

# РАЗДЕЛ I

## БИОЛОГИЯ, БИОИНЖЕНЕРИЯ, БИОИНФОРМАТИКА

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНТЕЗА ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS* С ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНОМ ШИКИМАТКИНАЗЫ

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

<sup>1)</sup> Белорусский государственный университет,  
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь, [cygoodluck1989@gmail.com](mailto:cygoodluck1989@gmail.com);

<sup>2)</sup> Белорусский государственный университет,  
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь, [LagodichAV@bsu.by](mailto:LagodichAV@bsu.by)

Произведена оценка эффективности синтеза шикимовой кислоты штаммами бактерий *B. subtilis* с инактивированным геном шикиматкиназы в зависимости от условий культивирования и состава питательной среды. В условиях прерывистого культивирования для штаммов 168wt21CSA и 5434p4SA был оценен вклад влияния концентраций источника углерода (глюкозы) и концентраций аминокислот (Phe, Trp и Tyr) на синтез шикимовой кислоты и ее накопление в ферментационной среде. Анализ полученных результатов позволил подобрать условия культивирования штаммов-продуцентов для эффективного синтеза шикимовой кислоты, обеспечивая ее содержание в культуральной среде до 808 мкг/мл для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA и до 1385 мкг/мл для штамма 5434p4SA.

**Ключевые слова:** синтез шикимово; кислоты оптимизация состава ферментационной среды; концентрация аминокислот; концентрация глюкозы; ретроингибирование.

### FEATURES OF SHIKIMIC ACID SYNTHESIS BY *B. SUBTILIS* STRAINS WITH INACTIVE GENE OF SHIKIMAT KINASE

Yu Chao<sup>a</sup>, A. V. Lahodzich<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, Nezavisimosti Avenue 4,  
220030, Minsk, Belarus, [cygoodluck1989@gmail.com](mailto:cygoodluck1989@gmail.com);

<sup>b</sup>Belarusian State University, Nezavisimosti Avenue 4,  
220030, Minsk, Belarus, [LagodichAV@bsu.by](mailto:LagodichAV@bsu.by)

The efficiency of shikimic acid synthesis by *B. subtilis* bacterial strains with an inactivated shikimate kinase gene was assessed depending on cultivation conditions and the

composition of the nutrient medium. Under intermittent cultivation conditions for strains 168wt21CSA and 5434p4SA, the contribution of the influence of carbon source concentrations (glucose) and amino acid concentrations (Phe, Trp and Tyr) on the synthesis of shikimic acid and its accumulation in the fermentation medium was assessed. Analysis of the results obtained made it possible to select cultivation conditions for the producing strains for the effective synthesis of shikimic acid, ensuring its content in the culture medium of up to 808  $\mu\text{g/ml}$  for the *B. subtilis* strain 168wt21CSA and up to 1385  $\mu\text{g/ml}$  for the strain 5434p4SA.

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

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

Основным источником получения шикимовой кислоты являются экстракция из плодов бадьяна настоящего (*Illicium verum* Hook.f.) и химический синтез, но эти процессы 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]. В качестве альтернативного источника получения шикимовой кислоты выступают процессы, основанные на микробном синтезе. А бактерии *B. subtilis* можно рассмотреть в качестве перспективных продуцентов, так как статус GRAS может упростить процедуру выделения и очистки целевого продукта [6].

#### **Материалы и методы исследований**

**Бактериальные штаммы.** Использовали штаммы с инактивированным геном шикиматкиназы *B. subtilis* 168wt21CSA и 5434p4SA [8].

**Определение оптической плотности бактериальной культуры** проводили при длине волны 600 нм. Измерения осуществляли на спектрофотометре Cary 60, программный пакет Cary Win UV / Simple Reads. Количество сырой биомассы клеток, полученных в ферментационной среде, определяли как прямым методом (осаждение, промывка, взвешивание), так и с использованием калибровочной кривой зависимости величины  $\text{ОП}_{600}$  от биомассы и количества клеток.

**Оценка эффективности параметров ферментационной среды.** Оценивали вклад различных концентраций источника углерода и азота на эффективность синтеза шикимовой кислоты. В методике оценивания

используемые соединения являлись факторами, а их исходные концентрации в среде культивирования – уровнями. Полученные результаты анализировали с использованием ортогонального теста [9].

**Параметры культивирования в ферментационной среде и пробоподготовка для ВЭЖХ.** Штаммы культивировали в бульоне LB при 37 °С и 200 об/мин., в течение 14–16 часов. Использовали 10%-20% об. инокулята для 5–50 мл ферментативного бульона на основе среды Spizizen с добавками согласно табл. 1, после внесения инокулята бактерии культивировали при 37 °С, 200 об/мин в течение 72–96 часов. Далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием. Супернатант отбирали, определяли объем, пропускали через фильтр 0,45 мкм. и использовали его для последующего определения содержания шикимовой кислоты в растворе; полученную бактериальную суспензию использовали для прямого определения количества биомассы. Для ВЭЖХ объем инъекции составлял 5 мкл, инъекции проводили трижды.

**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 0,45 мкм.

#### **Количественный анализ шикимовой кислоты методом ВЭЖХ.**

Супернатанты анализировали с помощью ВЭЖХ на хроматографе LCMS-2020 с использованием колонки Allure C18 (4,6 мм × 150 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) и детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M20A. Разделение веществ проводили градиентным элюированием при температуре колонки 40 °С и скорости потока 0,5 мл / мин, на протяжении 20 минут. На основании анализа собственных результатов [8] и протоколов, представленных в работах [10; 11], были изменены условия градиента мобильной фазы, что позволило повысить чувствительность метода.

