

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ *Bacillus subtilis*

© 2022 г. С. В. Рыков^{1, 2, *}, И. Ю. Батгалова¹, А. С. Миронов³

¹ООО “Центр трансфера биотехнологий Ока-Биотех”, Москва, 119421 Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика,
Курчатовский геномный центр, Москва, 117545 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: enterru@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.11.2021 г.

После доработки 14.12.2021 г.

Принята к публикации 17.12.2021 г.

Гиалуроновая кислота находит все более широкое применение в производстве фармацевтических и косметических средств, что обуславливает возрастающую потребность в высококачественной субстанции. Основными промышленными способами получения гиалуроновой кислоты являются экстракция из сырья животного происхождения и ферментация условно-патогенных штаммов *Streptococcus*. Рекombинантная продукция на основе безопасных для человека микроорганизмов представляется рациональным и экономически обоснованным способом получения гиалуроновой кислоты. Созданные на основе платформы *Bacillus subtilis* рекомбинантные штаммы-продуценты позволяют получать выход и качество продукта, сопоставимые с таковыми у промышленно освоенных штаммов стрептококков. Варьирование генетических, биохимических и биотехнологических факторов позволяет получать продукты с различной целевой молекулярной массой. Несмотря на достигнутые результаты, потенциал платформы *B. subtilis* для создания продуцентов гиалуроновой кислоты не исчерпан.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, *Bacillus subtilis*, рекомбинантные штаммы-продуценты.

DOI: 10.31857/S0016675822050083

Гиалуроновая кислота (ГК) является высокомолекулярным линейным несulfатированным гликозаминогликаном, состоящим из повторяющихся дисахаридных звеньев, соединенных β -1,4-гликозидными связями. Дисахаридное звено состоит из фрагментов D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -1,3-гликозидной связью [1, 2]. Наличие многочисленных sulfатированных групп у родственных гликозаминогликанов является причиной существования многочисленных изомеров, чего не наблюдается у гиалуроновой кислоты, которая всегда химически идентична, вне зависимости от методов и источников получения. В водном растворе ГК стабилизируется во вторичную структуру в виде одноцепочечной левозакрученной спирали. Дуплексы из спиралей образуют третичную структуру в виде вытянутой сетки, свойства которой зависят от молекулярного веса (МВ) и концентрации ГК [3]. Структурные характеристики и полиэлектролитная природа определяют уникальные реологические свойства растворов ГК [4, 5].

В организме человека ГК является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса.

Значительные количества ГК обнаружены в дерме и эпидермисе кожи, синовиальной суставной жидкости, гиалиновом хряще, стекловидном теле глаза [6]. ГК функционирует и как структурная, и как сигнальная молекула. Молекулярный вес является ключевым фактором, определяющим биологические функции ГК [7]. Высокомолекулярная ГК ($\geq 10^6$ Да) служит смазывающим фактором синовиальной жидкости, поддерживает водно-электролитный баланс и структуру внеклеточного матрикса [8], обладает анти-ангиогенным эффектом, участвует в процессах воспаления и раневого восстановления тканей через взаимодействие с фибриногеном и контроле активации клеток иммунной системы, регуляции цитокинов и миграции стволовых клеток [9, 10]. При ряде патологических состояний, таких как астма, фиброз легких и ревматоидный артрит, происходит образование низкомолекулярной ГК (10^4 – 10^6 Да), которая демонстрирует провоспалительную и проангиогенную активность. Низкомолекулярная ГК стимулирует выработку провоспалительных цитокинов [7], а также провоцирует перестройку внеклеточного матрикса [11]. Фрагменты и олигосахариды ГК ($\leq 10^4$ Да) в

зависимости от типа ткани и физиологического состояния демонстрируют как провоспалительные [12], так и противовоспалительные эффекты [13].

Гиалуроновая кислота различного МВ может применяться в создании средств доставки терапевтических агентов, терапии новообразований, заболеваний глаз, суставов, легких, верхних дыхательных путей, мочевыводящей системы и в эстетической медицине [2]. В повседневную практику прочно вошли созданные на основе ГК лекарственные средства и изделия: протезы синовиальной жидкости, средства для лечения травм и ожогов кожи, вискоэластики для катарактальной хирургии и глазные капли, средства для лечения ринитов, дермальные филлеры [14]. Значительный эстетический и поддерживающий эффект обеспечивает широкое применение ГК в косметических средствах и биологически активных добавках.

В обзоре проанализированы результаты, полученные при работах по созданию рекомбинантных штаммов-продуцентов ГК на основе платформы *Bacillus subtilis*.

СПОСОБЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ГК

В промышленных масштабах ГК получают двумя способами – экстракцией из сырья животного происхождения и ферментацией штаммов природных микробных продуцентов. Способ получения ГК из сырья животного происхождения является отработанной технологией, которая позволяет получать продукт с высоким МВ и приемлемыми затратами. Сырьем для крупномасштабного производства являются гребни домашних кур и стекловидное тело глаза крупного рогатого скота [15]. Недостаток способа – низкий выход продукта с высокой вариабельностью по МВ, что связано с низкой концентрацией полимера в ткани, неконтролируемой деградацией эндогенными гиалуронидазами и жесткими условиями экстракции. Препарат, полученный данным способом, может содержать инфекционные агенты – вирусы или прионы, а также следовые количества белков и нуклеиновых кислот, которые могут вызывать аллергические реакции [16, 17].

Ферментация штаммов природных продуцентов – основной промышленный способ получения ГК [18]. В качестве продуцентов применяются селекционные штаммы *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* и *S. equi* subsp. *equi*, которые способны давать в оптимальных условиях выход продукта в 6–7 г/л с МВ 2.0–3.5 МДа [19]. Главным недостатком способа является применение штаммов, созданных на основе патогенного для сельскохозяйственных животных и условно-патогенного для человека вида стрептококков. Целевому продукту необходимо пройти многие стадии очистки для

исключения попадания эндо- и экзотоксинов, что негативно сказывается на экономических характеристиках.

Идентификация генов биосинтеза ГК позволила проводить работы по созданию рекомбинантных продуцентов на различных платформах, лишенных недостатков стрептококков, с достижением таких же показателей продуктивности и МВ. Созданы штаммы-продуценты ГК как на основе промышленных платформ – *Escherichia coli*, так и на основе платформ с GRAS-статусом – *Corynebacterium glutamicum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *B. subtilis* [18, 20]. Перспективным методом является хемоэнзиматический способ биосинтеза ГК, который позволяет получать монодисперсные фракции высокой степени чистоты [21]. Однако, несмотря на достигнутые результаты, к настоящему моменту на рынке не представлены продукты на основе субстанции ГК, полученной ферментацией рекомбинантных штаммов отличных от стрептококков или хемоэнзиматическим способом. Поэтому получение высококачественной ГК с высоким выходом и низкой стоимостью представляет собой актуальную проблему в области молекулярной генетики и биотехнологии.

ПУТЬ БИОСИНТЕЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Природными продуцентами ГК являются штаммы грамположительных бактерий – *Streptococcus pyogenes*, *S. uberis*, *S. equi* subsp. *zooeconomicus*, *S. equi* subsp. *equi*, *S. iniae*, *S. equisimilis*, *Bacillus cereus* штамм G9241 и грамотрицательных бактерий – *Pasteurella multocida* [19, 22–25]. Все природные продуценты ГК – патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие заболевания животных и человека. ГК составляет основу клеточной капсулы и выступает фактором вирулентности, позволяя микроорганизму избегать узнавания и противодействия иммунной системы, а также способствует колонизации слизистых поверхностей [26]. Несмотря на очевидные преимущества для усиления вирулентности, только некоторые виды бактерий приобрели способность синтезировать капсулярную ГК.

Гены биосинтеза ГК входят в состав оперона, в котором ключевым ферментом является гиалуронсинтаза (EC 2.4.1.212) – фермент, синтезирующий ГК из активированных форм мономеров – УДФ-глюкуроната и УДФ-N-ацетилглюкозамина. Существуют два класса бактериальных гиалуронсинтаз, которые различаются структурой молекулы и аминокислотной последовательностью [27]. Наиболее распространенным является класс 1, который отвечает за биосинтез ГК у стрептококков и позвоночных и представляет собой мембранный фермент [28]. Класс 2 представлен только гиалу-

ронсинтазой оперона *P. multocida* и является ассоциированным с мембраной ферментом [25]. Оперон биосинтеза ГК стрептококков также включает от двух до четырех генов биосинтеза предшественников активированных мономеров, а в случае *P. multocida* включает также гены с функцией транслокации во внеклеточное пространство растущей цепи ГК.

Путь биосинтеза ГК детально исследован у стрептококков [29, 30]. УДФ-глюкуронат и УДФ-N-ацетилглюкозамин являются производными глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата соответственно. Путь биосинтеза ГК представлен на рис. 1. Первой реакцией биосинтеза УДФ-глюкуроната является обратимая конверсия глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат с помощью α -фосфоглюкомутазы (ЕС 5.4.2.2). Далее глюкозо-1-фосфат уридилтрансфераза (ЕС 2.7.7.9) катализирует образование УДФ-глюкозы из УТФ и глюкозо-1-фосфата. Затем образуется УДФ-глюкуроновая кислота в реакции окисления первичной спиртовой группы УДФ-глюкозы с помощью УДФ-глюкозодегидрогеназы (ЕС 1.1.1.22).

Первой реакцией биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина является перенос аминогруппы с глутамина на фруктозо-6-фосфат посредством амидотрансферазы (ЕС 2.6.1.16) с образованием глюкозамин-6-фосфата. Затем происходит перегруппировка фосфатных групп с помощью мутазы (ЕС 5.4.2.10) с образованием глюкозамин-1-фосфата. Далее происходит перенос ацетильной группы ацетилтрансферазой (ЕС 2.3.1.157) с образованием N-ацетилглюкозамин-1-фосфата и пирофосфорилазы (ЕС 2.7.7.23) в реакции с УТФ синтезирует УДФ-N-ацетилглюкозамин.

УДФ-N-ацетилглюкозамин, УДФ-глюкоза и глюкозо-1-фосфат участвуют в биосинтезе пептидогликана и других компонентов клеточной стенки, что создает очевидную конкуренцию пути биосинтеза ГК. Для обеспечения метаболических потребностей клетки в нуклеотидных сахарах геном стрептококков содержит дополнительные гены глюкозо-1-фосфат уридилтрансферазы (*hasC2*), α -фосфоглюкомутазы (*pgm1*, *pgm2*) и ацетилтрансферазы/пирофосфорилазы (*gcaD*). В то же время ген УДФ-глюкозодегидрогеназы (*hasB*) представлен единственной копией в опероне биосинтеза ГК. Таким образом, метаболизм стрептококков способен поддерживать синтез большого количества ГК во внеклеточной капсуле.

Пути биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина и УДФ-глюкозы у стрептококков и *B. subtilis* биохимически идентичны. Геном *B. subtilis* содержит гомологи всех генов биосинтеза предшественников ГК. Это позволяет использовать гены *B. subtilis* для создания эффективных искусственных оперонов, поскольку известно, что собствен-

ные гены лучше экспрессируются, чем гомологичные чужеродные.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *B. subtilis*

Рекомбинантные штаммы-продуценты ГК на основе *B. subtilis*, полученные к настоящему времени, представлены в табл. 1 и 2.

