способность к подрачиванию клеток тест-штамма (см. рис. 4, з). В качестве контроля сравнения выступал штамм-прототип *B. subtilis* ВКПМ 5434, который на минимальной глюкозо-солевой среде с ИПТГ продемонстрировал отсутствие изменений в способности к подрачиванию тест-штамма *B. subtilis* 168, что расценивалось как отсутствие изменений в активности синтеза L-триптофана (см. рис. 4, ж).

Таким образом, результаты сравнения эффективности роста штамма *B. subtilis* 5434p4SA, представленной на рис. 4, е и з, однозначно свидетельствуют, что в присутствии ИПТГ у рекомбинантных бактерий *B. subtilis* 5434p4SA восстанавливается способность к росту на среде SMS и подрачиванию тест-штамма *B. subtilis* 168, т. е. в присутствии ИПТГ восстанавливается целостность пути синтеза ароматических аминокислот. Это свойство является ключевым для валидации полученного мутанта и говорит о корректности функциональной организации структуры разработанной конструкции рMUTIN4Δ*aroK*, точности процесса ее интеграции в бактериальную хромосому целевого штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434, верности локализации в составе бактериальной хромосомы привнесенных за счет гомологичной рекомбинации детерминант с восстановлением структурной и функциональной целостности гена *aroK* при его постановке под регулируемый промотор *Pspac*. В связи с этим рекомбинантный штамм *B. subtilis* 168wt21CSA может рассматриваться как альтернативная тест-система при характеристике основных свойств штамма *B. subtilis* 5434p4SA.

Интересные результаты были получены для штамма *B. subtilis* 5434p4SA при его культивировании в жидкой минимальной глюкозо-солевой среде с ИПТГ. Как было отмечено ранее, штамм *B. subtilis* 5434p4SA утрачивает прототрофные свойства, которые восстанавливаются в присутствии ИПТГ, что связано с активацией экспрессии гена *aroK* с привнесенного индуцируемого ИПТГ промотора *Pspac*. Для используемой в работе векторной молекулы рMUTIN4, содержащей промотор *Pspac*, *lac*-оператор и терминаторы  $t_1$ ,  $t_2$  и  $t_0$ , была описана зависимость уровня экспрессии генетических детерминант, контролируемых промотором *Pspac*, как функция эффективности работы промотора от концентрации индуктора. Данная зависимость имела линейный характер в интервале концентраций ИПТГ от 0,01 до 1,0 ммоль/л (далее измерения были непоказательны из-за насыщения системы экспрессируемым продуктом) [20]. Характерный фоновый рост без формирования четких колоний при культивировании штамма на плотной минимальной глюкозо-солевой среде, а также низкий титр КОЕ при культивировании в жидкой среде позволили предположить, что имеет место не низкий уровень экспрессии подконтрольного гена во всех клетках популяции, а экспрессия подконтрольного гена в случайных клетках популяции. Для проверки данного предположения была выдвинута гипотеза, что даже при использовании индуктора экспрессия подконтрольного гена идет не во всех, а только в части клеток бактериальной популяции. Для проверки



выдвинутой гипотезы в популяции клеток *B. subtilis* 5434p4SA определяли долю клеток, обладающих прототрофным фенотипом при отсутствии ИПТГ, и долю клеток, восстановивших прототрофный фенотип после внесения в среду культивирования ИПТГ в различных концентрациях.

Анализ числа сформированных колоний на средах разного состава наглядно демонстрирует долю клеток в бактериальной популяции, у которых проявлялся прототрофный фенотип в результате экспрессии гена *aroK* с промотора *Pspac* (табл. 2).

