

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ШИКИМАТНОГО ПУТИ У БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

А.С. Головач, Е.А. Куницкая, А.А. Романовская, А.В. Лагодич

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: LagodichAV@bsu.by

Введение

Крупные фармацевтические компании вкладывают огромные средства в разработки технологий производства противовирусных препаратов: для поиска сырьевых источников и средств борьбы с различными штаммами вируса гриппа. Создание новых безопасных, малотоксичных, низкодозных и в тоже время весьма эффективных препаратов на основе доступного сырья является одной из главных задач современной фармацевтической и медицинской химии [1].

Шикимовая кислота благодаря своим хиральным свойствам находит широкое применение в фармацевтической и косметической промышленности и служит ключевым соединением, используемым при синтезе ряда препаратов, применяемых для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых штаммами вируса гриппа [2, 3, 4]. На основе шикимовой кислоты синтезируются вещества, активно используемые при химиотерапии раковых заболеваний [1]. Производные шикимовой кислоты – монопальмитилоксишикимовая и триацетилшикимовая кислоты обладают антикоагулянтной и антитромботической активностью и снижают свёртываемость крови при внутримышечном введении [5].

У растений и микроорганизмов шикимовая кислота служит предшественником большого числа различающихся в функциональном отношении первичных и вторичных метаболитов, таких как: ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан), лигнин, фолиевая кислота, тетрациклин, убихиноны, фенольные и карболовые соединения, алкалоиды [6, 7], поэтому многие ее производные представляют интерес для сельского хозяйства и используются в качестве гербицидов и антибактериальных средств. Их применение основано на способности блокировать шикиматный путь у организмов указанных систематических групп без негативного эффекта для млекопитающих и человека [8].

Высокая востребованность шикимовой кислоты для получения различных медицинских препаратов, а также наличие широкого круга потенциальных областей ее применения обуславливают постоянный поиск и апробацию различных способов ее получения [9].

Целью работы являлось изучение возможности модификации шикиматного пути у бактериальных штаммов *B. subtilis*, обладающих способностью к повышенному синтезу триптофана и разработка стратегии для получения на их основе продуцентов шикимовой кислоты.

Методы исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использовали бактериальные штаммы: *E. coli* – DH5 α [10] и XL1–Blue [11]; *B. subtilis* – типовой штамм 168 trpC2 [12] и штаммы из коллекции кафедры генетики БГУ, характеризующиеся повышенным уровнем синтеза триптофана: *B. subtilis* КМБУ 2003, *B. subtilis* ВКПМ5434, *B. subtilis* ВНИИ Генетика-15 [13], и его производные С10, D3 и D4, полученные путем ступенчатого мутагенеза штамма *B. subtilis* ВНИИ Генетика-15 и последующего отбора мутантов, резистентных к структурным аналогам триптофана (уровень продукции L-триптофана составляет 10–12 г/л); и плазмиды: pLAV1, pAL1 и pAL2 [14].

Среды и реактивы. Бактериальные культуры выращивали в жидких и на плотных питательных средах различного состава: LB [15] либо минимальной среде Spizizen [12]. Агаризованные среды содержали 1,5% агара, источником углерода служила глюкоза в

конечной концентрации 0,2% (для бактерий *E. coli*) и 0,5% (для *B. subtilis*). Аминокислоты, основания и витамины добавляли в концентрации 20, 10 и 1 мкг/мл, соответственно.

В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков хлорамфеникола в концентрации 5–15 мкг/мл и ампициллина в концентрации 50–100 мкг/мл. Ампициллин растворяли в стерильной воде; хлорамфеникол – в 96% этиловом спирте. IPTG и β -галактозидазу производства Fermentas (Литва) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя и использовали в концентрации 500 ммоль/л и 50 мкг/мл, соответственно.

Методы исследований. Рестрикцию ДНК осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой изготовителем ферментов Fermentas (Литва). В качестве реперной ДНК при определении размеров рестриционных фрагментов использовали синтетические реперы: DNA Ladder Mix Fermentas (Литва), и 1 kb ДНК репер производства Праймтех (Беларусь).

