

УДК 577.2

Определение копийности целевых генов карбогидраз в рекомбинантных штаммах гриба *Penicillium verruculosum*

© 2019 А.М. ЧУЛКИН¹, В.Ю. КИСЛИЦИН¹, И.Н. ЗОРОВ^{1,2}, А.П. СИНИЦЫН^{1,2}, А.М. РОЖКОВА^{1,*}¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, 119991

*e-mail: amrojko@mail.ru

Поступила в редакцию 03.07.2019 г.

После доработки 12.08.2019 г.

Принята к публикации 07.09.2019 г.

При анализе белкового профиля в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum*, секретирующих β-глюкозидазу *Aspergillus niger* (серия БГЛ) или ксиланазу А *Penicillium canescens* (серия КсилА), были выделены две группы по содержанию целевого белка 1) < 75–85 % и 2) ≤ 15%. Эксперименты по определению копийности целевых генов в рекомбинантных штаммах показали корреляцию между содержанием β-глюкозидазы в ферментных препаратах БГЛ-F10, БГЛ-F12 и количеством копий гена *bgl1* (80% и 21% β-глюкозидазы в БГЛ-F10 и БГЛ-F12 соответствовало 7–8 и 2 копиям гена *bgl1*). Однако, в случае гена *ху1А*, пропорция была нарушена в сторону уменьшения относительного содержания ксиланазы А (50% и 17% ксиланазы А в ферментных препаратах КсилА3 и КсилА4 соответствовали 20–22 и 6 копиям гена *ху1А*). Данный эффект можно объяснить титрованием положительных факторов транскрипции в штамме *P. verruculosum* КсилА3, содержащем 20–22 копии промотора гена *cbh1*.

Ключевые слова: *Penicillium verruculosum*, ПЦР в реальном времени, число копий гена.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57

В настоящее время ферментные препараты карбогидраз (в первую очередь целлюлазы и гемицеллюлазы) находят широкое применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства: в обработке текстильных изделий, в производстве бумаги, кормовых добавок, для осаживания целлюлозных отходов и т.д.

В мировой практике промышленное производство ферментных препаратов осуществляется глубинной ферментацией мицелиальных грибов родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* и др. [1]. Однако секретируемый состав карбогидразных комплексов нативных штаммов, как правило, не оптимален для промышленного применения. Для решения данной проблемы, методами генной инженерии в состав секретируемого комплекса вводят новые ферменты, либо изменяют соотношения уже секретируемых белковых компонентов [2, 3].

Penicillium verruculosum (ВКМ F-3973D) является эффективным продуцентом целлюлозного комплекса с высоким содержанием целлюлозногидролаза (ЦБГ) и эндоглюканаза (ЭГ) [4]. Для решения ряда технических задач, связанных с получением ферментных препаратов с высоким биотехнологическим потенциалом, из штамма *P. verruculosum* ВКМ F-3973D был получен штамм-реципиент *P. verruculosum* 537, а также разработана экспрессионная система на основе промоторной и терминаторной областей гена *cbh1*, кодирующего целлюлозногидролазу I (ЦБГ) – основной компонент целлюлолитического комплекса гриба [5].

Используя экспрессионную и трансформационную системы гриба *P. verruculosum* 537, были созданы рекомбинантные штаммы-продуценты гетерологичных эндо-1,4-β-ксиланазы (КФ 3.2.1.8) *Penicillium canescens* [6] и β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) *Aspergillus niger* [7]. На основе

Список сокращений: БД – база данных; БГЛ – β-глюкозидаза; пн – пары нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПО – программное обеспечение; ЦБГ – целлюлозногидролаза; ЭГ – эндоглюканаза.

рекомбинантных штаммов были получены ферментные препараты, использование которых привело к увеличению выхода восстанавливающих сахаров при осахаривании измельченной осинового древесины на 10 и 50%, соответственно, по сравнению с ферментным препаратом, полученным с помощью исходного штамма *P. verruculosum* 537 [6].

Однако было отмечено, что при экспрессии гетерологичного гена *xyIA*, кодирующего эндо-1,4-β-ксилазу (КсилА), и гена *bglI*, кодирующего β-глюкозидазу (БГЛ), наблюдалась явно выраженная дифференциация полученных рекомбинантных штаммов на «моно»-продукты, содержащие 50–80% целевого фермента, и «гетеро»-продукты с содержанием целевых ферментов около 20%. Кроме того, было обнаружено, что в случае культивирования «моно»-продуктов наблюдается снижение общей продуктивности (содержание внеклеточного белка в КЖ) рекомбинантных штаммов в 1,5 раза.