#### **Результаты и обсуждения**

Взаимное влияние различных концентраций источника углерода и аминокислот на выход шикимовой кислоты для штаммов *B. subtilis* 168wt21CSA и *B. subtilis* 5434p4SA было оценено нами с помощью ортогонального теста, согласно которому параметр с бóльшим значением R оказывает бóльшее значение на изменение оцениваемого события [9]. Расчет вклада каждого из изучаемых факторов проводился по стандартному протоколу для ортогонального теста и представлен в таблице.

Представленные в таблице 1 данные позволяют отметить, что для обоих штаммов продемонстрирована прямая зависимость количества шикимовой кислоты от концентрации глюкозы и обратная от концентрации ароматических аминокислот. Тем не менее для полученных штаммов

были выявлены некоторые особенности. Так, для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA значение R(аминокислота) = 114,8765 превышало значение R(глюкоза) = 100,992, что свидетельствует о том, что для штамма *B. subtilis* 168wt21CSA, влияние концентрации аминокислот больше, чем влияние концентрации глюкозы. Объяснить это можно тем, что анализируемые аминокислоты, являясь продуктами шикиматного пути способны оказывать значительное ретроингибирующее действие на синтез шикимовой кислоты штаммом *B. subtilis* 168wt21CSA, полученном на основе штамма с интактной регуляцией.

**Оценка вклада различных компонентов питательной среды на уровень синтеза шикимовой кислоты штаммами *B. subtilis* 168wt21CSA и 5434p4SA (объемная доля инокулята 10%; 72 часа; 200 об/мин, φ=20мм, 37°C)**

Тест	Фактор концентрации		Титр шикимовой кислоты (мкг/мл)			
	Глюкоза, %	<i>Phe, Trp и Tyr</i> мкг\мл	<i>B.subtilis</i> 168wt21CSA		<i>B. subtilis</i> 5434p4SA	
1	1(0,5)	1(12,5)	654,4559 ± 3,9065		732,3822 ± 0,7251	
2		2(25,0)	558,3318 ± 5,6297		752,7194 ± 0,6977	
3		3(50,0)	603,9418 ± 4,3381		743,5549 ± 0,4062	
4	2(1,0)	1(12,5)	684,8191 ± 3,6603		818,2180 ± 0,7201	
5		2(25,0)	678,1448 ± 5,8993		756,9535 ± 0,7266	
6		3(50,0)	644,1440 ± 6,9626		767,5480 ± 0,4998	
7	3(2,0)	1(12,5)	807,9559 ± 4,5126		992,0076 ± 0,9640	
8		2(25,0)	757,0251 ± 5,6948		820,3630 ± 0,5870	
9		3(50,0)	554,5157 ± 4,2561		746,4296 ± 0,5759	
K1			605,5765	715,7436	742,8855	847,5359
K2			669,0359	664,5005	780,9065	776,6786
K3			706,4989	600,8671	852,9334	752,5108
R			100,9224	114,8765	110,0479	95,0251

Для штамма *B. subtilis* 5434p4SA можно отметить, что показатель R(глюкоза) = 110,0479 превышает R(аминокислота) = 95,0251. Это позволяет заключить, что для штамма *B. subtilis* 5434p4SA влияние концентрации глюкозы больше, чем влияние концентрации аминокислот, что согласуется и с иными данными по особенностям накопления шикимовой кислоты в среде культивирования данного штамма, полученными

ранее и не представленными в данной работе. Наблюдаемое явление может быть объяснено свойствами штамма-прототипа, использованного для получения целевого штамма, у которого были сняты (подавлены) механизмы ретроингибирования конечными продуктами для обеспечения высокого уровня синтеза триптофана. При выборе штамма-кандидата эти свойства были отмечены нами как перспективные для дальнейшей работы и с ними мы связываем меньшее проявление эффекта ретроингибирования синтеза шикимовой кислоты продуктами шикиматного пути.

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. Продемонстрировано, что эффективность синтеза шикимовой кислоты в ферментационной среде находится в прямой зависимости от концентрации глюкозы в среде культивирования и количества внесённой биомассы бактерий; и в обратной от концентрации в среде культивирования ароматических аминокислот.

Подобраны условия, позволяющие получить выход шикимовой кислоты в количестве 1385,8 мкг/мл культуральной среды в условиях периодического культивирования: штамм *B. subtilis* 5434p4SA, объёмная доля инокулята 20%; время культивирования 72 часа; 200 об/мин,  $\varphi=20$ мм, 37°C).

### Библиографические ссылки

1. Jennifer L., McKimm B. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance // *Influenza Other Respir Viruses*. 2013. P. 25–36.
2. Liquidambar styraciflua: a renewable source of shikimic acid / L. B. Enrich [et al.] // *Tetrahedron Lett*. 2008, Vol. 49. P. 2503–2505.
3. *Lingens F.* Biosynthesis of aromatic amino acids and its regulation // *Angewandte Chemie-International Edition* 1968. Vol. 7. P. 350.
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. Rawat G., Tripathi P., Saxena R.K. Expanding horizons of shikimic acid: recent progresses in production and its endless frontiers in application and market trends // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013. Vol. 97. P. 4277–4287.

6. 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.
7. Chao Y., Lahodzich A.V. 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. P. 64–73.
8. 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. 2008. Vol. 99. № 16. P. 7623–7629.
9. 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. 40-51.
10. 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.