Первая работа по гетерологичной продукции ГК в *B. subtilis* подтвердила высокий потенциал платформы [31, 32]. Продемонстрирована способность рекомбинантных штаммов секретировать ГК во внеклеточное пространство и накапливать продукт в культуральной жидкости. По характеристикам ГК соответствовала продукту природных микробных продуцентов на основе штаммов *Streptococcus*. Гетерологичная экспрессия только гиалуронсинтазы *seHas*, в отличие от штаммов *E. coli*, не оказывала негативного влияния на скорость роста *B. subtilis* и не приводила к биосинтезу ГК без дополнительной экспрессии генов биосинтеза УДФ-глюкуроната [33]. Комбинирование в опероне генов биосинтеза двух предшественников позволило выявить лимитирующую стадию биосинтеза, которой является синтез УДФ-глюкуроната. Оперон из *seHasA* и собственной УДФ-глюкозодегидрогеназы *tuaD* достаточен для эффективной продукции ГК. Дополнение оперона генами биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина *gcaD* и УДФ-глюкуроната *gtaB* увеличивает выход ГК на 10–20%. Разнесение генов *seHasA* и *tuaD-gtaB* по разным оперонам в хромосоме *B. subtilis* не приводит к заметным изменениям в выходе или МВ продукта по сравнению с единым опероном *seHasA-tuaD-gtaB*. Искусственный оперон на основе собственных генов синтеза предшественников в *B. subtilis* продемонстрировал большую эффективность по выходу, чем созданный на основе генов оперона биосинтеза ГК из природного продуцента *S. equisimilis*. Неожиданным оказался эффект делеции гена устойчивости к хлорамфениколу *cat* и оксидазы семейства цитохром С450, задействованной в синтезе красного пигмента, *supX*, который выражался в увеличении выхода высокомолекулярной ГК.

Биосинтез ГК как штаммами стрептококков, так и рекомбинантными продуцентами *B. subtilis* — энергетически затратный процесс. Способом интенсификации энергетического метаболизма бактериальной клетки является повышение доступности кислорода с помощью бактериального гемоглобина [34]. Гетерологичная экспрессия Vhb оказала положительное влияние на культуральные свойства штамма и выход продукта у штамма-продуцента ГК на основе *B. subtilis* [35]. Штамм с *vhb* продемонстрировал характерный пролонгированный лаг-период и увеличенную скорость роста и достигал

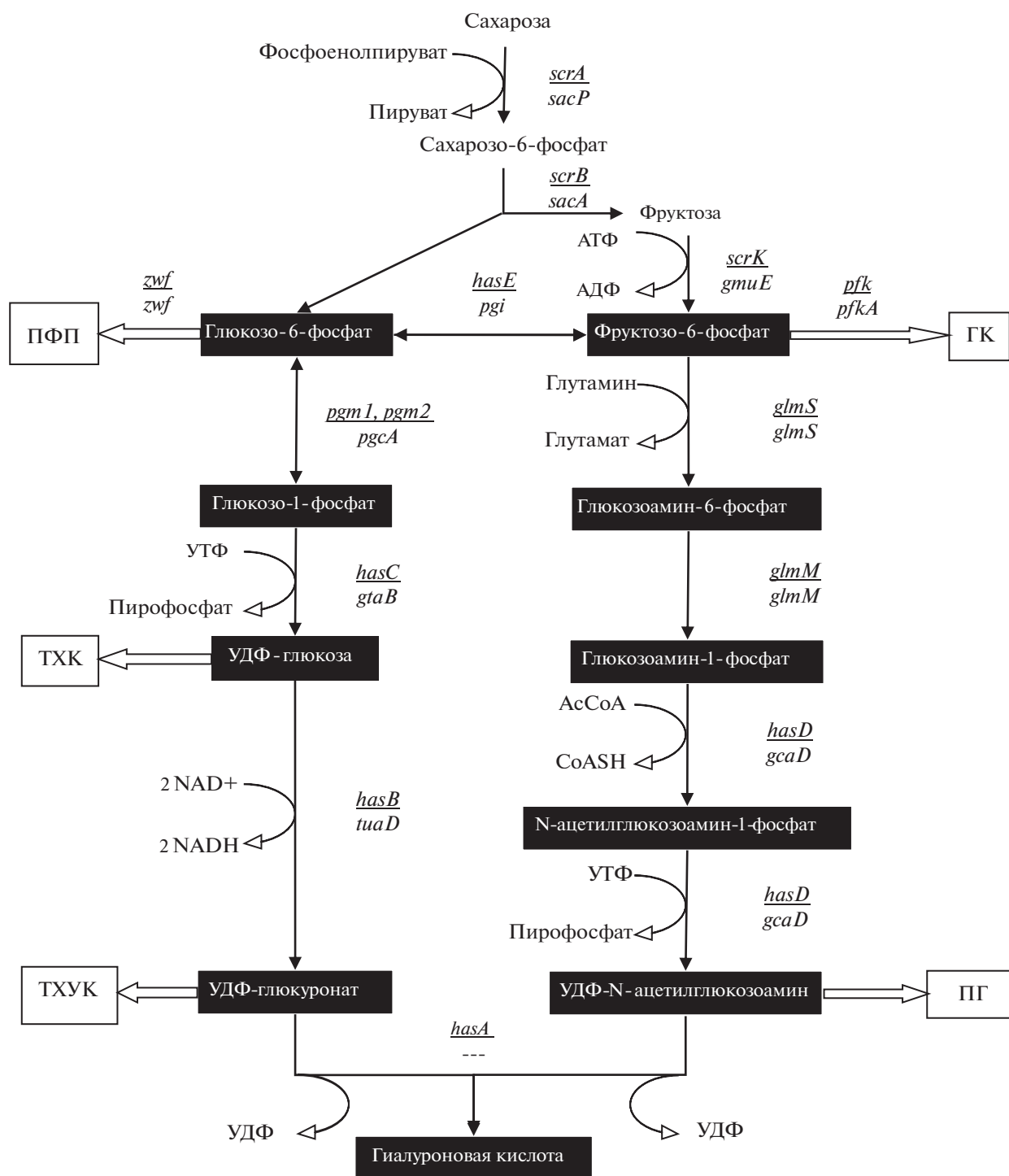


Рис. 1. Путь биосинтеза гиалуроновой кислоты и ассоциированные биохимические пути. ППП – пентозофосфатный путь, ТХК – тейхоевые кислоты, ТХУК – тейхуроновые кислоты, ГК – гликолиз, ПГ – пептидогликан. Приведены гены-гомологи: подчеркнутые надстрочные из генома *Streptococcus*, подстрочные из генома *B. subtilis*.

большой на 25% конечной плотности культуры (7.5 против 6.2 ОД). Выход ГК увеличился в 2 раза – с 0.9 до 1.8 г/л. Также был экспериментально подтвержден эффект влияния экспрессии собственных генов биосинтеза предшественников на выход про-

дукта. Штаммы с опероном из гиалуронсинтазы с УДФ-глюкозодегидрогеназой разного происхождения демонстрировали различие в продуктивности. Активность УДФ-глюкозодегидрогеназы была выше в 3 раза у штамма с собственным геном *tuaD*,

Таблица 1. Штаммы-продуценты гиалуроновой кислоты на основе *B. subtilis* (культивирование в колбах при 37°C)

Название штамма	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
RB-AB	1A751 amyE::(<i>P_{vegI}</i> - <i>seHasA-seHasB</i>)	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Конститутивный <i>P_{vegI}</i>	0.84	н/д	6.5	[35]
RB-AD	1A751 amyE::(<i>P_{vegI}</i> - <i>seHasA-TuaD</i>)			1.14	н/д	6.0	
RB-ADV	1A751 amyE::(<i>P_{vegI}</i> - <i>seHasA-TuaD, P_{vegI}-vhb</i>)			1.8	н/д	7.5	
TRG223	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>PmHAS</i>), [<i>pHСMС05</i> ::(<i>P_{spac}-tuaD-gtaB</i>)]	<i>Pasteurella multocida</i>	Индукцибельный <i>P_{xyI}</i> , индукцибельный <i>P_{spac}</i>	6.8	4.55	н/д	[37]
PG6181	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>PmHAS</i>), [<i>pHСMС05</i> ::(<i>P_{spac}-gcaD</i>)]			1.68	0.013	н/д	
PP6502	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>PmHAS</i>), [<i>pHСMС05</i> ::(<i>P_{spac}-pgi</i>)]			3	4.54	н/д	
E168A	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>)	<i>S. zooepidemicus</i>	Индукцибельный <i>P_{xyI}</i>	1	1.51	н/д	[38]
E168A/pP43-D	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-tuaD</i>)]		Индукцибельный <i>P_{xyI}</i> конститутивный <i>P₄₃</i>	2	1.76	н/д	
E168A/pP43-DB	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-tuaD, gtaB</i>)]			2.5	1.6	н/д	
E168A/pP43-DBA	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-tuaD, gtaB, pgcA</i>)]			2.1	1.56	н/д	
E168A/pP43-U	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-glmU</i>)]			2.2	1.68	н/д	
E168A/pP43-UMS	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-glmU, glmM, glmS</i>)]			2.6	1.83	н/д	
E168A/pP43-UMSI	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-glmU, glmM, glmS, pgi, KanR</i>)]			2.5	1.82	н/д	
E168A/pP43-DU	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-tuaD, glmU</i>)]			2.2	1.4	н/д	
E168A/pP43-DU-PBMS	168 lacA::(<i>P_{xyI}</i> - <i>hasA</i>), [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P₄₃-tuaD-gluM, P_{veg}-gtaB-glmM-glmS</i>)]			2.7	1.61	н/д	

Таблица 1. Продолжение

Название штамма	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
E168T	168 <i>lacA</i> ::(P _{xyf} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (Δ TTG->TTG)	<i>S. zooepidemicus</i>	Индукцибельный P _{xyf} , конститутивный P ₄₃	1.2	1.57	н/д	
E168G	168 <i>lacA</i> ::(P _{xyf} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (Δ TTG->GTG)			1.18	1.59	н/д	
E168T/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(P _{xyf} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (Δ TTG->TTG); [pP43NMK::(P ₄₃ - <i>tuaD-gluM</i> , P _{veg} - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]			3.2	1.69	н/д	
E168TH/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(P _{xyf} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (Δ TTG->TTG); <i>nagA</i> ::(P _{lepA^{sp-R0}} -H6LHyal), [pP43NMK::(P ₄₃ - <i>tuaD-gluM</i> , P _{veg} - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]	<i>S. equisimilis</i>	Индукцибельный P _{xyf} , конститутивные P _{lepA} , P ₄₃ , P _{veg}	4.35	0.0022	н/д	
E168THR1/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(P _{xyf} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (Δ TTG->TTG); <i>nagA</i> ::P _{lepA^{sp-R1}} -H6LHyal), [pP43NMK::(P ₄₃ - <i>tuaD-gluM</i> , P _{veg} - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]			2.9	0.0026	н/д	
E168THR2/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(P _{xyf} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (Δ TTG->TTG); <i>nagA</i> ::P _{lepA^{sp-R2}} -H6LHyal), [pP43NMK::(P ₄₃ - <i>tuaD-gluM</i> , P _{veg} - <i>gtaB-glmM-glmS</i>)]			3.3	0.003	н/д	
AW008	1A751 <i>amyE</i> ::(P _{grac} - <i>seHas-tuaD</i>)	<i>S. equisimilis</i>	Индукцибельный P _{grac}	0.48	1.7	4	[45]
AW009	1A751 <i>amyE</i> ::(P _{grac} UPmod- <i>seHas-tuaD</i>)			0.97	1.5	6	
AW005-3	1A751 <i>amyE</i> ::(P _{grac} UPmod- <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA</i> ::(P _{xyfA.SphI+} - Γ - <i>pfkA-gRNA.P4INT</i>)			1.6	1.2	5	
AW006-3	1A751 <i>amyE</i> ::(P _{grac} UPmod- <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA</i> ::(P _{xyfA.SphI+} - Γ - <i>pfkA-gRNA.P4INT(10C-A)</i>)	1.7	1.3	5.5			
AW014-3	1A751 <i>amyE</i> ::(P _{grac} UPmod- <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA</i> ::(P _{xyfA.SphI+} - Γ - <i>wvf-gRNA.P92NT(15C-A)</i>)	1.3	1.6	9			
AW016-3	1A751 <i>amyE</i> ::(P _{grac} UPmod- <i>seHas-tuaD</i>), <i>wprA</i> ::(P _{xyfA.SphI+} - Γ - <i>wvf-gRNA.P603NT(10U-C)</i>)	1.4	1.4	4			

