

# 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  $\beta$ -галактозидазы и эндо-1,4- $\beta$ -кисиланазы, промышленно значимых ферментов. Экспрессия генов *xylA* и *bgaS*, кодирующих эти белки, подвержена репрессии D-глюкозой и индуцируется L-арabinозой. Ранее нами был получен мутантный по углеродной катаболитной репрессии (УКР) штамм мицелиального гриба *P. canescens* [1]. Показано, что данная мутация обусловлена изменениями в гене *cpeA*, кодирующем глобальный регулятор УКР в мицелиальных грибах. Однако даже в мутанте по УКР для экспрессии генов *xylA* и *bgaS* необходимо было присутствие индуктора – арабинозы. При этом сама L-арabinоза 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 отсутствии L-арabinозы.

Для решения поставленной задачи был использован мутантный штамм *P. canescens* PCA-10-4/I-7 (*pgpdA::xlnR*, *cpeA*), у которого была снята УКР транскрипции гена *xlnR* – транскрипционный активатор кисиланолитических 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 конститтивного промотора гена *gpdA* глициеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы *A. nidulans* с селективной плазмидой *pSTA-10*. Поскольку используемый мутантный штамм содержал в геноме гибридный ген *hp4* гигромицин-Б-фосфотрансферазы *E. coli* под контролем промотора гена *xylA*, 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 ММ с содержанием глюкозы 0,4% на которой отсутствовал рост конидий штамма. Споровая суспензия штамма PCA-10-4/I-7 (титр 3,2 × 10<sup>7</sup>) была приготовлена из 14-ти суточной культуры гриба, выращенной на среде ММ. Суспензию облучали УФ в течение 20 сек, достигая эффективности выживания спор - 6%. Конидии высевались на агаризованную среду ММ, содержащую глюкозу (0,4%), гигромицин Б (1000 мкг/мл) и X-gal (500 мг/л). Чашки инкубировали 7 суток при 30 °C, в результате чего было получено 2,5 × 10<sup>4</sup> клонов с фенотипом HMR, среди которых было отобрано 36 синих клонов, продуцирующих  $\beta$ -галактозидазу в данных условиях (фенотип *bgaS*<sup>+</sup>). Отобранные мутанты фенотипа HMR *bgaS*<sup>+</sup> были перекопоты 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  $\beta$ -галактозидазы, происходила даже в отсутствии индуктора – L-арбинозы. 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 *xylA* и *bgaS*.

Для получения штаммов-продуцентов на основе мутантного штамма PCA-10-4/I-7/12 необходимо также решить задачу введения селектируемой мутации. В качестве такой мутации была использована мутация по гену нитратредуктазы (*niaD*). 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 °C, отмывали буфером и высевали на чашки со средой ММ. Выросшие клоны пересевали на матричные чашки с различными источниками азота. Отсутствие роста клонов на среде с добавлением 10 мМ NaNO<sub>3</sub> и его наличие на других источниках азота говорит о наличие фенотипа *niaD*. По результатам проведенного теста отобран мутант с максимальной продукцией  $\beta$ -галактозидазы, обозначенный PCA-10-4/I-7/12 *niaD*. 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*.

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.