Таблица 2

Доля клеток штамма *B. subtilis* 5434p4SA, эффективно экспрессирующих ген *aroK*, при различных концентрациях ИПТГ в среде культивирования

Table 2

Proportion of *B. subtilis* 5434p4SA cells that effectively express the *aroK* gene at different concentrations of IPTG in the culture medium

Штамм	Число КОЕ, сформированных на минимальной глюкозо-солевой среде с эритромицином (5 мкг/мл), при различных концентрациях ИПТГ					Общее число КОЕ, сформированных на полноценной питательной среде	
	0 ммоль/л	0,3 ммоль/л	0,6 ммоль/л	1,2 ммоль/л	2,4 ммоль/л	С эритромицином (5 мкг/мл)	Без эритромицина
<i>B. subtilis</i> ВКПМ 5434	–	–	–	–	–	–	1523,0 ± 24,3
<i>B. subtilis</i> 5434p4SA	5,0 ± 1,1	82,0 ± 2,0	238,0 ± 5,6	616,0 ± 6,8	1330,0 ± 68,0	1413,0 ± 32,9	1427,0 ± 29,8
Доля прототрофных клеток	0,35 %	5,80 %	16,84 %	43,59 %	94,0 %	100 % (контроль)	100 % (контроль)

Примечания: 1. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение;  $m$  – ошибка среднего значения, рассчитанная через среднеквадратичное отклонение при трехкратной повторности эксперимента. 2. Сведения для штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 приведены в целях демонстрации отсутствия спонтанной устойчивости к эритромицину у штамма-прототипа. 3. Знак «минус» обозначает отсутствие роста. 4. Доля прототрофных клеток определена относительно числа КОЕ, сформированных на среде с эритромицином.

Совокупный анализ описанных выше результатов позволяет заключить, что вследствие гомологичной рекомбинации между фрагментами ДНК, клонированными в состав конструкций pMTL21CΔ*aroK* и pMUTIN4Δ*aroK*, и целевыми областями бактериального генома штаммов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434 были получены рекомбинантные штаммы с заблокированной шикиматкиназной активностью, обуславливающей возникновение у исследуемых штаммов-кандидатов ауксотрофности по ароматическим аминокислотам. Это указывает на целевую доставку и интеграцию клонированных участков в нужные регионы бактериальной хромосомы. В пользу справедливости высказанного предположения также свидетельствуют данные, полученные для штамма-кандидата *B. subtilis* 5434p4SA, у которого инактивация гена шикиматкиназы должна носить обратимый характер. Так, у штамма *B. subtilis* 5434p4SA была отмечена утрата прототрофных свойств и способности к синтезу L-триптофана, что является ожидаемым фенотипическим изменением. При культивировании штамма на минимальной глюкозо-солевой среде в присутствии ИПТГ происходит восстановление прототрофных свойств и способности к синтезу L-триптофана, что также является ожидаемым фенотипическим изменением и согласно рабочей модели может быть объяснено экспрессией гена шикиматкиназы с привнесенного промотора *Pspac*, индуцируемого ИПТГ.

Таким образом, с помощью теста на синтрофизм было продемонстрировано соответствие между теоретически ожидаемыми и наблюдаемыми фенотипическими изменениями в характеристиках штаммов-кандидатов, что позволило использовать отобранные штаммы-кандидаты для дальнейших исследований по оценке их продуктивности.

**Оценка эффективности синтеза шикимовой кислоты.** Концентрацию шикимовой кислоты в среде определяли с помощью метода ВЭЖХ после 72 ч культивирования анализируемых штаммов в ферментационной среде (начальная концентрация L-тирозина, L-триптофана и L-фенилаланина по 12,5 мкг/мл, начальная концентрация глюкозы 0,5 %, температура культивирования 37 °С, скорость вращения 200 об/мин). Ростовые показатели бактериальной культуры и эффективность накопления шикимовой кислоты в среде после 72 ч культивирования представлены в табл. 3. Следует отметить, что используемые штаммы имеют разную скорость роста: в указанный интервал времени для быстрорастущих

культур, таких как *B. subtilis* 168wt, наступает фаза отмирания и лизиса клеток, тогда как для культуры *B. subtilis* 5434p4SA, отличающейся самым медленным ростом, этот временной промежуток соответствует фазе глубокого стационара. Именно с лизисом культур авторы связывают обнаружение шикимовой кислоты для штаммов *B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434.

