

Юй Чао<sup>1</sup>, А. В. Лагодич<sup>2</sup>

УДК 579.25

<sup>1</sup> Кафедра генетики, биологический факультет, Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Кафедра генетики, биологический факультет, Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНТЕЗА ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ ШТАММАМИ *B. Subtilis* С ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНОМ ШИКИМАТ-КИНАЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В результате выполнения настоящего исследования путем измерения концентрации шикимовой кислоты в среде культивирования штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA была произведена оценка эффективности ее синтеза в зависимости от условий выращивания. В условиях прерывистого культивирования продемонстрировано, что накопление шикимовой кислоты увеличивается при внесении глюкозы и снижается при внесении ароматических аминокислот. Оптимизация состава среды обеспечила выход целевого соединения 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.

**Благодарность:** Авторы выражают глубокую благодарность доценту кафедры биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета Корик Елене Олеговне за неоценимую помощь при определении концентрации шикимовой кислоты методом ВЭЖХ.

**Образец цитирования:** Юй Чао. Эффективность синтеза шикимовой кислоты штаммами *B. Subtilis* с инактивированным геном шикимат-киназы при различных условиях культивирования / Юй Чао, А. В. Лагодич // София: электрон. науч.-просветит. журн. – 2023. – № 2. – С. 63–70.

Yu Chao<sup>1</sup>, Aliaksei Lahodzich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup> Department of Genetics, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

## EFFICIENCY OF SHIKIMATE SYNTHESIS BY *B. Subtilis* STRAINS WITH AN INACTIVATED SHIKIMATE KINASE GENE UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS

In this work, by measuring shikimic acid residues in the cultivation medium of strains *B. subtilis* 168wt21CSA and *B. subtilis* 5434p4SA, the efficiency of its synthesis was achieved depending on the growing conditions. Under intermittent cultivation conditions, it was shown that the accumulation of shikimic

acid increases with the addition of glucose and decreases with the addition of aromatic amino acids. Optimization of the medium composition to yield target compounds up to 808 µg/ml for the *B. subtilis* strain 168wt21CSA and up to 1385 µg/ml for the *B. subtilis* strain 5434p4SA.

**Keywords:** shikimic acid; shikimic acid metabolic pathway; optimization of the composition of the fermentation medium; amino acid concentration; glucose concentration; feedback inhibition.

**Acknowledgments:** We are deeply grateful to Elena Korik (Ph.D., Associate Professor, Department of Biochemistry, the Faculty of Biology, Belarusian State University) for helping us with HPLC analysis.

**For citation:** Yu Chao & Lahodzich A. Efficiency of Shikimate Synthesis by *B. Subtilis* Strains with an Inactivated Shikimate Kinase Gene under Different Cultivation Conditions. *Sophia*. 2023;2:63–70. Russian.

**Авторы:**

<sup>1</sup> **Юй Чао** – соискатель кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета.

<https://orcid.org/0000-0002-1647-3377>  
cygoodluck1989@gmail.com

**Authors:**

<sup>1</sup> **Yu Chao** – PhD-Student (applicant), Department of Genetics, Faculty of Biology of Belarusian State University.



<sup>2</sup> **Алексей Викторович Лагодич** – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета.

<https://orcid.org/0000-0002-6837-2439>  
lagodichav@bsu.by

<sup>2</sup> **Aliaksei Lahodzich** – PhD of Biological Sciences, Docent, Associate Professor at the Department of Genetics, Faculty of Biology of Belarusian State University.



**Ш**икимовая кислота благодаря своим хиральным свойствам является ключевым соединением при синтезе ингибитора нейраминидазы, используемого в качестве основного компонента противовирусного препарата Осельтамивир [1–3]. До недавнего времени основными источниками получения шикимовой кислоты являлись ее экстракция из плодов бадьяна настоящего (*Illicium verum* Hook.f.) и химический синтез [4–6], но эти процессы сложны в технологическом плане и не всегда обеспечивают высокий выход целевого продукта [7], что и ограничивает эффективность производства лекарственных препаратов [8; 9].