Таблица 1. Окончание

Название штамма	Генотип	Источник гена тиауруносинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
AW018-3	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> , <i>UP_{Pmod}</i> -seHas-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> - <i>Δ</i> wf-gRNA.P603NT(10U-C), <i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> - <i>pfkA</i> -gRNA.P41NT)	<i>S. equisimilis</i>	Индущибельный <i>P_{grac}</i> , <i>UP_{Pmod}</i>	2.2	1.5	7.5	
AW019-3	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> , <i>UP_{Pmod}</i> -seHas-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> - <i>Δ</i> wf-gRNA.P603NT(10U-C), <i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> - <i>pfkA</i> -gRNA.P41NT(10C-A))			2.3	1.7	6.5	
AW008	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD)	<i>S. equisimilis</i>	Индущибельный <i>P_{grac}</i>	1.48	1.7	4.2	[48]
AW001-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> -pgsA-clsA)			0.63	2.0	7.7	
AW004-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> -ftsZ-gRNA.P79NT(15C-U))			0.79	1.5	7.8	
AW005-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> -ftsZ-gRNA.P79NT(15C-U))			1.46	1.6	7	
AW007-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> , <i>UP_{Pmod}</i> -pgsA-clsA)		Индущибельные <i>P_{grac}</i> , <i>P_{grac}</i> , <i>UP_{Pmod}</i>	0.8	1.4	7.5	
AW009-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> , <i>UP_{Pmod}</i> -pgsA-clsA), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> -ftsZ-gRNA.P244NT)			0.95	2.0	8	
AW011-4	1A751 amyE::(<i>P_{grac}</i> -seHas-tuaD), <i>thrC</i> ::(<i>P_{grac}</i> , <i>UP_{Pmod}</i> -pgsA-clsA), wprA::(<i>P_{xyIA.SphI}</i> + <i>Г</i> -ftsZ-gRNA.P533NT)			1.05	2.1	7.5	
WA	WB600 Δ upp, [pHY300plk::hasA]	<i>S. ubris</i> *	н/д	0.9	н/д	4.3	[41]
WmA	WB600 Δ upp, Δ sigF, [pHY300plk::hasA]			1.2	н/д	4.8	
WmB	WB600 Δ upp, Δ sigF, [pHY300plk::hasA, tuaD, gtaB]			3.2**	н/д	н/д	
1B	168 [pHY300plk::hasA, tuaD, gtaB]			1.7**	н/д	н/д	

* — *S. ubris* не описан в литературе, возможно авторы или редакторы ошиблись с написанием.

** — данные получены культивированием при 32°C.

Таблица 2. Штаммы-продуценты гиалуроновой кислоты на основе *B. subtilis* (культивирование в ферментерах при 37°C)

Штамм	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка		
RB163	A164Δ5 amyE::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gcaD)}	<i>S. equisimilis</i>	Конститутивный P _{amyQ} (<i>P</i> _{scBAN})	н/д	1.5	н/д	[31]		
RB161	A164Δ5 amyE::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gtaB)}			н/д	1.6	н/д	[32]		
TH-1	A164Δ5 amyE::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-seHasB-seHasC-seHasD)}			н/д	1.5	н/д			
RB187	A164Δ5 amyE::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gtaB), Δ<i>cat</i>}			н/д	3.5	н/д			
RB194	A164Δ5 amyE::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD-gtaB), Δ<i>cat</i>, Δ<i>surX</i>}			н/д	3.4	н/д			
RB200	A164Δ5 amyE::(<i>P</i> _{scBAN-seHasA-TuaD), Δ<i>cat</i>, Δ<i>surX</i>}			н/д	4.5	н/д			
1012/pBS5	1012 [<i>pHT01</i> ::(<i>P</i> _{grac-hasA-tuaD)]}			<i>S. zoepidemicus</i>	Индукцибельный P _{grac}	7.5	0.2–0.4	н/д	[36]
1012/pBS5	1012 [<i>pHT01</i> ::(<i>P</i> _{grac-hasA-tuaD)]}					3.3*	1.5–2*	н/д	
WB800N/pBS5	WB800N [<i>pHT01</i> ::(<i>P</i> _{grac-hasA-tuaD)]}			<i>S. zoepidemicus</i>	Индукцибельный P _{xyI} *, конститутивные P _{lepA} , P ₄₃ , P _{veg}	4.0	0.5–0.8	н/д	
E168T/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(<i>P</i> _{xyI-hasA}), <i>pfkA</i> ^(ATG->TTG) , [<i>pP43NMMK</i> ::(<i>P</i> _{43-tuaD-gluM} , P _{veg-gtaB-glmM-glmS})]					6	1.42	21	[38]
E168TH/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(<i>P</i> _{xyI-hasA}), <i>pfkA</i> ^(ATG->TTG) , <i>nagA</i> ::(<i>P</i> _{lepA-sp-R0-H6LHyaI}), [<i>pP43NMMK</i> ::(<i>P</i> _{43-tuaD-gluM} , P _{veg-gtaB-glmM-glmS})]	19.38	0.0066			28			
E168THR1/pP43-DU-PBMS	168 <i>lacA</i> ::(<i>P</i> _{xyI-hasA}), <i>pfkA</i> ^(ATG->TTG) , <i>nagA</i> ::(<i>P</i> _{lepA-sp-R1-H6LHyaI}), [<i>pP43NMMK</i> ::(<i>P</i> _{43-tuaD-gluM} , P _{veg-gtaB-glmM-glmS})]	9.18	0.018	23					

Таблица 2. Окончание

Штамм	Генотип	Источник гена гиалуронсинтазы	Промотор оперона	Выход, г/л	МВ, МДа	ОД ₆₀₀	Ссылка
E168THR2/pP43-DU-PBMS	168 lacA::(<i>P</i> _{xyI} - <i>hasA</i>), <i>pfkA</i> (<i>ATG->TTG</i>); <i>nagA</i> :: <i>P</i> _{lepA-sp-R2-H6LHyal} , [<i>pP43NMK</i> ::(<i>P</i> _{43-tuaD-gluM} , <i>P</i> _{veg-gtaB-glmM-glmS})]	<i>S. zooepidermicus</i>	Индукцибельный <i>P</i> _{xyI} - конститутивные <i>P</i> _{lepA} , <i>P</i> ₄₃ , <i>P</i> _{veg}	7.13	0.0496	24	[38]
AM2640	168 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{ppsf-gsib-seHasA-tuaD})	<i>S. equisimilis</i>	Конститутивный тандемный <i>P</i> _{ppsf-gsib}	1.8	н/д	н/д	[43]
AM2681	168 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{ppsf-gsib-seHasA-tuaD}), <i>P</i> _{ppsf-gsib-gtaB}			2.21	н/д	н/д	
AM2686	168 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{ppsf-gsib-seHasA-tuaD}), <i>P</i> _{ppsf-gsib-gcaD-prs}			2.83	н/д	н/д	
AM2694	168 <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{ppsf-gsib-seHasA-tuaD}), <i>P</i> _{ppsf-gsib-gtaB} , <i>P</i> _{ppsf-gsib-gcaD-prs}			3.21	н/д	н/д	
WmB	WB600 Δ <i>upp</i> , Δ <i>sigF</i> , [<i>pHY300pk</i> :: <i>hasA-tuaD-gtaB</i>]	<i>S. ubris</i> ****	н/д	3.65**	0.392**	20	[41]
	3.4			0.45	17		
	1.6***			6.973***	7.5		
KCNHA10	3NA <i>amyE</i> ::(<i>P</i> _{hyper-srank-szHasA-tuaD-gtaB-gcaD})	<i>S. zooepidermicus</i>	Индукцибельный <i>P</i> _{hyer-srank}	7	0.953	н/д	[53]

Примечание. Данные получены культивированием при: * – 30°C, ** – 32°C, *** – 47°C.
**** – *S. ubris* не описан в литературе, возможно авторы или редакторы ошиблись с написанием.

чем с гетерологичным *hasB*. Отличие в активности приводило к увеличению выхода ГК на 36%.

Применение индуцируемого промотора для экспрессии оперона биосинтеза ГК позволило получать ГК с различным МВ [36]. Условия ферментации и время культивирования оказывали определяющее влияние на МВ и выход ГК. Так, проведение ферментации в течение 80–160 ч приводило к получению продукта с МВ 0.1–0.5 МДа, 40–80 ч – 0.5–1 МДа, а 12–40 ч – 1.0–2.0 МДа. Однако для эффективной и безопасной для клеток экспрессии оперона понадобилось проводить селекцию трансформантов на градиенте ИПТГ и экспериментально определять рабочую концентрацию индуктора.

Двухэтапная контролируемая экспрессия с различными индукторами также позволяла варьировать МВ ГК [37]. Экспрессия интегрированной гиалуронсинтазы PmHAS контролируется индуцибельным промотором P_{xyI}, в то время как оперон на плазмиде контролируется индуцибельным промотором P_{spac}. В случае одновременной индукции кассеты и оперона на 2-м часе с начала культивирования штамма TPG223 продукция ГК достигает 6.8 г/л при МВ 3.38–4.55 МДа. Индукция кассеты PmHAS на 8-м часу, а оперона *tuaD-gtaB* на 2-м часу демонстрирует снижение продукции ГК до 3.1 г/л при значительном снижении МВ – до 0.006–0.008 МДа.

Было проведено систематическое исследование влияния гиперэкспрессии генов биосинтеза предшественников УДФ-глюкуроновой кислоты и УДФ-N-ацетилглюкозамина на выход и МВ ГК [38]. Наилучшие показатели с выходом 2.7 г/л и МВ в 1.61 МДа демонстрирует штамм E168A/pP43-DU-PBMS, содержащий в составе оперонов гены полного пути биосинтеза УДФ-глюкуроновой кислоты *tuaD-gluM* и УДФ-N-ацетилглюкозамина *gtaB-glmM-glmS*. Выявлена положительная корреляция между экспрессией генов биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина и повышением МВ продукта, что не выявляется для генов биосинтеза УДФ-глюкуроновой кислоты.