Таблица 3

**Ростовые показатели штаммов *B. subtilis*  
и эффективность накопления шикимовой кислоты после 72 ч инкубирования  
в ферментационной среде для синтеза шикимовой кислоты**

Table 3

**Growth rates of strains *B. subtilis* and the efficiency  
of accumulation of shikimic acid after 72 h of incubation  
in the fermentation medium for the synthesis of shikimic acid**

Штамм	Оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм	Биомасса культуры, мг	Концентрация шикимовой кислоты в среде, мкг/мл
<i>B. subtilis</i> 168wt	0,6347 ± 0,0230	1548 ± 35	156,03 ± 3,66
<i>B. subtilis</i> 168wt21CSA	1,7482 ± 0,0486	2923 ± 45	564,46 ± 4,70
<i>B. subtilis</i> ВКПМ 5434	1,0513 ± 0,0553	2469 ± 34	260,16 ± 3,18
<i>B. subtilis</i> 5434p4SA	1,8917 ± 0,0170	3387 ± 37	732,38 ± 4,53

Примечание. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение;  $m$  – ошибка среднего значения, рассчитанная через среднееквадратичное отклонение при трехкратной повторности эксперимента.

Как видно из табл. 3, у обоих рекомбинантных штаммов эффективность накопления шикимовой кислоты в среде культивирования значительно превышала аналогичный показатель у штаммов-прототипов. Так, для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA количество шикимовой кислоты, накапливаемой в ферментационной среде, возросло в 3,6 раза относительно исходного уровня и составило (564,46 ± 4,70) мкг/мл. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA прирост был чуть менее значительным (в 2,8 раза), однако количество накапливаемой в среде шикимовой кислоты являлось максимальным в анализируемом ряду и достигало (732,38 ± 4,53) мкг/мл. Также следует отметить, что в предыдущих исследованиях авторов при использовании других параметров хроматографического разделения образцов продукция шикимовой кислоты у штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 не обнаружена, а соответствующий показатель эффективности накопления шикимовой кислоты для штамма *B. subtilis* 5434p4SA был в 1,8 раза ниже и составлял (403,98 ± 9,10) мкг/мл [19]. Отличия числовых значений могут быть объяснены как модификацией условий хроматографического разделения, так и изменением параметров культивирования, которые, безусловно, играют весьма существенную роль при работе с продуцентами. При сравнении исходных штаммов с полученными продуцентами по таким показателям, как оптическая плотность бактериальной культуры и ее биомасса, нельзя не отметить, что у полученных продуцентов накопление шикимовой кислоты сопряжено с пролонгированным эффектом от увеличения оптической плотности культуры и ее биомассы. Так, у штамма *B. subtilis* 168wt21CSA через 72 ч инкубирования в среде ферментации оптическая плотность культуры была в 2,8 раза, а биомасса – в 1,9 раза выше, чем у штамма *B. subtilis* 168wt, при этом в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 168wt21CSA накапливалось в 3,6 раза больше шикимовой кислоты по сравнению с количеством кислоты, накапливаемым в культуральной жидкости штамма-прототипа. Вероятно, разница ростовых показателей связана с отличиями в фазах роста культур клеток штамма-прототипа и штамма-продуцента. Аналогичные закономерности были выявлены для пары *B. subtilis* ВКПМ 5434 – *B. subtilis* 5434p4SA (для культур также наблюдались отличия в фазах роста). Так, у штамма *B. subtilis* 5434p4SA через 72 ч культивирования оптическая плотность культуры была в 1,8 раза, биомасса – в 1,4 раза, а количество накапливаемой шикимовой кислоты – в 2,8 раза выше, чем у исходного штамма. Приведенные числовые значения позволяют предположить, что наблюдаемые изменения в сравниваемых параметрах носят нелинейный характер и могут контролироваться другими факторами, которые не были учтены в данном исследовании.