Путь синтеза шикимовой кислоты хорошо исследован у различных организмов, и эти данные используются в метаболической инженерии для коррекции биосинтеза различных соединений [12–15]. У микроорганизмов шикимовая кислота является промежуточным продуктом в пути биосинтеза ароматических аминокислот L-Phe,

L-Trp и L-Tyr, и эти знания были использованы при разработке альтернативного способа получения шикимовой кислоты, основанного на микробном синтезе с использованием, как правило, модифицированных штаммов *E. coli* [10; 11]. Для штаммов *E. coli* описаны подходы по модификации шикиматного пути, которые позволили существенно повысить выход целевого продукта [17–20].

В представленной нами работе были получены и охарактеризованы два генно-инженерных штамма *B. subtilis*, обладающих способностью к повышенному уровню синтеза шикимовой кислоты, и тем самым было продемонстрировано, что для получения продуцентов шикимовой кислоты можно использовать перспективные в биотехнологическом плане бактерии *B. subtilis*, обладающие статусом GRAS (Generally Recognized As Safe) [21], что может упростит процедуру выделения и очистки целевого продукта.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В исследовании были использованы штаммы *B. subtilis* из коллекции кафедры генетики, а также штаммы, полученные в данной работе (табл. 1).

Таблица 1

#### Характеристика бактериальных штаммов, использованных в работе

Название	Характеристика
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i> , [23].
<i>B. subtilis</i> 168wt	Прототроф, получен путем трансформации штамма <i>B. subtilis</i> 168 <i>trpC2</i> фрагментированным геномом <i>B. natto</i> , [22].
<i>B. subtilis</i> 168wt21CSA	Получен на основе <i>B. subtilis</i> 168wt: введение в клетку конструкции рMTL21CΔ <i>agoK</i> привело к необратимой инактивации гена <i>agoK</i> ; Cmr, [22].
<i>B. subtilis</i> ВКПМ 5434	Продуцент триптофана. Известен также как В-5434 ВКПМ или ВНИИгенетика-92441, [22].
<i>B. subtilis</i> 5434p4SA	Получен на основе <i>B. subtilis</i> ВКПМ 5434 путем гомологичной рекомбинации конструкции рMUTIN4Δ <i>agoK</i> с бактериальной хромосомой; ген <i>agoK</i> под контролем промотора P <sub>spac</sub> ; Emr, Cmr, [22].

Бактериальные культуры выращивали в жидких и на плотных питательных средах LB [24]. Ферментация осуществлялась в среде Spizizen [23] с глюкозой в различных концентрациях (0,5 %; 1 %; 2 %). Смесь аминокислот (продуктов преобразования шикимата – тирозин, триптофан и фенилаланин) дополнительно добавляли в ферментационную среду до достижения следующих концентраций: 12,5 мкг/мл; 25 мкг/мл; 50 мкг/мл. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара. В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков «хлорамфеникол» и «эритромицин» в концентрации 5–15 мкг/мл.

*B. subtilis* 168wt, *B. subtilis* ВКПМ 5434 и их производные штаммы *B. subtilis* 168wt21CSA, *B. subtilis* 5434p4SA культивировали в бульоне LB при 37 °C и 200 об/мин, в течение 14–16 часов. В качестве инокулята использовали культуральный бульон. Вносили 5 % объемной доли инокулята в 5 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-2H<sub>2</sub>O [25; 26] с 12,5 мкг/мл – 50 мкг/мл глутаминовой кислоты, 12,5 мкг/мл – 50 мкг/мл триптофана, 12,5 мкг/мл – 50 мкг/мл фенилаланина). После внесения инокулята бактерии культивировали при 37 °С, 200 об/мин в течение 72 часов. По истечении 72 часов культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 15 минут. Отобранный супернатант пропускали через фильтр 0,45 мкм CHROMAFIL®Xtra PES-45/25 и использовали для определения концентрации шикимовой кислоты с помощью жидкостного хроматографа LCMS-2020 (Shimadzu, Япония). Разделение проводили на колонке Allure C18, 4,6 мм × 150 мм, 5 мкм, при температуре 40 °С, объем инъекции – 5 мкл. Использовали смесь метанола и муравьиной кислоты при скорости потока 0,5 мл / мин, время работы – 20 мин. Условия градиента мобильной фазы создавали согласно описанным в работах [16; 28; 29] и модифицировали для повышения чувствительности метода. Модифицированные условия представлены в табл. 2.