Цель работы – определить число копий гомологичного гена *cbh1* и число копий гетерологичных генов *xyIA* (*P. canescens*), *bglI* (*A. niger*) в рекомбинантных штаммах, чтобы установить причину наблюдаемого эффекта.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы

Penicillium verruculosum 537 (*ΔniaD*) – реципиентный штамм, ауксотрофный по гену *niaD*, кодирующему нитратредуктазу, и использующий аммонийный азот в качестве источника азота. *P. verruculosum* КсилА4 – «гетеро»-продукт эндо-β-1,4-ксилазы *P. canescens*; *P. verruculosum* КсилА3 – «моно»-продукт эндо-β-1,4-ксилазы *P. canescens*; *P. verruculosum* БГЛ-F12 – «гетеро»-продукт β-глюкозидазы *A. niger*; *P. verruculosum* БГЛ-F10 – «моно»-продукт β-глюкозидазы *A. niger*.

Выделение ДНК

Споры штаммов высевали уколом на агаризованную среду ММ с 10 мМ NH₄Cl в качестве источника азота, и инкубировали 14 дней при 32 °С. Споровой суспензией засеивали 100 мл жидкой среды ММ (5·10⁶ спор/мл), с 10 мМ NH₄Cl, и инкубировали 48 ч на орбитальной качалке (220 об/мин) при 32 °С, после чего из мицелия выделяли ДНК используя набор DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, США).

Клонирование фрагментов референсных генов

Поскольку геном *P. verruculosum* в настоящее время не секвенирован, на первом этапе работы

были получены нуклеотидные последовательности фрагментов референсных генов для данного вида. Для этого было проведено выравнивание нуклеотидной последовательности гена *cbh1*, кодирующего целлобиогидролазу *P. verruculosum*, и нуклеотидных последовательностей из БД Whole-genome shotgun contigs (wgs) for fungi при помощи программы Blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Гриб *Talaromyces adpressus* CBS 142503 был выбран как ближайший гомолог *P. verruculosum*, чей геном был секвенирован и депонирован в GenBank (AN:NHXS00000000). В нуклеотидных последовательностях грибов родов *Talaromyces* и *Penicillium* был произведен поиск полноразмерных генов актина (*actA*), β-тубулина (*tub2*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*). Для поиска гомологичных последовательностей в геноме *T. adpressus* штамма CBS 142503 были выбраны последовательности complete cds: FJ393547.1 (*actA*, *Penicillium marneffeii*), D78154.1 (*tub2*, *Penicillium digitatum*) и EU000324.1 (*gpdA*, *Penicillium marneffeii*). Найденные гомологичные последовательности были использованы для поиска генов *actA*, *tub2* и *gpdA* в других мицелиальных грибах в БД Nucleotide collection (nr/nt) for fungi.

По 8–10 наиболее гомологичных последовательностей для каждого гена из различных грибов были использованы для множественного выравнивания программой AlignX (VNTI v. 10.0) с целью определения консервативных участков генов. На консервативные участки генов *actA*, *tub2* и *gpdA* были выбраны вырожденные праймеры (по два прямых и два обратных для каждого гена), с температурой отжига около 60 °С (табл. 1).

Различные сочетания прямых и обратных праймеров для каждого гена были использованы для проведения ПЦР в градиенте температуры отжига праймеров. В качестве матрицы была использована геномная ДНК штамма *P. verruculosum* 537.

Проба для ПЦР содержала: по 10 пмоль прямого и обратного праймеров (табл.1), 8 мкл 2,5× реакционной смеси М-428 («Синтол», Россия), 50 нг ДНК и ddH₂O до 20 мкл.

Программа ПЦР в градиенте температуры отжига праймеров состояла из трех стадий: 1-я стадия – 5 мин при 95 °С; 2-я стадия – 10 с при 95 °С, 20 с при 52–65 °С, 50 с при 72 °С 35 циклов; 3-я стадия – 10 мин при 72 °С. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) в совместимых 8-луночных низкопрофильных стрипах.