Плазмидную ДНК из бактерий *E. coli* и *B. subtilis* выделяли методом щелочного лизиса [16], для выделения плазмид из клеток бактерий *B. subtilis* культуру плазмидсодержащих бактерий выращивали при 30°C.

Тотальную ДНК исследуемых бактерий выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции.

Трансформацию клеток бактерий *E. coli* и *B. subtilis*, предварительно переведенных в состояние компетентности, проводили согласно рекомендациям, приведенным в руководстве [15] и работах [12, 21]. Трансформацию штаммов *B. subtilis*, обладающих повышенным уровнем синтеза триптофана, проводили по модифицированной методике. Для трансформации использовали 100–150 нг плазмидной ДНК.

При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реактивов производства Праймтех (Беларусь) либо набор реактивов Fermentas (Литва) и амплификаторы Thermo Hybaid и Life Pro thermal Cycler Bioer Serves Life. Фрагмент бактериальной хромосомы *B. subtilis*, содержащий гены *tmrB* и *aroI* – амплифицировали с помощью праймеров ShikF-NotI и ShikR-BamHI при режиме амплификации: 94°C – 5 минут (один цикл); 94°C – 30 секунд, 52°C – 30 секунд, 68°C – 2 минуты (10 циклов); 94°C – 30 секунд, 54°C – 30 секунд, 68°C – 2 минуты (20 циклов); 72°C – 10 минут. Праймеры содержали на 5'-концах сайты для рестриктаз NotI и BamHI, соответственно.

Результаты и обсуждение

Перспективность использования бактерий *B. subtilis* для получения шикимовой кислоты объясняется рядом свойств, уже позволившим им найти широкое применение в различных отраслях биотехнологического производства [17]. Бактерии *B. subtilis* традиционно используются в микробиологической и пищевой промышленности, они безопасны с точки зрения экологических требований и имеют статус GRAS (generally regarded as safe), хорошо изучены в генетическом отношении [18, 19].

Основные методы получения штаммов-продуцентов *B. subtilis* могут быть разделены по способу получения рекомбинантных бактерий: векторные молекулы могут вводиться за счет трансформации (электропорации) или путем слияния протопластов; способу поддержания и локализации генетического материала, а именно за счет клонирования в составе плазмидного вектора или интеграции в хромосому. При этом конечный продукт может накапливаться внутриклеточно или секретироваться во внешнюю среду. Но независимо от способа получения штамма, локализации детерминант, определяющих его важнейшие коммерческие свойства, существуют универсальные правила, используемые при конструировании продуцентов. В рамках молекулярно-генетических технологий они могут быть сведены к выполнению ряда принципов, заключающихся в повышении числа транскрипционных раундов кодирующего материала, которое может быть достигнуто увеличением числа копий транскрибируемого гена, снятием репрессии на определенном уровне, постановкой целевого гена под более сильный промотор и блокирование использования целевого продукта в дальнейших метаболических путях. Все эти приемы могут быть использованы и реализованы с применением векторных конструкций.

Существующие штаммы-продуценты шикимовой кислоты, созданные на основе бактерий *B. subtilis*, были получены путем увеличения числа копий генов, кодирующих шикиматдегидрогеназу и ингибирования генов, отвечающих за синтез шикиматкиназы, которые обеспечивают выход шикимата – 14 г/л. [20].

Подбор условий трансформации. В связи с тем, что любая стратегия с применением молекулярно-генетических подходов предполагает введение и направленное изменение генетического материала в реципиентной клетке, на первом этапе мы изучили способность к трансформации у анализируемых штаммов-кандидатов.

Используя классические методы по переводу клеток *B. subtilis* в компетентное состояние [12, 21], достичь состояния компетентности у анализируемых штаммов-кандидатов не удалось. Для клеток *B. subtilis* характерно формирование состояния физиологической компетентности на поздних этапах логарифмического роста. Однако необходимое для этого время определяется скоростью роста, которая варьирует в значительной степени в зависимости от используемого штамма и условий культивирования.

Для определения оптимальных для развития компетентности параметров культивирования была изучена кинетика роста анализируемых штаммов в различных средах и осуществлен титр компетентности.

Таблица 1 – Оптимальные условия культивирования для перевода клеток *B. subtilis* в состояние физиологической компетентности.