Впервые продемонстрирована возможность повышения продуктивности штаммов-продуцентов путем снижения расхода предшественника УДФ-N-ацетилглюкозамина фруктозо-6-фосфата в пути гликолиза. Снижение экспрессии гена 6-фосфофруктокиназы *pfkA*, которая является первым звеном для конверсии фруктозо-6-фосфата в пути гликолиза, осуществлено через замену иницирующего кодона АТГ на варианты ТТГ и ГТГ. Штамм E168T/pP43-DU-PBMS, который отличается от E168A/pP43-DU-PBMS только заменой кодона АТГ на ТТГ гена *pfkA*, демонстрировал по сравнению с последним увеличенный с 2.7 до 3.2 г/л выход ГК при схожей скорости роста и МВ продукта.

Также продемонстрирована возможность получения низкомолекулярной ГК с помощью гетерологичной экспрессии гиалуронидазы в штамме-продуценте ГК. Низкомолекулярные фракции и олигосахариды ГК с заданной массой ранее получали с помощью ферментативного гидролиза *in vitro* рекомбинантной гиалуронидазой пивовок LHyal [39]. Степень деполимеризации ГК зависит от концентрации гиалуронидазы, поэтому для получения фракций с заданной массой уровень гиалуронидазы LHyal, экспрессируемой с конститутивного промотора P_{era}, варьировали с помощью библиотеки сайтов связывания с рибосомой [40]. Кассеты с LHyal интегрировали в геном штамма E168T/pP43-DU-PBMS, который содержал модификацию стартового кодона гена *pfkA* и полные пути биосинтеза предшественников. В результате наблюдали увеличение выхода ГК с соответствующим снижением МВ – 4.35, 2.9 и 3.3 г/л при 0.0022, 0.0026 и 0.003 МДа для различных вариантов соответственно. Масштабирование ферментации подтвердило ступенчатый характер изменения масс получаемых фракций и увеличение выхода ГК. Наблюдалась большая плотность культур штаммов с гиалуронидазой, что связано с лучшими условиями по доступности кислорода.

Экспрессия гиалуронидазы пивовки с чувствительной к температуре плазмиды pKSV7 в штамме-продуценте WmB приводила к получению ГК различной массы при различной температуре [41, 42]. Культивирование при перmissive температуре в 32°C приводило к снижению МВ ГК с 0.392 до 0.00861 МДа.

Увеличение выхода ГК также наблюдается при замене промоторов у геномных копий генов биосинтеза предшественников, что приводит к увеличению их экспрессии и позволило обойтись без необходимости расширения рекомбинантного оперона [43, 44]. Замена на сильный тандемный промотор Prpsf-gsib промоторов генов *gtaB* и *gcaD* позволила без расширения минимального оперона *seHasA-tuaD* достичь продуктивности в 2.35 и 3.21 г/л при культивировании в течение 24 и 48 ч соответственно. Применение тандемного промотора Prpsf-gsib позволяет обеспечить более эффективный профиль экспрессии целевых генов и соответственно более эффективную продукцию целевого продукта. Промотор PrpsF относится к наиболее сильным промоторам в геноме *B. subtilis* и обеспечивает максимально высокий уровень транскрипции на логарифмической стадии роста. Инициация транскрипции гена *gsiB* иницируется с участием альтернативной сигма-субъединицы σ^B и достигает максимума на стационарной фазе роста. Увеличение экспрессии генов биосинтеза предшественников положительно сказывается на выходе продукта, что подтверждает и дополняет выводы предшествующих исследований.

Дальнейшее развитие подхода с частичным перенаправлением метаболических потоков с пентозофосфатного пути и гликолиза на биосинтез ГК продемонстрировало существенный потенциал данного направления для увеличения выхода ГК [45]. Глюкозо-6-фосфат расходуется в пентозо-фосфатном пути через конверсию глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназой, кодируемой геном *zwf*, в 6-фосфоглюконолактон. Фруктозо-6-фосфат расходуется в пути гликолиза через конверсию 6-фосфофруктокиназой, кодируемой геном *pfkA*, в фруктозо-1,6-бифосфат. Инактивация гена *zwf* приводит к значительному перенаправлению метаболического потока в путь гликолиза, а инактивация гена *pfkA* летальна для *B. subtilis* [46]. Для контролируемого подавления экспрессии генов *zwf* и *pfkA* применен метод CRISPR интерференции, который позволяет варьировать эффективность транскрипции в широких пределах [47]. Подавление транскрипции гена *pfkA* привело, по сравнению с исходным штаммом, к увеличению выхода ГК до 50% с небольшим уменьшением МВ ГК и плотности культуры. Подавление транскрипции гена *zwf* привело к повышению выхода ГК на 44 и 74% только в случае двух вариантов гидовой РНК AW014-3 и AW016-3 соответственно, в то время как остальные снижали выход и МВ продукта.

Одновременное подавление транскрипции генов *pfkA* и *zwf* оказывало значительный эффект на продуктивность штаммов *B. subtilis*. Штаммы с одновременным подавлением транскрипции генов *pfkA* и *zwf* AW018-3 и AW019-3 демонстрировали, по сравнению с базовым штаммом AW009, повышение выхода ГК на 98 и 108% соответственно, при незначительном повышении МВ. Скорость роста штаммов AW018-3 и AW019-3 не отличалась от AW009, однако оказалась выше, чем у штаммов с подавлением либо *pfkA*, либо *zwf*. Также подавление *pfkA* и *zwf* в штаммах AW018-3 и AW019-3 приводило к уменьшению накопления ацетоина в культуральной среде по сравнению с AW009 на 167 и 118% соответственно, что отражало снижение метаболического потока через путь гликолиза. Подавление экспрессии *pfkA* и *zwf* на штамме AW009 дает значительно больший эффект, чем гетерологичная экспрессия генов биосинтеза предшественников *pgcA* и *glmS*.

Предшественники ГК расходуются также в процессах синтеза компонентов клеточной стенки. УДФ-N-ацетилглюкозамин участвует в синтезе тейхоевых кислот и компонентов пептидогликана с помощью ферментов, которые кодируются генами *tagO* и *murAA*. Подавление экспрессии генов *tagO* и *murAA* с помощью интерференции приводило к значительному снижению скорости роста штаммов, генетической нестабильности и потере характерного мукоидного фенотипа.

Создание условий для эффективного функционирования мембранных гиалуронсинтаз с помощью мембранной инженерии позволяет увеличить продуктивность штаммов-производителей ГК [48]. Гиалуронсинтазам 1-го типа требуется наличие в составе мембраны фосфолипида кардиолипина, с которым фермент образует функциональный комплекс *in vivo* и *in vitro* [49]. Кардиолипин составляет незначительную часть липидов клеточной мембраны *B. subtilis*. Биосинтез кардиолипина осуществляется с помощью кардиолипинсинтазы ClsA из фосфатидилглицерола, который в свою очередь синтезируется с помощью фосфатидилглицеролсинтазы PgsA [50]. Штамм *B. subtilis* AW001-4 с конститутивной экспрессией генов *pgsA* и *clsA* продемонстрировал по сравнению с контрольным штаммом AW008 увеличение выхода ГК на 32%, МВ до 2.06 МДа и конечной плотности культуры на 83%. Флуоресцентная микроскопия зафиксировала увеличение содержания кардиолипина в районах полюсов и септы клеток. Инактивация генов биосинтеза других липидов клеточной мембраны фосфатидилэтаноламина *pssA* и нейтральных гликолипидов *ugtP* не оказала эффекта на продуктивность и скорость роста контрольного штамма AW008.

Локализация кардиолипинсинтазы ClsA происходит в районе септы и зависит от гомолога тубулина FtsZ [51]. Подавление экспрессии FtsZ потенциально может привести к распределению ClsA и повысить концентрацию кардиолипина по всей мембране [52]. Подавление транскрипции *ftsZ* у штамма AW001-4 с сильной конститутивной экспрессией *pgsA* и *clsA* приводило к генетической нестабильности. Только штамм AW004-4 сохранял мукоидный фенотип после восстановления из глицеринового стока и синтезировал на 25% больше ГК, чем AW001-4 при незначительном снижении МВ. Подавление транскрипции *ftsZ* у контрольного штамма AW008 тем же вариантом гидовой РНК, что и у AW004-4, приводило к увеличению выхода ГК на 204%, увеличению конечной плотности культуры и снижению МВ до 1.67 МДа. На основе штамма AW007-4 с ослабленной конститутивной экспрессией *pgsA* и *clsA* удалось получить генетически стабильные штаммы с четырьмя вариантами гидовой РНК. Штаммы AW009-4 и AW011-4 продемонстрировали увеличение выхода, МВ и конечной плотности культуры на 10–15% по сравнению со штаммом AW007-4.

Инактивация генов факторов споруляции оказывает влияние на выход и МВ ГК. Штамм WmA с делецией гена сигма-фактора *sigF*, который участвует в активации генной сети ранней споруляции, демонстрирует больший на 30% выход ГК по сравнению со штаммом WA без делеции [41]. Производители на основе штамма WB600 демонстрировали больший выход ГК по сравнению с производителями на основе штамма *B. subtilis* 168.

Так, в оптимальных условиях созданный на основе WB600 штамм WmB с делецией *sigF* накапливал в культуральной среде 3.21 г/л продукта, в то время как штамм 1B на основе 168 только 1.7 г/л. Обнаружен интересный эффект влияния температуры культивирования на МВ ГК. Культивирование при повышенной температуре 47°C приводило к резкому увеличению МВ ГК до 6.973 МДа. Культивирование при 32°C, при котором наблюдалось наибольшее количество продукта, приводило к синтезу ГК с МВ до 0.392 МДа.

Инактивация способности к споруляции в штаммах, полученных путем ненаправленного мутагенеза, положительно влияет на продукцию ГК. Так, штамм 3NA, содержащий мутацию гена инициации споруляции *spo0A*, способен достигать плотности культуры в 75 г/л в условиях ферментации с подпиткой, что делает его отличным кандидатом для использования в промышленности [53]. Оптимизация процесса культивирования и питательной среды позволила штамму KСNNA10, содержащему рекомбинантный оперон с генами *szHasA*, *tuaD*, *gtaB* и *gcaD*, достичь за 12 ч плотности культуры в 29.4 г/л и синтезировать 7 г ГК с МВ 1 МДа на литр культуры. Технико-экономический анализ данного производственного процесса продемонстрировал большую экономическую эффективность, чем у процесса на основе штаммов стрептококков.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММА- ПРОДУЦЕНТА И ПРОДУКТА, И ПУТИ ДАЛЬНЕЙШЕГО РАЗВИТИЯ ШТАММОВ- ПРОДУЦЕНТОВ

Данные, полученные в результате создания бактериальных штаммов-продуцентов ГК, позволяют сделать выводы о влиянии различных генетических факторов на выход и технические характеристики продукта.