ПЦР-фрагменты были элюированы из агарозного геля с помощью набора Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Очищенные ПЦР-фрагменты после определения концентрации ДНК в образцах на приборе NanoDrop Lite (Thermo Scientific,

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для получения внутренних фрагментов генов *tub2*, *actA* и *gpdA* *P. verruculosum*

Nucleotide sequences of primers used for amplification of internal fragments of *actA*, *tub2* и *gpdA* genes of *P. verruculosum*

Праймер	Структура праймера (5'→3')
PVTUBD1	TGGTAACCAAAT(T/C)GGTGCTGCTT
PVTUBR1	CAGTGTAGTGACCCTTGGCCCA(G/T)TT
PVTUBD2	CAGGCAAATCATCTCTGC(T/C)GAGCA
PVTUBR2	GTAGTGACCCTTGGCCCA(G/T)TTGTTA
PVACTD1	TATCATGATTGGTATGGGC(T/C)AGAA(G/A)G
PVACTR1	CATGACAATGTTGCCGTA(C/G)AG(A/G)TCCT
PVACTD2	TTGAGCACGGTGT(T/C)GTCAC(C/G)AAC
PVACTR2	AGTTGAAGGTGGT(G/C)(A/T)CGTGGATACC
PVGPDD1	GCTCAAGTA(T/C)GAC(T/A)(C/G)CACCCACGG
PVGPDR1	TGGAGGAGGGGAT(A/G)ATGTTCTGGG
PVGPDD2	GTCTC(A/G)T(C/T)GTCAACGGCAAGAAGGT
PVGPDR2	TGGCCATACC(G/T)GT(C/G)AGCTTGC

США), были секвенированы в обе стороны с использованием прямых и обратных праймеров. Полученные хроматограммы анализировали с помощью ПО Chromas v.1.45 и сравнивали с БД Nucleotide collection (nr/nt) for fungi.

ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР)

Для последовательности исследуемых генов *cbh1* *P. verruculosum*, *xylA* *Penicillium canescens* и *bgl1* *Aspergillus niger*, а также для последовательности референсных генов актина *actA*, бета-тубулина *tub2* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *gpdA* *P. verruculosum* с помощью ПО «VNTI v.10.0» были выбраны пары праймеров (один прямой и один обратный) для ПЦР в реальном времени.

Проба для ПЦР в реальном времени содержала по 10 пмоль прямого и обратного праймеров (табл. 2), 8 мкл 2,5× реакционной смеси для ПЦР в реальном времени с красителем EVA Green M-439 («Синтол»), ДНК исследуемого образца и ddH₂O до 20 мкл.

Все пробы наносились в трех повторностях. Для сравнения Cq (количество циклов, необходимое для того, чтобы флуоресценция достигла порогового уровня над шумом) в различных плашках, одинаковые образцы в трех повторностях наносились в каждую плашку для пересекающихся генов.

Программа ПЦР в реальном времени включала три стадии: 1-я стадия – 5 мин при 95 °С, 2-я стадия – 15 с при 95 °С, 45 с при 60 °С 39 циклов,

Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Nucleotide sequences of primers for the real-time PCR

Название	Структура праймера (5'→3')
PVACTQD1	ACAAGAAATCCAGACCGCTTCCC
PVACTQR1	TTTCGAGACCGATGACGGAAGG
ANBGLQD1	CCAATGTTACCGCTATTCTCTGGGG
ANBGLQR1	AATCTTGGTAGGCCTCACGAGTCTTG
PVCBHQD2	CAACATGGGCGCTGCTCTCAA
PVCBHQD2	GAAGTTGTAGGGCAGGAACCACGA
PVGPDQD2	AACGGCAAGCGCTCAAGTTCT
PVGPDQR2	ACCCTTCAAGTGAGCAGAGGCCTT
PVTUBQD1	GCTTCCGGCAACAATATGTCCC
PVTUBQR1	CCGGA CTGACCGAAAACAAAGTTG
PCXYLQD2	CTGCGCAACAGCGTCTTCTACAA
PCXYLQR2	TGAGGGGATTGCAGAGCTTCAAC

с измерением флюоресценции после каждого цикла, 3-я стадия – увеличение температуры от 75 °С до 95 °С с шагом 0,2 °С за 10 с и определение кривой температуры плавления продуктов ПЦР.

Аmplификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad) в совместимых 96-луночных белых низкопрофильных плашках. Для анализа результатов было использовано ПО Bio-Rad CFX Manager v. 3.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение последовательностей референсных генов

Для количественного анализа экспрессии целевых генов *cbh1*, *xylA* и *bgl1* на первом этапе работы был клонирован стандартный набор ПЦР-фрагментов гомологичных референсных (в данном случае, однокопийных) генов *actA*, *tub2* и *gpdA* *P. verruculosum*.