Штамм <i>B. subtilis</i>	Ночная культура			Этап 1				Этап 2				Эффект., КОЕ на 1 мкг ДНК
	Vнк	ПС	ОП, ое 600 нм		ПС	ОП, ое 600 нм	T ₁ , мин	V	ПС	T ₂ , мин	T ₃ , мин	
168 trpC2	1/10	LB	2,6	1/25	CP1	0,6	300	1/10	CP2	60	40	6,2x10 ⁵
	1/10	LB	2,6	1/20	MG1	0,6	270	1/10	MG2	60	40	6,2x10 ⁵
ВНИИ Генетика-15	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,15	330	1/10	MG2	60	60	0,2x10 ²
ВНИИ Генетика-15 С10	1/50	CP1	2,6	1/10	CP1	0,43	210	1/10	CP2	80	60	0,7x10 ²
	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,33	210	1/10	MG2	60	40	0,9x10 ²
ВНИИ генетика-15 D3	1/50	CP1	1,8	1/10	CP1	0,17	270	—	—	—	—	нет
	1/50	MG1	2,3	1/10	MG1	0,25	330	—	—	—	—	нет
КМБУ2003	1/50	LB CP1	2,2	1/10	CP1	0,36	390	1/25	CP2	135	40	2,1x10 ²
	1/50	LB MG1	1,8	1/10	MG1	0,4	420	1/25	MG2	135	40	0,9x10 ²
ВКПМ 5434	1/50	CP1	1,9	1/20	CP1	0,3	310	1/10	CP2	60	40	0,1x10 ²
	1/50	MG1	1,8	1/20	MG1	0,3	310	1/10	MG2	60	40	0,1x10 ²

Примечание: Vнк – объемная доля среды культивирования; Vк – объемная доля культуры в среде культивирования; ПС – состав питательной среды; ОП – значение оптической плотности, выраженное в ОЕ, 600 нм; T₁, мин – время культивирования на этапе 1 (в «богатой среде»); T₂, мин – время культивирования на этапе 2 (в «бедной среде») до внесения ДНК; T₃, мин – время культивирования на этапе 2 (в «бедной среде») после внесения ДНК; «—» условия не подобраны.

Анализ полученных данных позволил определить оптимальные условия для развития состояния компетентности для каждого штамма-кандидата. В связи с тем, что точные временные рамки развития компетентности не были установлены, для проведения трансформации использовали культуры, находящиеся на разных этапах экспоненциальной фазы роста. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таким образом, были подобраны условия для перевода клеток указанных штаммов *B. subtilis* в состояние физиологической компетентности и получены их трансформанты с использованием векторных конструкций pLAV1, pAL1 и pAL2. С использованием ауксонографического теста был определен их фенотип: исследуемые трансформанты подращивали типовой штамм *B. subtilis* 168 trpC2, т.е. они получили указанные конструкции и сохранили способность к синтезу триптофана. Дополнительно факт плазмидоносительства подтверждали с помощью молекулярно-генетических методов и последующего электрофоретического анализа. Из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК, ее

использовали для трансформации клеток *E. coli* DH5 α либо *E. coli* XL1-Blue, из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному и электрофоретическому анализу. Размер и структура выделяемых конструкций соответствовала исходным.

При выполнении этого этапа работы была продемонстрирована принципиальная возможность проведения трансформации клеток указанных штаммов-кандидатов.

Стратегия инактивации шикиматкиназы. Анализ нуклеотидных последовательностей и дизайн праймеров. Шикимовая кислота является ключевым интермедиатом шикиматного пути и синтезируется из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата в результате четырех ферментативных реакций. У *B. subtilis* эти реакции осуществляются ферментами, кодируемыми соответственно генами *aroA*, *aroB*, *aroC* и *aroD*. Превращение шикимовой кислоты в хоризмовую происходит в результате ферментативных реакций, осуществляемых ферментами, кодируемыми генами *aroI*, *aroE* и *aroF* (таблица 2). В общем пути биосинтеза ароматических соединений образующийся шикимат подвергается фосфорилированию под действием шикиматкиназы с образованием шикимат-3-фосфата. Для накопления шикимата необходимо исключить его дальнейшее превращение в шикимат-3-фосфат, а для этого необходимо инактивировать фермент, катализирующий данную реакцию. Шикиматкиназа кодируется геном *aroI*, который, как отмечено в таблице 2, расположен достаточно далеко от других генов шикиматного пути, в частности от генов *aroA*, *aroB*, *aroC* и *aroD*, и в отличие от них транскрибируется с «+» цепи ДНК и не образует с ними единого оперона.