Таблица 2

### Условия хроматографического разделения

Время (мин)	Доля компонентов мобильной фазы		
	H <sub>2</sub> O	Метанол	1 % 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

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

С целью получения штаммов *B. subtilis*, обладающих способностью к повышенному синтезу шикимовой кислоты, в штаммах *B. subtilis* 168 wt и *B. subtilis* 5434 мы инактивировали ген шикимат-киназы *aroK* [11; 22], который в геноме *B. subtilis* представлен одной копией и кодирует фермент шикимат-киназу, необходимый для преобразования шикимовой кислоты в шикимат-3-фосфат. Таким образом с помощью сайт-специфического мутагенеза посредством интеграционных конструкций нами были получены два мутантных штамма *B. subtilis* с полной *B. subtilis* 168SA21C и регулируемой *B. subtilis* 5434SAP4 инактивацией гена шикимат-киназы [22]. Поскольку эти изменения были направлены на предотвращение превращения шикимовой кислоты в шикимат-3-фосфат и его дальнейшее превращение в хоризмат, у полученных мутантов мы предполагали увеличение концентрации шикимовой кислоты в клетке и ее пассивный транспорт в культуральную среду, что и было обнаружено с помощью метода ВЭЖХ.

Для увеличения выхода шикимовой кислоты, накапливаемой в среде культивирования, изучали взаимное влияние таких параметров, как концентрации источника углерода (глюкозы) и концентрация аминокислот в среде культивирования. В серии предварительных экспериментов нами было установлено, что повышение концентрации

глюкозы в среде культивирования приводит к более высокому титру шикимата у обоих полученных штаммов, тогда как изменение начальной концентрации ароматических аминокислот в среде культивирования имело различный эффект на выход шикимовой кислоты у штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA.

Вклад каждого из изучаемых факторов (концентрация глюкозы и концентрация ароматических аминокислот) оценивался с помощью ортогонального теста [27], результаты которого представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

**Оценка с помощью ортогонального теста вклада различных компонентов питательной среды на уровень синтеза шикимовой кислоты штаммом *B. subtilis* 168wt21CSA при режиме культивирования: объемная доля инокулята 10%; 72 часа; 200 об/мин, φ=20мм, 37 °С**

Тест	Факторы				Концентрация шикимовой кислоты, мкг/мл
	Концентрация глюкозы, %		Концентрация аминокислот (L-тирозин, L-триптофан, D-β-фенилаланин), мкг/мл		
1	1	0,5	1	12,5	654,4559±3,9065
2			2	25	558,3318±5,6297
3			3	50	603,9418±4,3381
4	2	1,0	1	12,5	684,8191±3,6603
5			2	25	678,1448±5,8993
6			3	50	644,1440±6,9626
7	3	2,0	1	12,5	807,9559±4,5126
8			2	25	757,0251±5,6948
9			3	50	554,5147 ±4,2561
K1	605,5765±14,0763		715,7436 ±23,5528		
K2	669,0359±6,7445		664,5005 ±28,9633		
K3	706,4989 ±38,7768		600,8671 ±13,2314		
R	100,9224		114,8765		

Штамм *B. subtilis* 168wt21CSA и штамм *B. subtilis* 5434p4SA соответственно продемонстрировали максимальный титр шикимата (807,96 мкг/мл; 1385,89 мкг/мл) при культивировании в среде, содержащей 2 % глюкозы и аминокислоты L-Тирозин, L-Триптофан и D-β-фенилаланин в концентрациях по 12,5 мкг/мл каждая.