Базовый штамм и его модификации

При создании рекомбинантных продуцентов были использованы различные штаммы *B. subtilis*, самым распространенным из которых является штамм 168 и его производные (табл. 3). Важными преимуществами штамма 168 являются способность расти на простых средах, изученная биохимия и генетика, простота генетических манипуляций и высокая эффективность трансформации. Штаммы WB600 и WB800N создавались на базе штамма 168 как платформы для эффективной генетической экспрессии белков [54]. Для увеличения стабильности секретируемых белков в штамме WB800N сделаны делеции генов восьми внеклеточных протеаз — *nprE*, *aprE*, *epr*, *bpr*, *mpr*, *nprB*, *vpr* и *wprA*, а в штамме WB600 делетированы

гены шести протеаз — *nprE*, *aprE*, *epr*, *bpr*, *mpr*, *nprB*. Такие модификации позволяют добиться повышения секреции и стабильности рекомбинантных белков, что актуально и для мембранных белков вроде HasA. Единственное описанное в литературе прямое сравнение эффективности штаммов показало преимущество дефицитного по внеклеточной протеазной активности штамма WB600 с делецией гена *sigF* над штаммом 168 при продукции ГК [41]. Штамм 3NA является мутантной версией штамма 168 со сдвигом рамки считывания гена *spo0A* и характеризуется отсутствием споруляции, низкой экспрессией протеаз и способностью достигать высокой клеточной плотности в условиях ферментации с подпиткой [53]. Штамм 168 и штаммы с мутациями сигма-факторов споруляции в условиях синтетической среды достигают плотности культуры 5–15 г/л, что существенно ниже такового у 3NA [55]. В сравнении со штаммом 168 геном штамма 3NA содержит 425 генетических вариаций, поэтому однозначно сделать вывод о мутации *spo0A* как причине приобретения улучшенных технологических свойств нельзя.

В то же время *B. subtilis* 168 является модельным лабораторным штаммом и в процессе создания прошел многочисленные стадии ненаправленного мутагенеза, что привело к накоплению в его геноме многочисленных мутаций [56]. Сообщается о генетической нестабильности штамма 168 с интегрированным в геном опероном $P_{\text{grac}}\text{-}se\text{Has-tuaD}$ [48]. По неизвестной причине при восстановлении из криохранения этот штамм формировал сегрегированные популяции с большинством клеток дикого немуконидного фенотипа. Такую же генетическую нестабильность продемонстрировал штамм-продуцент на основе BGSC 1A786 (*amyE::cat*, *lacA::spec*, *leuC8*, *metA4*, *hsd(RI)R+M-*). Только продуценты на основе BGSC 1A751 продемонстрировали генетическую стабильность характерного мукоидного фенотипа. Штамм 1A751, являющийся потомком штамма DB104, содержит мутации в генах протеаз *nprE* и *aprE*, а также делеции генов эндо- β -1,3-1,4-глюканазы *bglS* и эндо- β -1,4-глюканазы *bglC* [57].

Штаммы, отличные от *B. subtilis* 168, могут обладать свойствами, которые позволяют ожидать возможный положительный эффект на продукцию ГК. Так, промышленный штамм A164 Δ 5, применяемый для рекомбинантной продукции белков, отличается улучшенными ростовыми характеристиками и высоким выходом секретируемых белков [32]. Штамм A164 Δ 5 является улучшенной модификацией штамма ATCC 6051a, который также превосходит *B. subtilis* 168 по продукции рекомбинантных белков [58]. Модификации, которые позволили улучшить технологические свойства штамма ATCC 6051a, включают делецию генов: биосинтеза сурфактина *surfC* (снижение пенообра-

Таблица 3. Штаммы *B. subtilis*, использованные при создании штаммов-продуцентов гиалуроновой кислоты

Штамм	Генотип	Номер штамма в коллекциях	Ссылки
168	<i>trpC2</i>	BGSC 1A1	[37, 38]
1012	<i>trpC2, leuA8, metB5, hsdRM1</i>	DSM 8773	[36]
WB600	<i>trpC2, ΔnprE, ΔaprE, ΔnprB::EmR, Δbpr, Δmpr, Δepr</i>	–	[41]
WB800N	<i>trpC2, ΔnprE, ΔaprE, nprB::bsr, Δbpr, mpr::ble, Δepr, Δvpr, wprA::hyg, cm::NeoR</i>	–	[36]
3NA	<i>trpC2, spo0A</i>	BGSC 1S1	[53]
A164Δ5	ATCC 6051a <i>ΔamyE, ΔspoIIAC, ΔaprE, ΔnprE, ΔsrfC</i>	–	[31, 32]
BGSC 1A751	<i>His, ΔnprE, ΔaprE, ΔbglS, ΔbglC</i>	BCRC 51921	[35, 45, 48]

Примечание. ATCC – American Type Culture Collection, BGSC – Bacillus Genetic Stock Center, BCRC – Bioresource Collection and Research Center, DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

зования), сигма-фактора F *SpoIIAC* (блокировка спорообразования), протеаз *nprE* и *aprE*, альфа-амилазы *amyE*. Недостатком штамма A164Δ5 является низкая эффективность трансформации, что привело к необходимости использования для генно-инженерных манипуляций промежуточного штамма *B. subtilis* 16844 [32].

Гиалуронсинтаза

Выбор гена гиалуронсинтазы оказывает влияние на продукцию и МВ ГК. При создании штаммов-продуцентов ген гиалуронсинтазы выбирали основываясь либо на данных немногочисленных исследований каталитических свойств ферментов [31, 45, 48], либо по характеристикам продуктивности природных продуцентов [38, 53]. Так, рекомбинантная синтаза seHAS из *S. equisimilis* демонстрирует двукратно большую скорость элонгации, чем рекомбинантная синтаза spHAS из *S. pyogenes* [23, 59].

Прямое сравнение эффективности гиалуронсинтаз из *Streptococcus* было проведено *in vitro* и *in vivo* на платформе *L. lactis* [22]. В одинаковых условиях гиалуронсинтазы различаются по МВ синтезируемой ГК. Максимальный МВ ГК, синтезируемой рекомбинантными штаммами *L. lactis in vivo*, коррелирует с результатами, полученными *in vitro*, и составляет для suHAS из *S. uberis* и spaHAS из *S. parauberis* ~2.2 МДа, для szHAS из *S. zooepidemicus* ~1.4 МДа, для spHAS ~0.4 МДа. Величина МВ ГК хорошо согласуется с филогенетической группировкой по аминокислотным последовательностям гиалуронсинтаз. Так, suHAS и spaHAS образуют одну филогенетическую группу, отличную от szHAS и spHAS. Однако авторам не удалось получить результатов с генами гиалуронсинтаз из *S. equi* subsp. *equi* и *S. iniae* на платформе *Lactococcus in vivo*, хотя штаммы *S. equi* subsp. *equi* известны как эффективные продуценты ГК.

Получены интересные результаты с гиалуронсинтазой 2-го типа из *P. multocida* [37]. В отличие

от синтаз из стрептококков гиалуронсинтаза PmHAS не является мембранным белком и содержит на С-конце якорный домен, который удерживает фермент с внутренней стороны плазматической мембраны. В оперон биосинтеза ГК *P. multocida* входят дополнительные гены, гомологичные белкам мембранных транспортеров – *hexA, hexB, hexC, hexD* [60]. Функции синтеза ГК и трансмембранного переноса ГК у *P. multocida* разделены между синтазой PmHAS и белками *hexA, hexB, hexC* и *hexD* [61, 62]. Гиалуронсинтазы 1-го типа, к которым относятся синтазы стрептококков, совмещают функции синтеза и транслокации цепи ГК во внеклеточное пространство [63]. Было сделано предположение, что в транслокации ГК во внеклеточное пространство *S. pyogenes* задействован ABC-транспортерный комплекс [64]. Однако данная гипотеза опровергается как данными *in vitro* исследований [65, 66], так и опытом успешной гетерологичной продукции ГК на различных микробных платформах с помощью гиалуронсинтаз 1-го типа [18]. Гиалуронсинтаза PmHAS была использована при создании продуцентов ГК на платформах *E. coli* [67], *Agrobacterium* sp. [68] и *Synechococcus* sp. [69]. Экспрессия PmHAS в штаммах *E. coli* и *Agrobacterium* sp. приводила к повышению вязкости культуральной жидкости, что свидетельствовало о внеклеточном накоплении ГК. Распределение синтезированной ГК между внеклеточной, сорбированной на поверхности и внутриклеточной фракциями было выяснено при изучении штаммов-продуцентов, созданных на основе цианобактерии *Synechococcus*. Обнаружено, что от 42 до 88% тотальной ГК накапливалось во внутриклеточном пространстве данных штаммов. Внутриклеточное накопление ГК являлось одной из причин снижения скорости роста продуцентов. Вопрос о механизме экспорта ГК во внеклеточное пространство у рекомбинантных штаммов, экспрессирующих PmHAS, остается открытым. Гиалуронсинтаза PmHAS обладает значительным биотехнологическим по-

тенциалом и способна синтезировать высокомолекулярную ГК. Делеция якорного домена позволяет получить PmHAS в растворимом виде, что делает ее очевидным кандидатом для бесклеточного способа синтеза ГК, который позволяет получать монодисперсный высокомолекулярный продукт [21]. Также фермент PmHAS превосходит стрептококковые гиалуронсинтазы по кинетическим характеристикам: величины K_m ниже стрептококковых в 2 раза и составляют 75 и 20 мкМ для УДФ-*N*-ацетилглюкозамина и УДФ-глюкуроновой кислоты соответственно [70]. Необходима дальнейшая работа для прояснения роли транспортных систем в транслокации ГК во внеклеточное пространство как у штаммов *P. multocida*, так и у рекомбинантных штаммов на основе PmHAS на различных платформах.

Возможность получения PmHAS в растворимой форме облегчает задачу улучшения характеристик фермента эволюционными методами и методами рационального конструирования. Так, комбинирование найденных с помощью эволюционного метода KnowVolution четырех аминокислотных замен позволило получить вариант PmHAS, способный синтезировать ГК с массой до 4.7 МДа [71]. Рациональное конструирование улучшенных вариантов гиалуронсинтаз 1-го типа осложняется отсутствием модели трехмерной структуры белка, хотя методами численного моделирования частично восполняется данный пробел [72]. К настоящему моменту известна только одна работа по улучшению характеристик гиалуронсинтазы szHAS с помощью эволюционного метода [73]. С помощью отбора *in vivo* на штаммах *B. subtilis* удалось выявить вариант szHAS, который продемонстрировал увеличение выхода ГК с 1.22 до 2.24 г/л при увеличении МВ с 1.20 до 1.36 МДа.

Путь биосинтеза предшественников

Геном *B. subtilis* содержит все гены биосинтеза УДФ-глюкуроната и УДФ-*N*-ацетилглюкозамина, однако гетерологичная экспрессия только гиалуронсинтазы не приводит к синтезу ГК. Эффективный биосинтез ГК рекомбинантными продуцентами может осуществляться только с минимального оперона, в который входит, помимо гиалуронсинтазы, ген УДФ-глюкозодегидрогеназы, катализирующий последний этап биосинтеза УДФ-глюкуроната. Дополнение минимального оперона генами биосинтеза УДФ-*N*-ацетилглюкозамина приводит к значительно меньшему эффекту повышения выхода ГК по сравнению с добавлением гена УДФ-глюкозодегидрогеназы [31]. Необходимостью гетерологичной экспрессии УДФ-глюкозодегидрогеназы связана с отсутствием экспрессии гена *tuaD* (гомолога гена *ugd* из *E. coli* и *hasB* из *Streptococcus*), который входит в состав оперона биосинтеза тейхуроновой кислоты *tuaABCDEFGH*. Тейхуроновая

кислота является анионным полимером, синтез которого активируется в условиях фосфатного голодания для замены в составе клеточной стенки богатой фосфором тейхоевой кислоты [74]. Также о принципиальной важности УДФ-глюкозодегидрогеназы свидетельствует факт обязательного наличия гена *hasB* в оперонах биосинтеза ГК у представителей рода *Streptococcus*, где минимальный оперон состоит из генов *hasA* и *hasB* (как у *S. uberis*). Выдвинута гипотеза о возникновении у предкового штамма оперона биосинтеза ГК как пары *hasA/hasB*, в который остальные гены биосинтеза предшественников (*hasC*, *hasD*, *hasE*) добавлялись в процессе эволюции [75]. Делеция гена *hasB* у *S. zooepidemicus* приводит к полной инактивации биосинтеза ГК и оказывает незначительный эффект на ростовые свойства штамма [30]. В ряде работ продемонстрировано накопление ГК штаммами-продуцентами *B. subtilis* с рекомбинантными оперонами, которые не содержат гена *tuaD* или его гомолога [37, 38]. С учетом роли УДФ-глюкозодегидрогеназы и принимая во внимание характер ее экспрессии, представляется необходимым провести дальнейшие исследования по данному вопросу.