Анализ нуклеотидной последовательности генома *B. subtilis* позволил определить мишень для интеграции. В качестве области гомологии выбран фрагмент бактериальной хромосомы, ограниченный генами *tmrB* и *aroI*, содержащий межгенную область с регуляторными элементами указанных генов, кодирующие последовательности которых локализованы соответственно на «-» и «+» цепи ДНК.

Для амплификации целевого фрагмента синтезированы праймеры ShikF-NotI (5'-GCGGCCGCCATTAGTGTAAAGTGGTGAAC-3' Tm=53/61/52) и ShikR-BamHI (5'-CCGGATCCGCCAGAGATACGATTTTG-3' Tm=54/61/55). Согласно нуклеотидной последовательности генома *B. subtilis*, полученные праймеры позволяют амплифицировать фрагмент ДНК, размером около 900 п.н. Для последующего клонирования продукта амплификации в состав вектора pMUTIN4 [22], синтезированные праймеры содержат на своих 5'-концах навески с сайтами распознавания для рестриктаз BamHI и NotI.

Для возможности проверки специфичности интеграции нами были разработаны праймеры для ПЦР-анализа, позволяющего установить наличие интегративной конструкции в составе бактериальной хромосомы: Shik-TFAG (5'-ACAGCACAAGAGCGGAAAGATG-3' Tm=54/61/56) и Shik-TRAG (5'-TGCTTCCAGTTCTCCCATGAC-3' Tm=54/61/54).

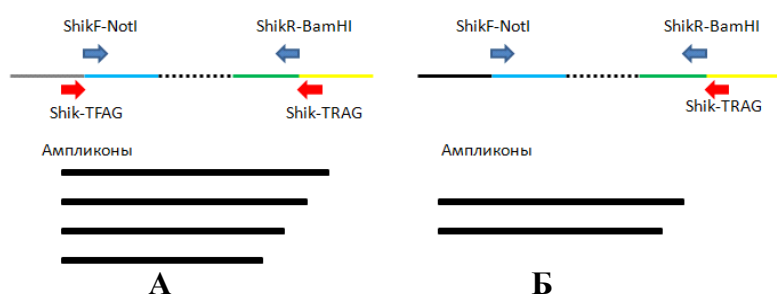
Таблица 2 – Молекулярно-генетическая характеристика генетических детерминант шикиматного пути у *Bacillus subtilis*

Ген	Код доступа	Нить	Длина, п.о.	Координаты на бактериальной хромосоме	Фермент
<i>aroA</i>	16080027	«-»	359	3045445..3046521	3-дезоксид-арабино-гептулозонат 7-фосфат синтаза (ДАГФ-синтаза)
<i>aroB</i>	16079327	«-»	363	2378012..2379100	3-дегидрохинат синтаза
<i>aroC</i>	16079365	«-»	256	2412706..2413473	3-дегидрохинат дегидратаза
<i>aroD</i>	16079620	«-»	281	2644630..2645472	шикимат 5-дегидрогеназа
<i>aroI</i>	16077384	«+»	187	340025..340585	шикимат киназа
<i>aroE</i>	16079317	«-»	429	2367954..2369240	5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза (3-фосфошикимат-1-карбоксивинилтрансфераза)
<i>aroF</i>	16079328	«-»	369	2379100..2380272	хоризмат синтаза

Примечание: таблица составлена по данным, приведенным в [19].