Таблица 4

**Оценка с помощью ортогонального теста вклада различных компонентов питательной среды на уровень синтеза шикимовой кислоты штаммом *B. subtilis* 5434P4SA при режиме культивирования: объемная доля инокулята 10%; 72 часа; 200 об/мин,  $\phi=20$ мм, 37 °C**

Тест	Факторы				Концентрация шикимовой кислоты
	Концентрация глюкозы, %		Концентрация аминокислот (L-тирозин, L-триптофан, D- $\beta$ -фенилаланин), мкг/мл		
1	1	0,5	1	12,5	1167,549 $\pm$ 4,725
2			2	25	1157,250 $\pm$ 4,936
3			3	50	1127,838 $\pm$ 4,648
4	2	1,0	1	12,5	1215,741 $\pm$ 4,221
5			2	25	1162,241 $\pm$ 4,777
6			3	50	1151,511 $\pm$ 4,236
7	3	2,0	1	12,5	1385,89 $\pm$ 3,153
8			2	25	1275,680 $\pm$ 5,599
9			3	50	1258,549 $\pm$ 4,396
K1	1150,879 $\pm$ 6,4135		1256,3596 $\pm$ 33,1570		
K2	1176,4976 $\pm$ 10,1751		1198,3903 $\pm$ 19,5043		
K3	1306,6726 $\pm$ 20,0593		1179,2993 $\pm$ 20,2265		
R	155,7936		77,0602		

Сравнения полученные значения R для анализируемых параметров (концентрация глюкозы и концентрация аминокислот в среде культивирования), определяем вклад каждого параметра в общее изменение оцениваемого события – выхода шикимовой кислоты. Параметр с большим значением R оказывает большее значение на изменение оцениваемого события – уровень синтеза шикимовой кислоты.

На основании представленных в табл. 3 и 4 данных по выявлению зависимости синтеза шикимовой кислоты от концентрации глюкозы и ароматических аминокислот можно отметить, что для обоих штаммов продемонстрирована прямая зависимость количества выявляемой шикимовой кислоты от концентрации глюкозы и обратная – от концентрации ароматических кислот. Тем не менее, для полученных штаммов были установлены некоторые особенности. Так, для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA значение R(аминокислота) = 114,8765 превышало значение R(глюкоза) = 100,992. Это свидетельствует о том, что для производного штамма *B. subtilis* 168wtSA21C, влияние концентрации аминокислот больше, чем влияние концентрации глюкозы. Объяснить это можно тем, что конечные продукты метаболического пути – триптофан, фенилаланин

и тирозин – оказывают значительное ретроингибирующее действие на синтез в штамме *B. subtilis* 168wtSA21C, полученном на основе штамма с интактной (изначально нормальной) регуляцией.

Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA можно отметить, что показатель  $R(\text{глюкоза})=155,7936$  в два раза превышает  $R(\text{аминокислота})=77,0602$ . Это позволяет заключить, что для производного *B. subtilis* 5434p4SA влияние концентрации глюкозы больше, чем влияние концентрации аминокислот, что видно и по общему уровню синтеза шикимовой кислоты. Это заключение весьма логично может быть объяснено с позиций истории получения целевого штамма *B. subtilis* 5434p4SA: его предшественником является штамм *B. subtilis* ВКПМ 5434, у которого были сняты (подавлены) механизмы ретроингибирования конечными продуктами для обеспечения высокого уровня синтеза триптофана. При выборе штамма-кандидата эти особенности изначально рассматривались нами как перспективные, и именно с ними мы и связываем меньшее проявление эффекта ретроингибирования синтеза шикимовой кислоты продуктами шикиматного пути: триптофаном, фенилаланином и тирозином (табл. 3 и 4).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения данного исследования были охарактеризованы штаммы *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA с инактивированным геном шикиматкиназы, которые продемонстрировали способность к синтезу шикимовой кислоты и ее накоплению в ферментационной среде.