В результате сравнения ростовых показателей и эффективности синтеза шикимовой кислоты двух штаммов-прототипов (*B. subtilis* 168wt и *B. subtilis* ВКПМ 5434) и полученных на их основе рекомбинантных штаммов (*B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA) выявлена интересная особенность. При указанных режимах культивирования соответствующие показатели штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 примерно в 1,7 раза (оптическая плотность культуры – в 1,7 раза, биомасса – в 1,6 раза, количество накапливаемой шикимовой кислоты – в 1,7 раза) превышают таковые штамма *B. subtilis* 168wt. У рекомбинантных

штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA эти показатели различаются не так существенно (оптическая плотность культуры – в 1,1 раза, биомасса – в 1,2 раза, количество накапливаемой шикимовой кислоты – в 1,3 раза), но они по-прежнему выше у штамма *B. subtilis* 5434p4SA. Повышенные ростовые характеристики, выявленные для штаммов *B. subtilis* ВКПМ 5434 и *B. subtilis* 5434p4SA, могут быть объяснены способностью к сверхсинтезу L-триптофана у исходного штамма *B. subtilis* ВКПМ 5434 и его низкой чувствительностью к ретроингибированию L-триптофаном и другими ароматическими кислотами, добавленными в среду культивирования.

### Заключение

На основе теоретических данных о структуре шикиматного пути и ожидаемой организации генетического материала получаемых рекомбинантных штаммов с использованием микробиологических и биохимических подходов установлено соответствие основных характеристик штаммов-кандидатов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA прогнозируемым параметрам, а также осуществлена оценка их ростовых показателей и эффективности синтеза шикимовой кислоты при стандартных условиях культивирования. Для полученных штаммов выявлены утрата прототрофных свойств и приобретение способности к повышенному синтезу шикимовой кислоты. Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA продемонстрирован эффект восстановления прототрофных свойств у части клеток бактериальной популяции при активации экспрессии гена шикиматкиназы в присутствии индуктора, что может быть использовано для удешевления синтеза шикимовой кислоты при масштабировании процессов культивирования. С помощью метода ВЭЖХ показано, что у полученных штаммов-кандидатов шикимовая кислота синтезируется эффективнее, чем у соответствующих штаммов-предшественников: ее содержание в среде культивирования превышает таковые значения у штаммов-прототипов более чем в 2,5 раза, достигая 564 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA и 732 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 5434p4SA.

### Библиографические ссылки

1. Bentley R, Haslam E. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1990;25(5):307–384. DOI: 10.3109/10409239009090615.
2. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999; 50:473–503. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
3. Humphrey CE, Furegati M, Laumen K, La Vecchia L, Leutert T, Müller-Hartwig JCD, et al. Optimized synthesis of L-m-tyrosine suitable for chemical scale-up. *Organic Process Research & Development*. 2007;11(6):1069–1075. DOI: 10.1021/op700093y.
4. Гиляров МС, Баев АА, Винберг ГГ, Заварзин ГА, Иванов АВ, Северин СЕ и др., редакторы. *Биологический энциклопедический словарь*. Москва: Советская энциклопедия; 1986. 831 с.
5. Meyskens FL Jr, Farmer P, Fruehauf JP. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research*. 2001; 14(3):148–154. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2001.140303.x.
6. Fang Ming-Yue, Zhang Chong, Yang Song, Cui Jin-Yu, Jiang Pei-Xia, Lou Kai, et al. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:8. DOI: 10.1186/s12934-015-0192-x.
7. Ul-Haq I, Ali S. Microbiological transformation of L-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl L-alanine (L-dopa) by a mutant strain of *Aspergillus oryzae* UV-7. *Current Microbiology*. 2002;45(2):88–93. DOI: 10.1007/s00284-001-0080-y.
8. Davis BD. Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;191(1):315–325. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)50982-0.
9. Dell KA, Frost JW. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(24): 11581–11589. DOI: 10.1021/ja00077a065.
10. Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W, Frost JW. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*. 2003;19(3):808–814. DOI: 10.1021/bp025769p.
11. Weber C, Brückner C, Weinreb S, Lehr C, Essl C, Boles E. Biosynthesis of cis,cis-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(23):8421–8430. DOI: 10.1128/AEM.01983-12.
12. Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 2013;15:55–66. DOI: 10.1016/j.ymben.2012.10.003.
13. Wang S, Bilal M, Zong Y, Hu H, Wang W, Zhang X. Development of a plasmid-free biosynthetic pathway for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synthetic Biology*. 2018;7(4):1131–1142. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00047.
14. Liu Dong-Feng, Ai Guo-Min, Zheng Qing-Xiang, Liu Chang, Jiang Cheng-Ying, Liu Li-Xia, et al. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:40. DOI: 10.1186/1475-2859-13-40.
15. Чao Ю, Шoнина МЮ, Лагодич АВ. Разработка общей концепции регулируемой инактивации гена шикиматкиназы для модификации шикиматного пути у бактерий *Bacillus subtilis*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2017;3:45–53.
16. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 complete genome [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine, National Center for Biomedical Information; 2023 [cited 2022 July 14]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC\\_000964.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000964.3).