В результате ПЦР с использованием пар праймеров PVACTD1–PVACTR1, PVTUBD1–PVTUBR2 и PVGPDD1–PVGPDR1 в градиенте температур отжига были получены фрагменты ДНК длиной около 570 пн (*actA*), 400 пн (*tub2*) и 450 пн (*gpdA*).

Сравнение нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов референсных генов с БД Nucleotide collection (nr/nt) for Fungi показало, что полученные ПЦР-фрагменты имеют нуклеотидную гомологию >90% с генами актина, β-тубулина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы различных видов грибов родов *Penicillium* и *Talaromyces*, и, следовательно, могут быть использованы для нормирования данных, полученных при проведении количественной ПЦР в реальном времени.

Определение эффективности амплификации генов *actA*, *gpdA*, *tub2*, *cbh1* *P. verruculosum*, гена *xylA* *P. canescens*, гена *bgl1* *A. niger* и подсчет числа копий генов *cbh1*, *xylA* и *bgl1* в рекомбинантных штаммах

Определение эффективности амплификации и копийности генов проводилось методом ПЦР в реальном времени.

Для получения калибровочных кривых эффективности амплификации генов *actA*, *tub2*, *gpdA*, *cbh1*, *xylA* в качестве матрицы использовали плазмиды, содержащие фрагменты референсных генов *P. verruculosum* (структуры плазмид не представлены), и полученные ранее плазмиды с генами *cbh1* *P. verruculosum* [5], *xylA* *P. canescens* [6], и *bgl1* *A. niger* [7]. Значения эффективности амплификации генов и их достоверности, полученные с использованием ПО Bio-Rad CFX Manager v.3.1 приведены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что выбранные для ПЦР в реальном времени праймеры, в подобранных нами условиях ПЦР, обеспечивают эффективную (96,7–97,4%,) амплификацию всех генов (как референсных, так и целевых) с высокой (0,995–0,999) достоверностью.

Для определения копийности генов, в качестве матрицы использовали геномную ДНК рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* КсилаА4, *P. verruculosum* КсилаА3, *P. verruculosum* БГЛ-12, *P. verruculosum* БГЛ-10, а также ДНК реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* 537 (Δ *niaD*).

Гены *actA*, *gpdA* и *tub2* использовались в качестве референсных для определения числа копий исследуемых генов *bgl1*, *cbh1* и *xylA* (рис. 1). В табл. 4 приведены значения числа копий генов, относительного числа копий генов и стандартных ошибок среднего относительного числа копий

Таблица 3

Эффективность амплификации генов *actA*, *bgl1*, *cbh1*, *gpdA*, *tub2*, *xylA* и расчетная достоверность

Efficiency of amplification of *actA*, *bgl1*, *cbh1*, *gpdA*, *tub2*, *xylA* genes and reliability

Ген	Эффективность амплификации, %	Достоверность (R^2)
<i>actA</i> (<i>P. verruculosum</i>)	97,4	0,994
<i>bgl1</i> (<i>A. niger</i>)	96,7	0,999
<i>cbh1</i> (<i>P. verruculosum</i>)	96,7	0,998
<i>gpdA</i> (<i>P. verruculosum</i>)	97,1	0,995
<i>tub2</i> (<i>P. verruculosum</i>)	96,7	0,998
<i>xylA</i> (<i>P. canescens</i>)	96,7	0,997

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОПИЙНОСТИ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ КАРБОГИДРАЗ

генов *bglI*, *cbhI* и *xylA* в штаммах, полученные с использованием ПО Bio-Rad CFX Manager v.3.1, а также целочисленные значения абсолютного числа копий с учетом погрешности.

Ранее авторами был получен компонентный состав ферментных препаратов, который опреде-

ляли по хроматографическому фракционированию препаратов на основе рекомбинантных штаммов КсилА3 и КсилА4 [6], БГЛ-F10 [8], БГЛ-F12 [7] и реципиентного штамма 537 (контроль). Значения продуктивности штаммов и компонентный состав ферментов приведены в табл. 5.