Расширение рекомбинантного оперона генами биосинтеза предшественников приводит к увеличению выхода ГК у рекомбинантных штаммов на основе платформ *B. subtilis*, *C. glutamicum* и *L. lactis* [18]. Комбинация различных генов приводит к увеличению выхода ГК с разной эффективностью. Включение в состав искусственного оперона, содержащего *szHas* и *tuaD*, генов *glaB*, *glmM* и *gcaD* приводит к увеличению выхода ГК на 30% [38].

Расширенный оперон биосинтеза ГК оказывает значительное влияние на продукцию ГК у природных продуцентов. Так, штаммы *S. equi* и *S. zooepidemicus*, содержащие в геноме оперон *hasABCDE*, продуцируют существенно больше ГК, чем *S. uberis* и *S. pyogenes*, содержащие *hasABC* и *hasAB* соответственно [75]. Вероятно, включение дополнительных генов в оперон подвидов *S. equi* происходило под давлением селективного отбора на продукцию ГК, что привело к способности направлять до 10% поступающих сахаров в биосинтез ГК [76].

Важным аспектом, влияющим на производительность штамма и МВ продукта, является уровень экспрессии гиалуронсинтазы и генов биосинтеза предшественников. Высокий уровень экспрессии *tuaD*, который является токсичным для *E. coli* и осложняет создание генно-инженерных конструкций [38], может оказать негативное влияние и на физиологию *B. subtilis* [36]. Так, снижение эффективности промотора P_{grac} оперона *seHas-tuaD* привело к увеличению выхода ГК на

100%, снижению МВ на 17% и увеличению конечной плотности культуры на 47% [45].

Уровень экспрессии гиалуронсинтазы и генов биосинтеза предшественников, который зависит от состава рекомбинантного оперона и силы промоторов, определяет баланс УДФ-глюкуроната и УДФ-N-ацетилглюкозоамина в клетке и в конечном итоге МВ продукта. Повышенная по отношению к *hasB* экспрессия *hasA* приводит к снижению МВ ГК, синтезируемой рекомбинантным штаммом *L. lactis* [77]. Гиперэкспрессия генов пути биосинтеза УДФ-глюкуроната у штамма *S. equi* снижает МВ ГК, в то время как гиперэкспрессия генов пути биосинтеза УДФ-N-ацетилглюкозоамина приводит к повышению МВ с 1.8 до 3.4 МДа. Выявлена корреляция между МВ ГК и концентрацией УДФ-N-ацетилглюкозоамина. Биосинтез высокомолекулярной ГК является результатом баланса концентраций предшественников, который может быть доведен до оптимального значения генетическими методами [78]. Для рекомбинантных продуцентов на платформе *L. lactis* оптимальными условиями для синтеза высокомолекулярной ГК являлись: эквимолярная внутриклеточная концентрация УДФ-N-ацетилглюкозоамина и УДФ-глюкуроната и повышенная по отношению к *hasA* экспрессия *hasB* [79]. Схожим эффектом повышения МВ ГК обладает добавление в культуральную среду N-ацетилглюкозоамина, причем как в случае природных продуцентов, так и в случае рекомбинантных продуцентов на основе *B. subtilis* [45].

Энергетический и основной метаболизм

Биосинтез ГК является энергетически затратным процессом. Для получения 1 моля УДФ-N-ацетилглюкозамина и 1 моля УДФ-глюкуроната клетка затрачивает 2 моля глюкозы, 3 моля АТФ, 2 моля УТФ и 1 моль ацетил-КоА. Перспективными подходами к увеличению выхода ГК являются инактивация путей конкурентной утилизации предшественников и повышение уровня синтеза АТФ.

Гомоферментативное брожение, в основе которого лежит гликолиз, — основной способ получения энергии для молочнокислых бактерий, таких как *S. zooepidemicus* и *L. lactis*. Результатом этого процесса является образование двух молекул пирувата, двух молекул НАД · Н₂ и двух молекул АТФ на одну молекулу глюкозы. Регенерация НАД⁺ осуществляется путем переноса двух электронов с НАД · Н₂ на молекулу пирувата, что приводит к образованию лактата. Однако в аэробных условиях молочнокислые бактерии, в клетках которых отсутствует электронно-транспортная цепь, регенерируют НАД⁺ с помощью фермента НАД · Н₂ оксидазы (NOX), что приводит к перенаправле-

нию метаболического потока в сторону образования ацетата и образованию дополнительной молекулы АТФ на молекулу глюкозы в реакции, катализируемой ацетаткиназой (АК) [80]. Синтез дополнительного АТФ в ацетаткиназной реакции и повышение скорости регенерации НАД⁺ благодаря NOX коррелируют с повышением уровня синтеза ГК продуцентами на основе молочнокислых бактерий. В аэробных условиях *S. zooepidemicus* не только быстрее росли и накапливали биомассу, но и демонстрировали более высокие МВ и уровень биосинтеза ГК по сравнению с анаэробными условиями [81, 82]. Однако прямая гиперэкспрессия NOX в штамме *S. zooepidemicus*, несмотря на увеличение уровня синтеза АТФ на 33% и продукции биомассы на 15%, не приводила к увеличению выхода ГК или изменению МВ. Вероятно, в этом случае основным лимитирующим фактором являлась активность пируватдегидрогеназного комплекса, осуществляющего конверсию пирувата в ацетил-КоА [83]. В то же время рекомбинантные продуценты ГК на основе штамма *L. lactis* с делецией гена *ldh* демонстрировали трехкратное увеличение продукции ГК и МВ ГК [84].

В отличие от стрептококков, которые в присутствии кислорода регенерируют НАД⁺ с помощью NOX и синтезируют дополнительный АТФ с помощью фермента АК, *B. subtilis* используют для этого электронно-транспортную цепь и цикл трикарбоновых кислот [85]. При аэробном культивировании рекомбинантных продуцентов ГК на основе *B. subtilis* побочными продуктами ферментации были ацетат и ацетоин [45]. Однако снижение уровня синтеза ацетата путем инактивации пируват-дегидрогеназного комплекса создает дефицит ацетил-КоА для цикла трикарбоновых кислот, что приводит к снижению выработки АТФ [86]. Инактивация гена *alsD* 2-ацетолактат-декарбоксилазы, участвующей в синтезе ацетоина, негативно отражается на росте штаммов *B. subtilis*, хотя выяснение механизма данного явления требует дальнейших исследований [86].

Увеличение доступности кислорода для клеток является эффективной стратегией активизации биосинтеза ГК, несмотря на то что механизм эффекта различается для молочнокислых бактерий и бацилл. Концентрация кислорода в культуральной среде — лимитирующий фактор при биосинтезе ГК штаммами *S. zooepidemicus* и *B. subtilis* в силу низкой растворимости газообразного кислорода и высокой вязкости растворов ГК [87, 88]. Технологическим решением этой проблемы является повышение кислородной емкости среды путем оптимизации скорости перемешивания и применения кислородных векторов — гидрофобных жидкостей, в которых кислород имеет более высокую растворимость, чем в воде. Такой подход увеличивает выход ГК штаммами *S. zooepi-*

demicus [89]. Существенное увеличение выхода ГК и повышение плотности культуры рекомбинантного штамма *B. subtilis* наблюдалось при применении н-гептана, н-гексадиена, перфлуорометилдекалина и перфлуоро-1,3-диметилциклогексана. Оптимизация условий ферментации — концентрации кислородного вектора, времени его добавления и скорости перемешивания позволяло достичь концентрации ГК в 4.5 г/л всего за 10 ч культивирования [88].

При конструировании штаммов-продуцентов активно используется бактериальный гемоглобин V_{Hb} из грамотрицательной бактерии *Vitreoscilla* [34]. Гемоглобин V_{Hb} усиливает поток кислорода к терминальным оксидазам в условиях гипоксии, поэтому гиперэкспрессия V_{Hb} приводит к увеличению плотности культур, усилению окислительного метаболизма и выхода целевого продукта, особенно в условиях ограниченной доступности кислорода. Экспрессия V_{Hb} в *B. subtilis* приводила к увеличению секреции белков и повышению выхода альфа-амилазы и нейтральной протеазы [90]. Гетерологичная экспрессия V_{Hb} штаммом *S. zooepidemicus* ATCC 39920, продуцирующим ГК, приводила к повышению выхода ГК с 1.61 до 2.16 г/л при снижении МВ с 1.8 до 1.6 МДа [91]. При этом наблюдалось снижение продукции молочной кислоты на 35% на фоне снижения активности лактатдегидрогеназы *ldh* на 41% и повышение активности ацетаткиназы и NOX на 9 и 106% соответственно. Более впечатляющие результаты были получены на продуценте на основе *B. subtilis*, однако влияние коэкспрессии V_{Hb} на МВ ГК в данной работе исследовано не было [35].

УДФ-глюкуронат и УДФ-N-ацетилглюкозамин используются клеткой в биосинтезе компонентов клеточной стенки, а их предшественники глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат расходуются в пентозофосфатном пути и гликолизе. Инактивация путей конкурентной утилизации УДФ-глюкуроната и УДФ-N-ацетилглюкозамина оказывала большее влияние на ростовые характеристики штаммов *B. subtilis* и выход ГК, чем гиперэкспрессия генов пути биосинтеза прекурсоров [38, 45]. Кроме того, штаммы со сниженной активностью *pfkA* и *zwf* демонстрировали пониженный уровень продукции ацетата и ацетоина, что свидетельствует об эффективном перераспределении метаболического потока с побочных продуктов биосинтеза на ГК [45].

Утилизация сахаров

Способом улучшения штаммов-продуцентов является увеличение транспорта и метаболизма источников энергии. Исследована функция генов метаболизма сахарозы и проведена идентификация лимитирующих выход ГК стадий у штамма *S. zooepidemicus* [92]. Первыми стадиями утилизации саха-

розы являются мембранный транспорт с фосфорилированием посредством фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы (кодируется геном *scrA*) с последующим гидролизом сахарозо-6-фосфата сахарозо-6-фосфатгидролазой (кодируется геном *scrB*) до фруктозы и глюкозо-6-фосфата. Гиперэкспрессия *scrB*, в отличие от обратного эффекта гиперэкспрессии *scrA*, увеличивает биомассу на 26% и выход ГК на 30%. Смещение метаболического потока к фруктозо-6-фосфату через делецию гена транспорта фруктозы *fruA* или фосфофруктокиназы *fruK* приводит к повышению выхода ГК на 22 и 27% соответственно без эффекта на клеточный рост. Гиперэкспрессия *scrB* в штаммах с делецией либо *fruA*, либо *fruK* приводит к увеличению выхода ГК на 44 и 55% соответственно.