17. UniProt [Internet]. [S. l.]: UniProt consortium; 2002–2023 [cited 2022 July 14]. Available from: <https://www.uniprot.org/>.
18. Chambers SP, Prior SE, Barstow DA, Minton NP. The pMTL *nic*<sup>-</sup> cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene*. 1988;68(1):139–149. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90606-3.
19. Чао Ю, Лагодич АВ. Анализ эффективности факторов электротрансформации клеток *Bacillus subtilis* для инактивации гена *aroK* путем гомологичной рекомбинации. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;2:64–73 (на англ.). DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-64-73.
20. Vagner V, Dervyn E, Ehrlich SD. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 1998;144(11):3097–3104. DOI: 10.1099/00221287-144-11-3097.
21. Jiang JJ, Liu T, Lin SJ. [Research progress on the biosynthesis of aromatic compounds by microorganisms]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*. 2019;31(5):430–448. Chinese.
22. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *PNAS*. 1958;44(10):1072–1078. DOI: 10.1073/pnas.44.10.1072.
23. Guérout-Fleury A-M, Shazand K, Frandsen N, Stragier P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1995;167(1–2):335–336. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00652-4.
24. Лысак ВВ, Желдакова РА, Фомина ОВ. *Микробиология*. Минск: БГУ; 2015. 115 с.
25. Bott KF, Wilson GA. Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system. *Journal of Bacteriology*. 1967;94(3):562–570. DOI: 10.1128/jb.94.3.562-570.1967.
26. Chen Fengli, Hou Kexin, Li Shuangyang, Zu Yuangang, Yang Lei. Extraction and chromatographic determination of shikimic acid in Chinese conifer needles with 1-benzyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid aqueous solutions. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2014;256473. DOI: 10.1155/2014/256473.
27. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 1983;166(4):557–580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
28. Altinyay Ç, Ergene Öz B, Altun ML. Quantification of shikimic acid in the methanolic extracts of three *Alnus* taxons growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;13(1):115–120.

