

## **ВЫВОДЫ:**

1. В ходе проведенной работы были получены сополимеры биоразлагаемого полилактида с мономерами акрилового ряда (акриловая и метакриловая кислоты). Выявлены закономерности протекания сополимеризации, а так же установлены физико-химические свойства полученных сополимеров.

2. Установлено влияние времени ультрафиолетового облучения и концентрации мономеров на свойства получаемого сополимера. Так, обработка ультрафиолетовым излучением сополимера полилактида и акриловой кислоты до 60 минут приводит к изменению массы исследуемых образцов до 70 %, обработка полилактида и метакриловой кислоты до 30 минут увеличивает массу на 10 – 30 %. Изменение массы пленки свидетельствует о том, что увеличение времени облучения увеличивает количество прореагировавшей (привитой) кислоты.

УДК579.841

## **СОЗДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS**

Chao Yu

*Belarusian State University*

e-mail: [cygoodluck1989@gmail.com](mailto:cygoodluck1989@gmail.com)

**Summary.** *Shikimic acid(SA) is a key chiral starting molecule for the synthesis of the neuramidase inhibitor GS4104 against viral influenza(the only one effective clinic drug against avian influenza). It is a key metabolic intermediate of the shikimate pathway for biosynthesis of aromatic amino acids(L-Phe, L-Trp, and L-Tyr) and many alkaloids in plants and microorganisms. As a commercial product, SA has been extracted from the fruits of the Illicium plant. However, microbial fermentation as an alternative process for SA production has attracted mor and more interests.*

*In this paper, functions of key enzymes in the biosynthesis pathway of shikimic acid were analyzed, and the breeding of engineering bacterium by genetic improvements for high yield of shikimic acid was also discussed. Knockout SA kinase gene(arok) in genome of Bacillus.Subtilis, with the method of homologous recombination.*

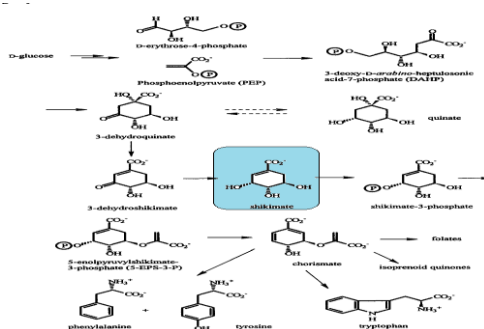
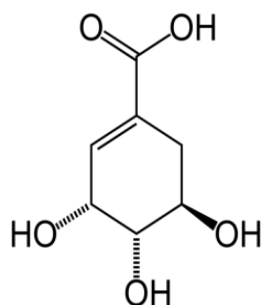
**Object of study:** *Shikimic acid, bacterial strain E.coli DH5α u E.coli X1-Blue, плазмиды pMTL21C u pUC19, as well as a template for polymerase chain reaction-B. Subtilis ВНИИгенетика-15 C10 u B. Subtilis ВНИ u B. Subtilis КМБУ 2003. plasmid pMTL21C u pUC19.*

**Key words:** *Shikimic acid production, shikimate biosynthesis pathway, SA kinase gene(arok), Genetic improvement, Genetically engineering bacterium, gene knock out, homologous recombination.*

**Цель** характеристика существующих способов получения шикимовой кислоты и подходов для получения ее микробных продуцентов, а также получения продуцента шикимовой кислоты на основе бактериальных штаммов *B. subtilis*, обладающих способностью к повышенному синтезу триптофана.

**Задачи:**1) Амплифицировать фрагмент ДНК, ограниченный генами *tmrB* и *aroK*, с матриц *B. subtilis* ВНИИгенетика-15 C10, *B. subtilis* ВНИИгенетика-15 D4 и *B. subtilis* КМБУ 2003.2) Продукт амплификации лигировать с плазмидами pMTL21C и PUC19, для получения промежуточной конструкции. Плазмиды pMTL21C и PUC19 предварительно подвергают рестрикционному анализу по сайту рестрикции *SmaI*. 3) Трансформировать полученной лигированной смесью клетки *E.coli* DH5α.и *E.coli* XL1-Blue. Отобрать промежуточные конструкции плазмид pMTL21C и PUC19 со вставкой, ограниченной генами *tmrB* и *aroK*.

**Шикимовая кислота.** Шикимовая кислота представляет собой бесцветные игольчатые кристаллы с температурой плавления 184°C. Для шикимовой кислоты описано несколько стереоизомеров, но биологической активностью обладает  $\alpha$ -изомер. Шикимовая кислота является ключевым метаболитом шикиматного пути, которую можно использовать в качестве материала для синтеза ингибиторов нейраминидазы и препаратов, используемых в противоопухолевой терапии.



**Шикиматный путь.** Шикиматный путь является общим метаболическим путём для целого ряда организмов, приводит к образованию разнообразных ароматических соединений. Шикиматный путь был обнаружен Бернхардом Дэвисом и Дэвидом Спринсоном как биосинтетический путь образования ароматических аминокислот фенилаланина, тирозина и триптофана. Этот путь присутствует у разных групп микроорганизмов, у растений и паразитов, но отсутствует у животных.

**Применение шикимовой кислоты.** Шикимовая кислота используется в синтезе противовирусного препарата осельтамивира. Осельтамивир входит в состав препарата тамифлю. Шикимовая кислота широко применяется в качестве реагента в органическом синтезе как в органической химии, так и в фармакологии. Китайскими учёными был синтезирован зейленон, препарат который широко используется при химиотерапии раковых заболеваний. Группой китайских учёных синтезировано производное шикимовой кислоты – триацилшикимовая кислота, также обладающая интикоагуляционным и антитромбическом действием. Производные шикимовой кислоты могут использоваться в качестве гербицидов и антибактериальных средств. Данная кислота может быть использована в качестве исходного соединения для синтеза ряда ароматических и хиральных соединений.

**Способы получения шикимовой кислоты.** 1. Получение из растительного сырья. 2. химический синтез. 3. Ферментативный синтез. 4. Микробиологический синтез

**Материалы и методы.** Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса, кальциевая трансформация, электрофоретический анализ, лигирование, рестрикционный анализ, полимеразная цепная реакция. В работе использовались бактериальные штаммы E.coli DH5 $\alpha$  и E.coli X1-Blue, плазмиды pMTL21C и pUC19, а также матрицы для полимеразной цепной реакции B. Subtilis ВНИИгенетика-15 С10 и B. Subtilis ВНИИгенетика-15 D4 и B. Subtilis КМБУ 2003.

**Выводы.** В ходе работы для амплификации целевого фрагмента были разработаны праймеры, которые содержали на 5` концах навески сайтов рестрикции EcoRI и SacII. Была осуществлена амплификация фрагмента, ограниченного генами tmrB и aroK, с матриц B. Subtilis ВНИИгенетика-15 С10, B. Subtilis ВНИИгенетика-15 D4 и B. Subtilis етика-15 КМБУ 2003. Осуществлено лигирование данного фрагмента с плазмидами pMTL21C и pUC19, предварительно подвергнутыми рестрикционному анализу по сайту рестрикции SmaI. Данной лигазной смесью была осуществлена трансформация клеток E.coli DH5 $\alpha$  Было проанализировано 37 клонов. Выделенная плазмидная ДНК подвергалась рестрикционному анализу по сайтам рестрикции EcoRI и BamHI. Нужной конструкции не было обнаружено. В дальнейшем при получении нужной конструкции. Данную вставку требуется лигировать с вектором pMUTIN для дальнейшей трансформации бактерий для получения продуцентов шикимовой кислоты.