

Получение штамма мицелиального гриба *PENICILLIUM CANESCENS* со снятой катаболитной репрессией и арабинозной индукцией

Чулкин А. М., Вавилова Е. А., Федорова Т. В., Королева О. В.,
Беневоленский С. В.

*Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н.
Баха РАН*

Штамм мицелиального гриба *Penicillium canescens* F178 – природный продуцент α -галактозидазы и эндо-1,4- α -ксилазы, промышленно значимых ферментов. Экспрессия генов *xyIA* и *bgaS*, кодирующих эти белки, подвержена репрессии D-глюкозой и индуцируется L-арабинозой. Ранее нами был получен мутантный по углеродной катаболитной репрессии (УКР) штамм мицелиального гриба *P. canescens* [1]. Показано, что данная мутация обусловлена изменениями в гене *creA*, кодирующем глобальный регулятор УКР в мицелиальных грибах. Однако даже в мутанте по УКР для экспрессии генов *xyIA* и *bgaS* необходимо было присутствие индуктора - арабинозы. При этом сама L-арабиноза является дорогостоящим субстратом, использование которого при крупномасштабном производстве нерентабельно. Таким образом, актуальной является задача получения мутантных культур гриба, у которых активационный уровень транскрипции целевых генов достигается в отсутствие L-арабинозы.

Для решения поставленной задачи был использован мутантный штамм *P. canescens* PCA-10-4/I-7 (*pgpdA::xlnR, creA-*), у которого была снята УКР транскрипции гена *xlnR* – транскрипционный активатор ксиланолитических генов *P. canescens*. Для чего в геном штамма PCA-10/I-7 была введена методом котрансформации сконструированная плазмидная конструкция, несущая ген *xlnR* *P. canescens* под контролем конститутивного промотора гена *gpdA* глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы *A.nidulans* с селективной плазмидой pSTA-10. Поскольку используемый мутантный штамм содержал в геноме гибридный ген *hrh* гигромицин-Б-фосфотрансферазы *E. coli* под контролем промотора гена *xyIA*, то, искомые мутанты со снятой арабинозной индукцией могли быть отобраны по фенотипу HMR на среде, не содержащей арабинозы. При получении мутантов была подобрана концентрация гигромицина Б (1000 мкг/мл) на среде MM с содержанием глюкозы 0,4% на которой отсутствовал рост конидий штамма. Споровая суспензия штамма PCA-10-4/I-7 (титр $3,2 \times 10^7$) была приготовлена из 14-ти суточной культуры гриба, выращенной на среде MM. Суспензию облучали УФ в течение 20 сек, достигая эффективности выживания спор - 6%. Конидии высевались на агаризованную среду MM, содержащую глюкозу (0,4%), гигромицин Б (1000 мкг/мл) и X-gal (500 мг/л). Чашки инкубировали 7 суток при 30 \pm 186;C, в результате чего было получено 2,5 \times 10⁴ клонов с фенотипом HMR, среди которых было отобрано 36 синих клонов, продуцирующих α -галактозидазу в данных условиях (фенотип *bgaS+*). Отобранные мутанты фенотипа HMR *bgaS+* были переколоты на среду для повторного тестирования фенотипа. По результатам такого тестирования были выявлены синие клоны с воспроизводимым фенотипом и был отобран мутантный клон PCA-10-4/I-7/12, у которого при выращивании в жидкой среде продукция как эндоглюканазы, так и α -галактозидазы, происходила даже в отсутствие индуктора - L-арабинозы. При этом в исходном штамме секреция данных ферментов полностью зависела от добавления индуктора, из чего можно заключить, что мутация в штамме PCA-10-4/I-7/12 снимает индукцию арабинозой в обоих генах *xyIA* и *bgaS*.

Для получения штаммов-продуцентов на основе мутантного штамма PCA-10-4/I-7/12 необходимо также решить задачу введения селективируемой мутации. В качестве такой мутации была использована мутация по гену нитратредуктазы (*niaD*^{#175}). Получение таких мутантов проводили методом индуцированного мутагенеза. Для этого споровую суспензию штамма PCA-10-4/I-7/12 обрабатывали N-нитро-N- нитрозогуанидином (200 мкг/мл) 30 мин при 30 \pm C, отмывали буфером и высевали на чашки со средой MM. Выросшие клоны пересеивали на матричные чашки с различными источниками азота. Отсутствие роста клонов на среде с добавлением 10 mM NaNO₃ и его наличие на других источниках азота говорит о наличии фенотипа *niaD*^{#175}. По результатам проведенного теста отобран мутант с максимальной продукцией α -галактозидазы, обозначенный PCA-10-4/I-7/12 *niaD*^{#175}. В настоящее время проводится работа по получению штамма-продуцента мицелиального гриба *Penicillium canescens* со снятой катаболитной репрессией и арабинозной индукцией на основе полученного мутанта PCA-10-4/I-7/12 *niaD*^{#175}.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.11.2150).

Список литературы

1. Чулкин, А.М., Вавилова, Е.А., Беневоленский С.В. (2011), Молекулярная биология, Т. 45, № 5, с. 1–8.