Основная система транспорта и утилизации сахарозы у *B. subtilis* идентична таковой у *S. zooepidemicus* и состоит из оперона, кодирующего фосфотрансферазу SacP и сахарозо-6-фосфатгидролазу SacA [93]. Замена собственной системы транспорта и метаболизма сахарозы у *B. subtilis* на энергетически более выгодную гетерологичную систему продемонстрирована на продуцентах полиглутаминовой кислоты и 2,3-бутандиола. Комбинация сахарозопермеазы *cscB* из *E. coli* и сахарозофосфорилазы *sucP* из *Bifidobacterium adolescentis* продемонстрировала увеличение потребления сахарозы на 49.4% и продукции полиглутаминовой кислоты на 38.5% по сравнению с неизменным штаммом [94]. Комбинация сахарозопермеазы *cscB* из *E. coli* и сахарозофосфорилазы *gffA* из *Streptococcus mutans* продемонстрировала увеличение выхода продукта на 36% по сравнению с неизменными штаммами [95].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время создана целая линейка штаммов-продуцентов ГК на основе платформы *B. subtilis*. Важными преимуществами данных штаммов являются статус GRAS (Generally Recognized as Safe), низкая стоимость промышленной ферментации, легкость генетических манипуляций и отсутствие эндо- и экзотоксинов. Созданные на основе *B. subtilis* рекомбинантные штаммы-продуценты ГК позволяют получать выход и МВ продукта, сопоставимого с таковым у промышленно освоенных штаммов стрептококков. В то же время проведенные работы выявили ограничения платформы, которые могут быть преодолены с привлечением опыта создания продуцентов ГК на основе других микробных платформ. Анализ опубликованных в литературе данных позволяет утверждать, что сформированы условия для создания промышленной технологии получения ГК на основе штаммов-продуцентов *B. subtilis*.

Авторы благодарят за помощь в подготовке рукописи и ценные замечания к.б.н. О.В. Березину.

Работа частично поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF—193021X0001).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weissmann B., Meyer K.* The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord // *J. Am. Chem. Society.* 1954. V. 76. № 7. P. 1753–1757. <https://doi.org/10.1021/ja01636a010>
2. *Fallacara A., Baldini E., Manfredini S. et al.* Hyaluronic acid in the third millennium // *Polymers.* 2018. V. 10. № 7. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>
3. *Scott J.E., Heatley F.* Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study // *PNAS.* 1999. V. 96. № 9. P. 4850–4855. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4850>
4. *Rwei S.P., Chen S.W., Mao C.F. et al.* Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions // *Biochem. Engineering J.* 2008. V. 40. № 2. P. 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.021>
5. *Pisárčik M., Bakoš D., Čepčan M.* Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 1995. V. 97. № 3. P. 197–202. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03097-W](https://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03097-W)
6. *Laurent T.C., Fraser J.R.E.* Hyaluronan // *The FASEB J.* 1992. V. 6. № 7. P. 2397–2404. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>
7. *Cyphert J.M., Trempus C.S., Garantziotis S.* Size matters: Molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology // *Int. J. Cell Biology.* 2015. V. 2015. P. 563818. <https://doi.org/10.1155/2015/563818>
8. *Robert L., Robert A.M., Renard G.* Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging // *Pathologie-Biologie.* 2010. V. 58. № 3. P. 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.010>
9. *Girish K.S., Kemparaju K.* The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview // *Life Sci.* 2007. V. 80. № 21. P. 1921–1943. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.037>
10. *Jiang D., Liang J., Noble P.W.* Hyaluronan in tissue injury and repair // *Annual Rev. Cell and Developmental Biol.* 2007. V. 23. P. 435–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337>
11. *Heldin P., Lin C.Y., Kolliopoulos C. et al.* Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production // *Matrix Biol.* 2019. V. 78–79. P. 100–117. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.017>
12. *Campo G.M., Avenoso A., D'Ascola A. et al.* 4-mer hyaluronan oligosaccharides stimulate inflammation response in synovial fibroblasts in part via TAK-1 and in part via p38-MAPK // *Current Med. Chemistry.* 2013. V. 20. № 9. P. 1162–1172. <https://doi.org/10.2174/0929867311320090005>
13. *Toole B.P., Ghatak S., Misra S.* Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic // *Current Pharmaceutical Biotechnol.* 2008. V. 9. № 4. P. 249–252. <https://doi.org/10.2174/138920108785161569>
14. *Dovedytis M., Liu Z.J., Bartlett S.* Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review // *Engineered Regeneration.* 2020. V. 1. P. 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.10.001>
15. *Boeriu C.G., Springer J., Kooy F.K. et al.* Production methods for hyaluronan // *Int. J. Carbohydrate Chemistry.* 2013. V. 2013. P. 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/624967>
16. *Shiedlin A., Bigelow R., Christopher W. et al.* Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord // *Biomacromolecules.* 2004. V. 5. № 6. P. 2122–2127. <https://doi.org/10.1021/bm0498427>
17. *Zagorulko Y.Y., Zagorulko E.Y.* Features of hyaluronic acid solutions for intra-articular introduction and recent trends in their development (review) // *Drug Development & Registration.* 2020. V. 9. № 2. P. 45–54. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-45-54>
18. *Oliveira J.D. de, Carvalho L.S., Gomes A.M.V. et al.* Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms // *Microbial Cell Factories.* 2016. V. 15. № 1. P. 119. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4>
19. *Liu L., Liu Y., Li J. et al.* Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives // *Microbial Cell Factories.* 2011. V. 10. P. 99. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-99>
20. *Gunasekaran V., Gowdhaman D., Ponnusami P.* Role of membrane proteins in bacterial synthesis of hyaluronic acid and their potential in industrial production // *Int. J. Biol. Macromolecules.* 2020. V. 164. P. 1916–1926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.077>
21. *Gottschalk J., Elling L.* Current state on the enzymatic synthesis of glycosaminoglycans // *Current Opinion in Chem. Biology.* 2021. V. 61. P. 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.09.008>
22. *Schulte S., Doss S.S., Jeeva P. et al.* Exploiting the diversity of streptococcal hyaluronan synthases for the production of molecular weight-tailored hyaluronan // *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. № 18. P. 7567–7581. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10023-w>
23. *Kumari K., Weigel P.H.* Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C *Streptococcus equisimilis* // *The J. Biol. Chemistry.* 1997. V. 272. № 51. P. 32539–32546. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32539>

24. Oh S.Y., Budzik J.M., Garufi G. et al. Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 2. P. 455–470.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x>
25. DeAngelis P.L., Jing W., Drake R.R. et al. Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida* // *The J. Biol. Chemistry.* 1998. V. 273. № 14. P. 8454–8458.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.8454>
26. Schmidt K.H., Günther E., Courtney H.S. Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos // *Med. Microbiol. Immunol.* 1996. V. 184. № 4. P. 169–173.
<https://doi.org/10.1007/BF02456131>
27. DeAngelis P.L. Hyaluronan synthases: Fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses // *Cell. Mol. Life Sciences: CMLS.* 1999. V. 56. P. 670–682.
<https://doi.org/10.1007/s0001800050461>
28. Weigel P.H., DeAngelis P.L. Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases // *The J. Biol. Chemistry.* 2007. V. 282. № 51. P. 36777–36781.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R700036200>
29. Chong B.F., Blank L.M., McLaughlin R. et al. Microbial hyaluronic acid production // *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 66. № 4. P. 341–351.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4>
30. Zhang Y., Luo K., Zhao Q. et al. Genetic and biochemical characterization of genes involved in hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus* // *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. № 8. P. 3611–3620.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7286-1>
31. Widner B., Behr R., Dollen S. von et al. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* // *Applied Environmental Microbiol.* 2005. V. 71. № 7. P. 3747–3752.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005>
32. Sloma A., Behr R., Widner W. et al. Methods for producing hyaluronan in a recombinant host cell. United States Patent 8093036. 2012.
33. DeAngelis P.L., Papaconstantinou J., Weigel P.H. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes* // *The J. Biol. Chemistry.* 1993. V. 268. № 26. P. 19181–19184.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)36494-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36494-4)
34. Stark B.C., Pagilla K.R., Dikshit K.L. Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation // *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. № 4. P. 1627–1636.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6350-y>
35. Chien L.J., Lee C.-K. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin // *Biotechnol. Progress.* 2007. V. 23. № 5. P. 1017–1022.
<https://doi.org/10.1021/bp070036w>
36. Corsa V., Negro A., Vaccaro S., Messina L. Method for obtaining recombinant host bacterial cells that produce hyaluronic acid. United States Patent 9290785. 2012.
37. Jia Y., Zhu J., Chen X. et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights // *Bioresource Technology.* 2013. V. 132. P. 427–431.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150>
38. Jin P., Kang Z., Yuan P. et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168 // *Metabolic Engineering.* 2016. V. 35. P. 21–30.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.01.008>
39. Jin P., Kang Z., Zhang N. et al. High-yield novel leech hyaluronidase to expedite the preparation of specific hyaluronan oligomers // *Sci. Reports.* 2014. V. 4. P. 4471.
<https://doi.org/10.1038/srep04471>
40. Yuan P., Lv M., Jin P. et al. Enzymatic production of specifically distributed hyaluronan oligosaccharides // *Carbohydrate Polymers.* 2015. V. 129. P. 194–200.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.068>
41. Li Y., Li G., Zhao X. et al. Regulation of hyaluronic acid molecular weight and titer by temperature in engineered *Bacillus subtilis* // *3 Biotech.* 2019. V. 9. № 6. P. 225.
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1749-x>
42. Li Y., Shi Z., Shao Y. et al. Temperature-controlled molecular weight of hyaluronic acid produced by engineered *Bacillus subtilis* // *Biotechnol. Letters.* 2021. V. 43. № 1. P. 271–277.
<https://doi.org/10.1007/s10529-020-03001-0>
43. Миронов А.С., Эрраус Л.Л., Королькова Н.В. и др. Бактерия рода *Bacillus*, продуцирующая гиалуроновую кислоту, и способ получения гиалуроновой кислоты с использованием указанной бактерии. Патент РФ 2719140. 2020.
44. Миронов А.С., Эрраус Л.Л., Баева О.В. и др. Тандемный промотор, функционирующий в бактерии рода *Bacillus*, трансформированная бактерия рода *Bacillus* – продуцент целевого продукта, содержащая указанный промотор, и способ получения целевого продукта с использованием указанной бактерии. Патент РФ 2723722. 2020.
45. Westbrook A.W., Ren X., Oh J. et al. Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis* // *Metabolic Engineering.* 2018. V. 47. P. 401–413.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.016>
46. Fischer E., Sauer U. Large-scale in vivo flux analysis shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism // *Nat. Genetics.* 2005. V. 37. № 6. P. 636–640.
<https://doi.org/10.1038/ng1555>
47. Westbrook A.W., Moo-Young M., Chou C.P. Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis* // *Applied Environmental Microbiol.* 2016. V. 82. № 16. P. 4876–4895.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01159-16>
48. Westbrook A.W., Ren X., Moo-Young M. et al. Engineering of cell membrane to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis* // *Biotechnol. Bioengineering.* 2018. V. 115. № 1. P. 216–231.
<https://doi.org/10.1002/bit.26459>