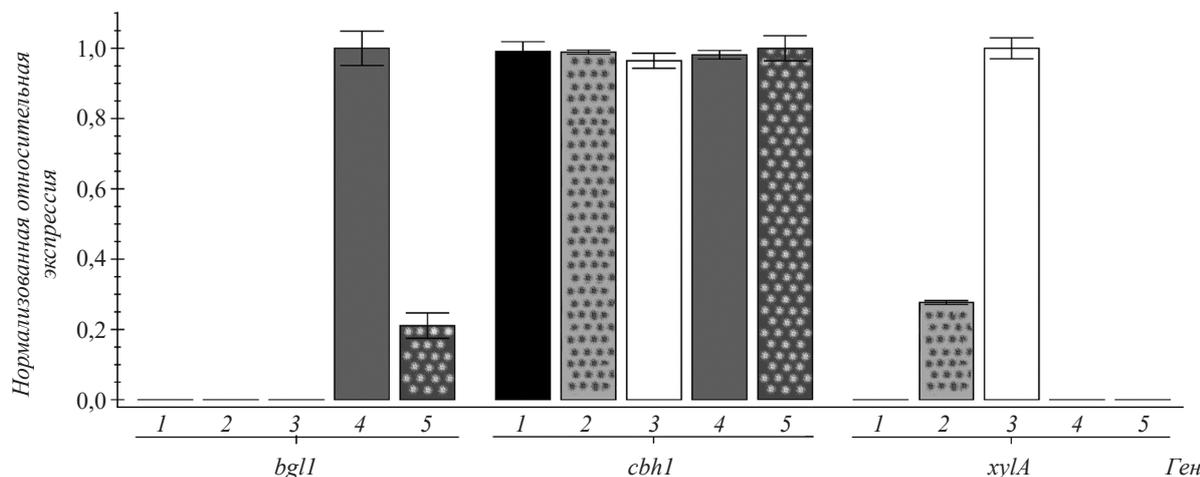


Рис 1. Относительное число копий генов *bglI*, *cbhI* и *xylA* с указанием погрешностей в штаммах: 1 – 537, 2 – КсилА4, 3 – КсилА3, 4 – БГЛ-F10, 5 – БГЛ-F12. Данные получены с использованием ПО Bio-Rad CFX Manager v.3.1

Fig 1. The relative amount of *bglI*, *cbhI* and *xylA* genes copies with an indication of the errors in the strains (1 – 537, 2 – XylAA4, 3 – XylA3, 4 – BGL-F10, 5 – BGL-F12), obtained by the Bio-Rad CFX Manager v.3.1 Software

Таблица 4

Число копий генов *bglI*, *cbhI* и *xylA* в рекомбинантных штаммах
The values of the genes copies number

Ген	Штамм	Число копий	Относительное число копий*	SEM относительного числа копий	Абсолютное число копий
<i>bglI</i>	537 (контроль)	0	0,00010	0,00001	0
	КсилА4	0	0,00001	0,00000	0
	КсилА3	0	0,00001	0,00001	0
	БГЛ-F10	7,85	1,00000	0,04886	7–8
	БГЛ-F12	1,66	0,21087	0,03598	2
<i>cbhI</i>	537 (контроль)	1,01	0,99065	0,02799	1
	КсилА4	1,01	0,98894	0,00595	1
	КсилА3	0,98	0,96446	0,02166	1
	БГЛ-F10	1,00	0,98151	0,01224	1
	БГЛ-F12	1,02	1,00000	0,03583	1
<i>xylA</i>	537 (контроль)	0	0,00000	0,00000	0
	КсилА4	5,79	0,27670	0,00548	6
	КсилА3	20,92	1,00000	0,02977	20–22
	БГЛ-F10	0	0,00004	0,00001	0
	БГЛ-F12	0	0,00006	0,00001	0

Примечание: 537 (контроль) – реципиентный штамм, трансформацией которого плазмидами с гетерологичными генами были получены остальные штаммы. SEM – стандартная ошибка среднего.

*Использовано максимальное число копий соответствующих генов в штаммах в качестве единичного относительного числа копий для генов *cbhI* и *xylA*.

Note: The host strain, which was transformed by plasmids with heterologous genes to obtain recombinant strains. SEM – standard error of the mean.

*As a single *cbhI* and *xylA* genes relative copies number was used the maximum copies number of the corresponding genes in the strains.

Из данных табл. 4 и рис. 1 следует, что в штаммах «моно»-продуцентах *P. verruculosum* БГЛ-F10 и КсилА3, число копий соответствующих генов, *bgl1* и *хy1A*, в 3–4 раза больше, чем в штаммах «гетеро»-продуцентах.