## References

1. Bentley R, Haslam E. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1990;25(5):307–384. DOI: 10.3109/10409239009090615.
2. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999;50:473–503. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
3. Humphrey CE, Furegati M, Laumen K, La Vecchia L, Leutert T, Müller-Hartweg JCD, et al. Optimized synthesis of L-*m*-tyrosine suitable for chemical scale-up. *Organic Process Research & Development*. 2007;11(6):1069–1075. DOI: 10.1021/op700093y.
4. Gilyarov MS, Baev AA, Vinberg GG, Zavarzin GA, Ivanov AV, Severin SE, et al., editors. *Biologicheskii entsiklopedicheskii slovar'* [Biological encyclopedic dictionary]. Moscow: Sovetskaya entsiklopediya; 1986. 831 p. Russian.
5. Meyskens FL Jr, Farmer P, Fruehauf JP. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research*. 2001;14(3):148–154. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2001.140303.x.
6. Fang Ming-Yue, Zhang Chong, Yang Song, Cui Jin-Yu, Jiang Pei-Xia, Lou Kai, et al. High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:8. DOI: 10.1186/s12934-015-0192-x.
7. Ul-Haq I, Ali S. Microbiological transformation of L-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl L-alanine (L-dopa) by a mutant strain of *Aspergillus oryzae* UV-7. *Current Microbiology*. 2002;45(2):88–93. DOI: 10.1007/s00284-001-0080-y.
8. Davis BD. Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;191(1):315–325. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)50982-0.
9. Dell KA, Frost JW. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(24):11581–11589. DOI: 10.1021/ja00077a065.
10. Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W, Frost JW. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*. 2003;19(3):808–814. DOI: 10.1021/bp025769p.
11. Weber C, Brückner C, Weinreb S, Lehr C, Essl C, Boles E. Biosynthesis of cis,cis-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(23):8421–8430. DOI: 10.1128/AEM.01983-12.
12. Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 2013;15:55–66. DOI: 10.1016/j.ymben.2012.10.003.
13. Wang S, Bilal M, Zong Y, Hu H, Wang W, Zhang X. Development of a plasmid-free biosynthetic pathway for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synthetic Biology*. 2018;7(4):1131–1142. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00047.
14. Liu Dong-Feng, Ai Guo-Min, Zheng Qing-Xiang, Liu Chang, Jiang Cheng-Ying, Liu Li-Xia, et al. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. *Microbial Cell Factories*. 2014;13:40. DOI: 10.1186/1475-2859-13-40.
15. Chao Y, Shonina MY, Lahodzich AV. Design of the general concept of regulated inactivation of the gene shikimatkinase for modification of the shikimat way in bacteria *Bacillus subtilis*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2017;3:45–53. Russian.
16. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 complete genome [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine, National Center for Biomedical Information; 2023 [cited 2022 July 14]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000964.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000964.3).
17. UniProt [Internet]. [S. l.]: UniProt consortium; 2002–2023 [cited 2022 July 14]. Available from: <https://www.uniprot.org/>.
18. Chambers SP, Prior SE, Barstow DA, Minton NP. The pMTL *nic*<sup>-</sup> cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene*. 1988;68(1):139–149. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90606-3.

19. Chao Y, Lahodzich AV. Analysis of the efficiency factors of electrotransformation of *Bacillus subtilis* to inactivate the *aroK* gene by the method of homologous recombination. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;2:64–73. DOI: 10.33581/2521-1722-2021-2-64-73.
20. Vagner V, Dervyn E, Ehrlich SD. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 1998;144(11):3097–3104. DOI: 10.1099/00221287-144-11-3097.
21. Jiang JJ, Liu T, Lin SJ. [Research progress on the biosynthesis of aromatic compounds by microorganisms]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*. 2019;31(5):430–448. Chinese.
22. Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *PNAS*. 1958;44(10):1072–1078. DOI: 10.1073/pnas.44.10.1072.
23. Guérout-Fleury A-M, Shazand K, Frandsen N, Stragier P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*. 1995;167(1–2):335–336. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00652-4.
24. Lysak VV, Zheldakova RA, Fomina OV. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Minsk: Belarusian State University; 2015. 115 p. Russian.
25. Bott KF, Wilson GA. Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system. *Journal of Bacteriology*. 1967;94(3):562–570. DOI: 10.1128/jb.94.3.562-570.1967.
26. Chen Fengli, Hou Kexin, Li Shuangyang, Zu Yuangang, Yang Lei. Extraction and chromatographic determination of shikimic acid in Chinese conifer needles with 1-benzyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid aqueous solutions. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2014;256473. DOI: 10.1155/2014/256473.
27. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 1983;166(4):557–580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
28. Altinyay Ç, Ergene Öz B, Altun ML. Quantification of shikimic acid in the methanolic extracts of three *Alnus* taxons growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;13(1):115–120.

Получена 16.03.2023 / исправлена 12.06.2023 / принята 12.06.2023.  
Received 16.03.2023 / revised 12.06.2023 / accepted 12.06.2023.