49. Triscott M.X., van de Rijn I. Solubilization of hyaluronic acid synthetic activity from streptococci and its activation with phospholipids // The J. Biol. Chemistry. 1986. V. 261. № 13. P. 6004–6009. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38485-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38485-5)
50. Salzberg L.I., Helmann J.D. Phenotypic and transcriptional characterization of *Bacillus subtilis* mutants with grossly altered membrane composition // J. Bacteriology. 2008. V. 190. № 23. P. 7797–7807. <https://doi.org/10.1128/JB.00720-08>
51. Kawai F., Shoda M., Harashima R. et al. Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes // J. Bacteriology. 2004. V. 186. № 5. P. 1475–1483. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1475-1483.2004>
52. Nishibori A., Kusaka J., Hara H. et al. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes // J. Bacteriology. 2005. V. 187. № 6. P. 2163–2174. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.2163-2174.2005>
53. Cerminati S., Leroux M., Anselmi P. et al. Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on *Bacillus subtilis* 3NA strain // Applied Microbiol. Biotechnol. 2021. V. 105. № 8. P. 3075–3086. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11246-6>
54. Wu S.C., Yeung J.C., Duan Y. et al. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: Effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production // Applied Environmental Microbiol. 2002. V. 68. № 7. P. 3261–3269. <https://doi.org/10.1128/aem.68.7.3261-3269.2002>
55. Reuß D.R., Schuldes J., Daniel R. et al. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 3NA // Genome Announcements. 2015. V. 3. № 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00084-15>
56. Zeigler D.R., Prágai Z., Rodriguez S. et al. The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains // J. Bacteriology. 2008. V. 190. № 21. P. 6983–6995. <https://doi.org/10.1128/JB.00722-08>
57. Wolf M., Geczi A., Simon O. et al. Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolyzing enzymes in *Bacillus subtilis*: Characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase // Microbiology (Reading, England). 1995. V. 141 (Pt 2). P. 281–290. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-2-281>
58. Kabisch J., Thürmer A., Hübel T. et al. Characterization and optimization of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 as an expression host // J. Biotechnology. 2013. V. 163. № 2. P. 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.034>
59. Tlapak-Simmons V.L., Baggenstoss B.A., Kumari K. et al. Kinetic characterization of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis* // The J. Biol. Chemistry. 1999. V. 274. № 7. P. 4246–4253. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4246>
60. Chung J.Y., Zhang Y., Adler B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1 // FEMS Microbiol. Letters. 1998. V. 166. № 2. P. 289–296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13903.x>
61. Chung J.Y., Wilkie I., Boyce J.D. et al. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A // Infection Immunity. 2001. V. 69. № 4. P. 2487–2492. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2487-2492.2001>
62. Zhang Y.F. Construction and characterization of an acapsular mutant of *Pasteurella multocida* strain P-1059 (A:3) // J. Vaccines & Vaccination. 2013. V. 04. № 04. <https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000184>
63. Hubbard C., McNamara J.T., Azumaya C. et al. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan // J. Mol. Biology. 2012. V. 418. № 1–2. P. 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.053>
64. Ouskova G., Spellerberg B., Prehm P. Hyaluronan release from *Streptococcus pyogenes*: export by an ABC transporter // Glycobiology. 2004. V. 14. № 10. P. 931–938. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh115>
65. Kumari K., Baggenstoss B.A., Parker A.L. et al. Mutation of two intramembrane polar residues conserved within the hyaluronan synthase family alters hyaluronan product size // The J. Biol. Chemistry. 2006. V. 281. № 17. P. 11755–11760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600727200>
66. Medina A.P., Lin J., Weigel P.H. Hyaluronan synthase mediates dye translocation across liposomal membranes // BMC Biochemistry. 2012. V. 13. P. 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-13-2>
67. Mao Z., Shin H.D., Chen R. A recombinant *E. coli* bio-process for hyaluronan synthesis // Applied Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. № 1. P. 63–69. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1963-2>
68. Mao Z., Chen R.R. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. // Biotechnol. Progress. 2007. V. 23. № 5. P. 1038–1042. <https://doi.org/10.1021/bp070113n>
69. Zhang L., Toscano Selão T., Nixon P.J. et al. Photosynthetic conversion of CO₂ to hyaluronic acid by engineered strains of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 // Algal Research. 2019. V. 44. P. 101702. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101702>
70. DeAngelis P.L. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase // Biochemistry. 1996. V. 35. № 30. P. 9768–9771. <https://doi.org/10.1021/bi960154k>
71. Mandawe J., Infanzon B., Eisele A. et al. Directed evolution of hyaluronic acid synthase from *Pasteurella multocida* towards high-molecular-weight hyaluronic acid // ChemBiochem: A Eur. J. Chem. Biology. 2018. V. 19. № 13. P. 1414–1423. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800093>
72. Agarwal G., Krishnan K.V., Prasad S.B. et al. Biosynthesis of hyaluronic acid polymer: Dissecting the role of sub structural elements of hyaluronan synthase // Sci. Reports. 2019. V. 9. № 1. P. 12510. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48878-8>
73. Zhang L., Huang H., Wang H. et al. Rapid evolution of hyaluronan synthase to improve hyaluronan production and molecular mass in *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Letters. 2016. V. 38. № 12. P. 2103–2108. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2193-1>

74. Soldo B., Lazarevic V., Pagni M. et al. Teichuronic acid operon of *Bacillus subtilis* 168 // Mol. Microbiol. 1999. V. 31. № 3. P. 795–805.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01218.x>
75. Blank L.M., Hugenholtz P., Nielsen L.K. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci // J. Mol. Evolution. 2008. V. 67. № 1. P. 13–22.
<https://doi.org/10.1007/s00239-008-9117-1>
76. Blank L.M., McLaughlin R.L., Nielsen L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate // Biotechnol. Bioengineering. 2005. V. 90. № 6. P. 685–693.
<https://doi.org/10.1002/bit.20466>
77. Sheng J.Z., Ling P.X., Zhu X.Q. et al. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: A case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer // J. Applied Microbiol. 2009. V. 107. № 1. P. 136–144.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04185.x>
78. Chen W.Y., Marcellin E., Hung J. et al. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus* // The J. Biol. Chemistry. 2009. V. 284. № 27. P. 18007–18014.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011999>
79. Hmar R.V., Prasad S.B., Jayaraman G. et al. Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (has) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis* // Biotechnology J. 2014. V. 9. № 12. P. 1554–1564.
<https://doi.org/10.1002/biot.201400215>
80. Berezina O.V., Jurgens G., Zakharova N.V. et al. Evaluation of carbon and electron flow in *Lactobacillus brevis* as a potential host for heterologous 1-butanol biosynthesis // Advances in Microbiol. 2013. V. 03. № 05. P. 450–461.
<https://doi.org/10.4236/aim.2013.35061>
81. Fong Chong B., Nielsen L.K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase // Biochem. Engineering J. 2003. V. 16. № 2. P. 153–162.
[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00031-7)
82. Armstrong D.C., Johns M.R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* // Applied Environmental Microbiol. 1997. V. 63. № 7. P. 2759–2764.
<https://doi.org/10.1128/AEM.63.7.2759-2764.1997>
83. Chong B., Nielsen L. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus* // J. Biotechnology. 2003. V. 100. № 1. P. 33–41.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00239-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00239-0)
84. Kaur M., Jayaraman G. Hyaluronan production and molecular weight is enhanced in pathway-engineered strains of lactate dehydrogenase-deficient *Lactococcus lactis* // Metabolic Engineering Communications. 2016. V. 3. P. 15–23.
<https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.01.003>
85. García Montes de Oca L.Y.J., Chagolla-López A., González de Vara L. et al. The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes // J. Bioenergetics Biomembranes. 2012. V. 44. № 4. P. 473–486.
<https://doi.org/10.1007/s10863-012-9454-z>
86. Li S., Huang D., Li Y. et al. Rational improvement of the engineered isobutanol-producing *Bacillus subtilis* by elementary mode analysis // Microbial Cell Factories. 2012. V. 11. P. 101.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-101>
87. Huang W.C., Chen S.J., Chen T.L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation // Biochem. Engineering J. 2006. V. 32. № 3. P. 239–243.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.011>
88. Westbrook A.W., Ren X., Moo-Young M. et al. Application of hydrocarbon and perfluorocarbon oxygen vectors to enhance heterologous production of hyaluronic acid in engineered *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Bioengineering. 2018. V. 115. № 5. P. 1239–1252.
<https://doi.org/10.1002/bit.26551>
89. Lai Z.W., Rahim R.A., Ariff A.B. et al. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed // J. Bioscience Bioengineering. 2012. V. 114. № 3. P. 286–291.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.04.011>
90. Kallio P.T., Bailey J.E. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of alpha-amylase and neutral protease in *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Progress. 1996. V. 12. № 1. P. 31–39.
<https://doi.org/10.1021/bp950065j>
91. Lu J.F., Zhu Y., Sun H.L. et al. Highly efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* R42 derived from heterologous expression of bacterial haemoglobin and mutant selection // Letters in Applied Microbiol. 2016. V. 62. № 4. P. 316–322.
<https://doi.org/10.1111/lam.12546>
92. Zhang X., Wang M., Li T. et al. Construction of efficient *Streptococcus zooepidemicus* strains for hyaluronic acid production based on identification of key genes involved in sucrose metabolism // AMB Express. 2016. V. 6. № 1. P. 121.
<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0296-7>
93. Reid S.J., Abratt V.R. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation // Applied Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. № 3. P. 312–321.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1885-y>
94. Feng J., Gu Y., Quan Y. et al. Construction of energy-conserving sucrose utilization pathways for improving poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus amyloliquifaciens* // Microbial Cell Factories. 2017. V. 16. № 1. P. 98.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0712-y>
95. Feng J., Gu Y., Yan P.-F. et al. Recruiting energy-conserving sucrose utilization pathways for enhanced 2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2017. V. 5. № 12. P. 11221–11225.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03636>

Design of Recombinant *Bacillus subtilis* Strains That Producing Hyaluronic Acid

S. V. Rykov^{a, b, *}, I. Y. Battalova^a, and A. S. Mironov^c

^aLLC “Biotechnologies Transfer Center OKA-BIOTECH”, Moscow, 119421 Russia

^bNational Research Centre “Kurchatov Institute” – GosNIIGenetika, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 117545 Russia

^cEngelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: enterru@yandex.ru

A broad application of hyaluronic acid (HA) in the production of cosmetics and pharmaceuticals increases the demand for high quality substance. In industry, HA is extracted from raw materials of animal origin or produced by fermentation of opportunistic pathogen *Streptococcus*. Biotechnological processes based on microorganisms that are safe for humans are rational and economically viable alternative for HA production. Recombinant *B. subtilis* strains may produce HA with yield and quality comparable to those in industrial streptococci. Variation in genetic, biochemical, and biotechnological factors allows to obtain HA with different molecular weights. Despite the impressive achievements, the potential of the *B. subtilis* platform for design of HA producers was not exhausted.

Keywords: hyaluronic acid, *Bacillus subtilis*, recombinant producer strains.