Также, данные табл. 4 и табл. 5 показывают, что количество β-глюкозидазы в ферментных препаратах БГЛ-F10 и БГЛ-F12 соотносится как 80% к 21%, что пропорционально количеству копий гена *bgl1* в соответствующих рекомбинантных штаммах *P. verruculosum* БГЛ-F10 и *P. verruculosum* БГЛ-F12 (7–8 к 2). В случае экспрессии гена *хy1A*, пропорция нарушена в сторону уменьшения относительного количества ксиланазы А в препаратах КсилА3 и КсилА4 (50% и 17%, соответственно) против копийности *хy1A* гена (20–22 к 6) в соответствующих штаммах *P. verruculosum* КсилА3 и *P. verruculosum* КсилА4. Данный эффект объясняется титрованием положительных факторов транскрипции в штамме *P. verruculosum* КсилА3 с 20–22 копиями промотора гена *сbhl1*, что типично для грибных продуцентов [9]. Следует отметить, что количество копий гена *сbhl1* во всех исследуемых штаммах одинаково, а относительное количество белка ЦБГ в штаммах с гетерологичными генами падает.

Гетерологичные гены *bgl1* и *хy1A* имеют меньшую эффективность экспрессии, чем гомологичный ген *сbhl1* (рис. 1). Единичная копия гена *сbhl1* в штамме *P. verruculosum* БГЛ-F12 продуцирует белок ЦБГ с молекулярной массой около 60–66 кДа (суммарно обе формы ЦБГ – с и без целлюлозосвязывающего домена), который составляет 32% всего секретируемого белка, в то время как две копии гена *bgl1* под контролем промотора гена *сbhl1* экспрессируют белок с молекулярной массой около 120 кДа, составляющий только 21% белка. В случае гена *хy1A* эффективность экспрессии также меньше: 6 копий гена *хy1A*, кодирующего белок массой 35 кДа, в штамме *P. verruculosum* КсилА4 производят лишь 17% белка, в то время как единичная копия гена *сbhl1* – 30%. В соответствии с

литературными данными, низкая продуктивность гетерологичных белков характерна для мицелиальных грибов и может быть обусловлена различными факторами, такими как, например неоптимальный выбор регуляторных элементов гена, неправильный процессинг пре-мРНК, низкая стабильность мРНК, «контроль качества» белков и др. [10].

Кроме того, анализ табл. 4 и 5 показал, что введение копий гетерологичных генов не приводит к увеличению секретируемого белка, а понижает его. Из данных, приведенных в табл. 5, следует, что величина секретируемого белка имеет обратную зависимость от содержания гетерологичного белка. Величина снижения белка не пропорциональна числу копий промотора. Это приводит к выводу, что титрование положительных факторов транскрипции является не единственным фактором снижения содержания секретируемого белка.

Таким образом, при экспрессии целевых гетерологичных генов в рекомбинантных штаммах *P. verruculosum* эффект появления «моно»-продуцентов (содержание целевых ферментов до 50–80% от общего секретируемого белка и пониженный уровень секреции общего внеклеточного белка) объясняется, скорее всего, «токсическим» действием гетерологичных генов, что выражается в замещении гомологичных белков (целлобиогидролаз и эндоглюканаз).

Одним из возможных путей сохранения высокого уровня общей продуктивности рекомбинантных штаммов может служить клонирование и экспрессия положительных факторов транскрипции, среди которых можно отметить, по меньшей мере, три транскрипционных фактора – XlnR [11], ClrA и ManR /ClrB [12] или их ортологи Xyr1, CLR-1 и CLR-2. Выяснение молекулярного механизма, посредством которого CLR-1, CLR-2 и Xyr1/XlnR/Xlr1 активируют/репрессируют синтез целлюлаз, станет важным шагом в понимании транскрипционной регуляции генов в низшем грибе *P. verruculosum*.