Таблица 3 – Количество и размер ожидаемых продуктов амплификации, получаемых при осуществлении ПЦР-скрининга рекомбинантных штаммов *B. subtilis*

Продукты амплификации, выявляемые при успешной интеграции разрабатываемой конструкции в состав бактериальной хромосомы			
№	Размер ампликона, п.о.	Прямой праймер	Обратный праймер
1	1123	Shik-TFAG	Shik-TRAG
2	1033	Shik-TFAG	ShikR-BamHI
3	970	ShikF-NotI	Shik-TRAG
4	885	ShikF-NotI	ShikR-BamHI
Продукты амплификации, выявляемые при отсутствии точной интеграции разрабатываемой конструкции в состав бактериальной хромосомы			
1	970	ShikF-NotI	Shik-TRAG
2	885	ShikF-NotI	ShikR-BamHI



Фрагмент вектора rMUTIN4 представлен линией серого цвета, фрагмент гена *tmrB* – линией голубого цвета, ген *aroI* обозначен линиями зеленого и желтого цвета, межгенная область – пунктирной линией. Праймеры ShikF-NotI, ShikR-BamHI и Shik-TFAG, Shik-TRAG, обозначены синими и красными стрелками, соответственно; организация участка генома (хромосомы) в случае: А – точной интеграции разрабатываемой конструкции в бактериальную хромосому, Б – при отсутствии интеграции

Рисунок 1 – Иллюстрация принципа проведения ПЦР-скрининга рекомбинантных штаммов *B. subtilis*

При проведении ПЦР-анализа с использованием данных праймеров, а также праймеров ShikF-NotI и ShikR-BamHI продукты амплификации будут различны в случае точной интеграции конструкции в геном целевого штамма и при отсутствии таковой (таблица 3 и рисунок 1). Этот прием позволяет провести быстрый и точный скрининг рекомбинантов среди полученных трансформантов *B. subtilis*.

Подбор и оптимизация условий ПЦР для получения целевого фрагмента. Используя в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции препараты тотальной ДНК, выделенной из штаммов, обладающих повышенной способностью к синтезу триптофана и типового штамма *B. subtilis* 168 trpC2, и разработанные праймеры ShikF-NotI и ShikR-BamHI, были подобраны условия для получения целевого продукта. При оптимизации условий было установлено, что наибольший выход продукта-амплификации наблюдается при снижении температуры отжига праймеров на 2°C относительно теоритически рассчитанной, что может являться следствием полиморфизма областей посадки праймеров, возникшего при получении данных штаммов. Также модификация предусматривала понижение температуры стадии полимеризации с 72°C (оптимальной для эффективной работы Taq-полимеразы) до 68°C градусов (температуры, рекомендуемой для работы с АТ-богатыми матрицами). Указанные изменения позволили получить специфические продукты амплификации размером около 1 т.п.н. для всех проанализированных матриц. Для доказательства того, что полученные ампликоны имеют структуру, сходную с ожидаемой, полученные ампликоны были подвергнуты рестрикции с использованием рестриктаз HindIII и PstI и последующему электрофоретическому разделению в агарозном геле.

Анализ полученных электрофореграмм показал, что все полученные ампликоны имеют сходство в организации строения, но на основании электрофоретической подвижности выявляемых рестриктов могут быть разделены на две группы. К первой могут быть отнесены продукты, получаемые с препаратов тотальной ДНК следующих штаммов *B. subtilis*: ВКПМ5434, ВНИИ Генетика-15 D4 и КМБУ 2003-2; ко второй группе – ВНИИ Генетика-15 D3, ВНИИ Генетика-15 C10, КМБУ 2003-1 и 168 trpC2. Данные различия могут являться следствием серии мутагенезов, при помощи которых были получены используемые в работе штаммы.

Выводы

В результате выполнения данной работы были получены исходные ампликоны для создания генетических конструкций, предназначенных для интеграции в состав бактериальной хромосомы. Среди ампликонов был выявлен генетический полиморфизм, который может являться следствием мутагенеза, используемого при получении штаммов-продуцентов триптофана. На основе метода ПЦР разработана система для быстрого скрининга трансформантов на наличие рекомбинационных перестроек генома и наличие интегративной конструкции в составе бактериальной хромосомы трансформированного штамма. Показана возможность трансформации штаммов-кандидатов, перспективных для создания штаммов-продуцентов шикимовой кислоты. Полученные результаты являются важной основой для дальнейшего конструирования продуцентов.