В работе продемонстрировано, что эффективность синтеза шикимовой кислоты в ферментационной среде находится в прямой зависимости от концентрации глюкозы в среде культивирования и в обратной – от концентрации в среде культивирования ароматических аминокислот.

Полученные экспериментальные данные позволили определить оптимальный состав ферментационной среды для синтеза шикимовой кислоты, что позволило получить выход целевого соединения до 808 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA и до 1385 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 5434p4SA.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

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. Shahrour, N. The role of neuraminidase inhibitors in the treatment and prevention of influenza / N. Shahrour // J Biomed Biotechnol. – 2001. – Vol. 1(2). – P. 89–90.
3. Andrea, G. Neuraminidase Inhibitors for Treatment of Influenza A and B Infections / G. Andrea et al. // MMWR Recommendation and reports. – 1999. – P. 1–9.
4. Bradley, D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic / D. Bradley // Nat Rev Drug Discov. – 2005. – Vol. 4. – P. 945–946.
5. Enrich, L.B. Liquidambar styraciflua: a renewable source of shikimic acid / L. B. Enrich et al. // Tetrahedron Lett. – 2008. – Vol. 49. – P. 2503–2505.
6. Lingens, F. Biosynthesis of aromatic amino acids and its regulation / F. Lingens // Angewandte Chemie-International Edition. – 1968. – Vol. 7. – P. 350.
7. Rawat, G. 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.
8. Rawat, G. 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.

9. *Rawat, G.* Expanding horizons of shikimic acid: recent progresses in production and its endless frontiers in application and market trends / G. Rawat // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97. – P. 4277–4287.
10. *Ghosh, S.* Production of shikimic acid / S. Ghosh, Y. Chisti, U.C. Banerjee // *Biotechnol Adv.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1425–1431.
11. *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.
12. *Kramer, M.* Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid / M. Kramer et al. // *Metab Eng.* – 2003. – Vol. 5. – P. 277–283.
13. *Escalante, A.* 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. – P. 21.
14. *Dell, K. A.* 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 / K.A. Dell, J.W. Frost // *J Am Chem Soc.* – 1993. – Vol. 115. – P. 11581–11589.
15. *Knop, D. R.* Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid // D.R. Knop et al. / *J Am Chem Soc.* – 2001. – Vol. 123. – P. 10173–10182.
16. *Liu, D. F.* 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(1). – P. 40.
17. *Chen, K.* 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.
18. *Chen, X.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving shikimate synthesis from glucose / X. Chen et al. // *Bioresour Technol.* – 2014. – Vol. 166. – P. 64–71.
19. *Dong, F. L.* Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* Strains / F.L. Dong et al. // *Microbial Cell Factories.* – 2014. – Vol. 13. – P. 40.
20. *Escalante, A.* Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *E. coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system / A. Escalante et al. // *Microb Cell Fact.* – 2010. – Vol. 9. – P. 21.
21. 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(78). – P. 19887–18895.
22. *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.
23. *Anagnostopoulos, C.* Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* / C. Anagnostopoulos, J. Spizizen // *J. of Bacteriology.* – 1961. – Vol. 81. – № 5. – P. 741–746.
24. *Sambrook, J.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. – New York : Cold Spring Harbor Lab.: Cold Spring Harbor Publishing, 1989.
25. *Spizizen, J.* Transfomtiom of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. / J. Spizizen // *Pathology And Microbiology.* – 1958. – P. 1072–1078.
26. *Kenneth, F. B.* Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system / F. B. Kenneth, A.W. Gary // *Journal Of Bacteriology.* – 1967. – P. 562–570.
27. *Gao, J.* Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover / J. Gao et al. // *Bioresour. Technol.* 99 (16). – 2008. – P. 7623–7629.
28. *Chen, F. L.* 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.
29. *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. – 13(1) – P. 71–76.