Таблица 5

Компонентный состав ферментных препаратов (%) и содержание белка (г/л) в КЖ рекомбинантных штаммов [6–8]

The composition of the enzyme preparations (%) and the protein content (g/L) in the culture fluids of the recombinant strains [6–8]

Штамм	С _б , г/л	ЦБГ I + ЦБГ II	ЦБГ I	БГЛ	КсилА	ЭГ
537 (контроль)	40	56	35	0	0	10
КсилА4	35	47	30	0	17	10
КсилА3	20	38	23	0	50	6
БГЛ-F10	15	18	14	80	0	<1
БГЛ-F12	35	43	32	21	0	8

Примечание: С_б – содержание белка (protein conten); ЦБГ – целлобиогидролаза (cellobiohydrolase I и II); БГЛ – β-глюкозидаза (β-glucosidase); ЭГ – эндоглюканаза (endoglucanase); КсилА - ксиланазы А (xylanase A).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-29-07070)

ЛИТЕРАТУРА

1. Gusakov A.V. Alternatives to *Trichoderma* in biofuel productions. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29, 419–425. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.04.004
2. Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, 2009, 27, 297–306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
3. Kumar R., Singh S., Singh, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 35, 377–391. doi: 10.1007/s10295-008-0327-8
4. Morozova V. V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., et al. Cellulases of *Penicillium verruculosum*. *Biotechnol. J.*, 2010, 5, 871–880. doi: 10.1002/biot.201000050
5. Патент №2378372 РФ от 10.01.2010. Синицын А.П., Рожкова А.М., Синецкая О. А. Федорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Винецкий Ю.П., Черноглазов В.М., Зоров И.Н. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, используемого в качестве хозяина. 2010.
6. Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю. и др. Получение биокатализаторов на основе рекомбинантных штаммов-продуцентов гетерологичной ксиланазы в грибе *Penicillium verruculosum*. Применение их для в гидролизе отходов лесной и деревообрабатывающей отраслей промышленности. *Катализ в пром-ти*, 2010, 5, 63–70.
7. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., et al. Heterologous beta-glucosidase in a fungal cellulase system: Comparison of different methods for development of multienzyme cocktails. *Process Biochemistry*, 2015, 50, 1258–1263. doi: 10.1016/j.procbio.2015.05.008
8. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синецкая А.П. Ферментные препараты *Penicillium verruculosum* для биоконверсии растительного сырья – альтернатива коммерческим препаратам, полученным с помощью грибов рода *Trichoderma*. *Биотехнология*, 2013, 3, 69–80.
9. Su X.Y., Schmitz G., Zhang M.L., et al. Heterologous gene expression in filamentous fungi. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2012, 81, 1–61. doi: 10.1016/B978-0-12-394382-8.00001-0
10. Peij van N.M.E., Visser J., de Graaf Leo H. Isolation and analysis of XlnR, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol. Microbiol.*, 1998, 27, 131–142. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00666.x
11. Raulo R., Kokolski M., Archer D.B. The roles of the zinc finger transcription factors XlnR, ClrA and ClrB in the breakdown of lignocellulose by *Aspergillus niger*. *AMB Express*, 2016, 6(1), 5. doi: 10.1186/s13568-016-0177-0
12. Ogawa M., Kobayashi T., Koyama Y. ManR, a transcriptional regulator of the b-mannan utilization system in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013, 77, 426–429. doi: 10.1271/bbb.120795

Determination of Copy Number of Target Carbohydrase Genes in the *Penicillium verruculosum* fungus Recombinant Strains

A.M. CHULKIN¹, V.Yu. KISLITSIN¹, I.N. ZOROV^{1,2}, A.P. SINITSYN^{1,2}, and A.M. ROZHKOVA^{1,*}

¹Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: amrojkova@mail.ru

Received July 3, 2019

Revised August 12, 2019

Accepted September 7, 2019

Abstract—The protein profiles of the culture liquids of recombinant *Penicillium verruculosum* strains that secreted an *Aspergillus niger* β-glucosidase (BGL series) or a *Penicillium canescens* xylanase A (XYLA series) have been previously analyzed. It was shown that the producers were divided into two groups according to the target protein content: 75–85% (1) and no more than 15% (2). It was established in this work that the copy number of the target gene *bglI* in the recombinant strains correlated with the β-glucosidase content in the BGL-F10 and BGL-F12 enzyme preparations. However, this proportion was violated in the direction of decreasing the xylanase A relative amount: the target enzyme content of 50% and 17% in the XylA3 and XylA4 preparations corresponded to 20–22 and 6 copies, respectively, of the *xylA* gene. We believe that this effect is a result of titration of positive transcription factors in the *P. verruculosum* XylA3 strain containing 20 to 22 copies of the *cbhI* gene promoter.

Key words: *Penicillium verruculosum*, real-time PCR, gene copy number

Funding—This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project number: 18-29-07070).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57