Список литературы

1. New Approach to the Total Synthesis of (–)-Zeylenone from Shikimic Acid / Y. Zhang [et al.] // *Chemical & Pharmaceutical Bull.* – 2006. – Vol. 54, № 10. – P. 1459–1461.
2. Bradley, D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? / D. Bradley // *Nature Rev.: Drug Discovery.* – 2005. – Vol. 4, № 12. – P. 945–946.
3. Hans-Jurgen, Mair. Process for the preparation of shikimic acid its derivatives / US006130354 (A). 2000-10-10.
4. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tamiflu, a bird-flu drug / T.R. Raghavendra [et al.] // *Current science.* – 2009. – Vol. 96, № 6. – P. 771–772.
5. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexanedicarboxylic acids / B. Brazdova [et al.] // *Carbohydrate Research.* – 2009. – Vol. 344, № 3. – P. 311–321.
6. Lingens, F. The Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and its Regulation / F. Lingens // *Angewandte Chemie Intern. Ed.* – 2003. – Vol. 7, № 5. – P. 350–360.
7. Ruohong, S. Separation of Shikimic Acid from Pine Needles / S. Ruohong // *Chem. Engineering & Technology.* – 2008. – Vol. 31, № 3. – P. 469–473.
8. Shinada, T. Direct conversion of 1,2-diol into allyl sulfide. Regioselective transformation of (–)-quinic acid to (–)-shikimic acid / T. Shinada, Y. Yoshida, Y. Ohfuné // *Tetrahedron Letters.* – 1998. – Vol. 39, № 33. – P. 6027–6028.
9. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria / O. Adachi [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, a. Biochemistry.* – 2006. – Vol. 70, № 10. – P. 2579–2582.
10. Taylor, R.G. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing / R.G. Taylor, D.C. Walker, R.R. McInnes // *Nucleic Acids Research.* – 1993. – Vol. 21, № 7. – P. 1677–1678.
11. Bullock, W.O. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection / W.O. Bullock, J.M. Fernandez, J.M. Short // *BioTechniques.* – 1987. – Vol. 5, № 3. – P. 376–379.
12. Anagnostopoulos, C. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* / C. Anagnostopoulos, J. Spizizen // *J. of Bacteriology.* – 1961. – Vol. 81, № 5. – P. 741–746.
13. Сенаторова, В.Н. Исследование процесса и создание технологии биосинтеза L-триптофана штаммом-продуцентом *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15 : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.23 / В.Н. Сенаторова. – М., 2000. – 156 л.
14. Lahodzich, A.V. Plasmids of pBS72 family as a basis for creation of vector systems / A.V. Lahodzich // *Biotechnology of the Future: affiliated to the Intern. Symposium «EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme», St.-Petersburg, 5–8 June 2006.* – Moscow, 2006. – P. 47–48.
15. Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual : 2nd ed.* / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. – New York: Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor Pub., 1989. – 468 p.
16. Birnboim, H.L. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA / H.L. Birnboim, J. Doly // *Nucleic Acids Research.* – 1979. – Vol. 7, № 6. – P. 1513–1523.
17. Schallmeyer, M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production / M. Schallmeyer, A. Singh, O.P. Ward // *Canadian J. of Microbiology.* – 2004. – Vol. 50, № 1. – P. 1–17.
18. Kunst, F. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* / F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer // *Nature.* – 1997. – Vol. 390, № 6657. – P. 249–256.
19. *Bacillus subtilis* 168 Genome Page [Electronic resource] // J. Craig Venter Institute [offic. site]. – Mode of access: <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=ntbs01>. – Date of access: 15.04.2011.
20. Method for producing shikimic acid / A.V. Iomantas Yurgis [et al.] // *AJINOMOTO KK*™. US6436664 (B1). 2002-08-20.
21. Bron, S. Plasmids / S. Bron // *Molecular Biological Methods for Bacillus* / ed. C.R. Harwood. - Chichester: John Wiley a. Sons Ltd., 1990. – P. 75–174.
22. Vagner, V. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* / V. Vagner, E. Dervyn, S.D. Ehrlich // *J. of Microbiology.* – 1998. – Vol. 144, № 11. – P. 3097–3104.