

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Биологический факультет**

**Кафедра молекулярной биологии**

Горбель

Вера Дмитриевна

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ASPERGILLUS AWAMORI* С  
ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ КОПИЕЙ ГЕНА ГЛЮКОАМИЛАЗЫ**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:

доцент

Русь О.Б.

Минск 2017

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа содержит 50 страниц, 15 таблиц, 39 литературных источников.

Ключевые слова: глюкоамилаза, мицелиальные грибы, *Aspergillus awamori*, трансформация протопластов, ПЦР.

Объект исследования: мицелиальные грибы *Aspergillus awamori*.

Цель: ввести дополнительную копию гена глюкоамилазы *glaA* в геном мицелиальных грибов *Aspergillus awamori* 1/3а.

Методы исследования: культивирование мицелиальных грибов, трансформация протопластов, качественное и количественное определение глюкоамилазной активности, ПЦР.

Оптимизирован метод трансформации протопластов мицелиальных грибов *Aspergillus awamori*. В ходе шести экспериментов по трансформации отобрано девять трансформантов, образующих мицелий на агаризованной среде Чапека с крахмалом с 300—500 мкг/мл гигромицина В и характеризующихся повышенной способностью гидролизовать крахмал в чашечном тесте.

Встраивание вектора с геном глюкоамилазы в геном *Aspergillus awamori* подтвердили с помощью ПЦР с праймерами рН4-hygf — *glaA1r*, отжигающихся в области Т7 промотора и гена глюкоамилазы соответственно.

При проведении количественной оценки глюкоамилазной активности с помощью реагента с ДНС и глюкозоксидазным-пероксидазным методом показано статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение глюкоамилазной активности у полученных трансформантов в среднем в 2 и более раз.

## РЕФЕРАТ

Дыпломная праца ўтрымлівае 50 старонак, 15 табліц, 39 літаратурных крыніц.

Ключавыя словы: глюкаамілаза, міцеляльныя грыбы, *Aspergillus awamori*, трансфармацыя пратапластаў, ПЦР.

Аб'ект даследавання: міцеляльныя грыбы *Aspergillus awamori*.

Мэта: увесці дадатковую копію гена глюкаамілазы *glaA* ў геном міцеляльных грыбоў *Aspergillus awamori* 1 / 3а.

Метады даследавання: культываванне міцеляльных грыбоў, трансфармацыя пратапластаў, якаснае і колькаснае вызначэнне глюкаамілазнай актыўнасці, ПЦР.

Аптымізаваны метады трансфармацыі пратапластаў міцеляльных грыбоў *Aspergillus awamori*. У ходзе шасці эксперыментаў па трансфармацыі адабрана дзевяць трансформантов, якія ўтвараюць міцэлій на агарызаваным асяроддзі Чапека з крухмалам з 300 -500 мкг/мл гіграміцына В і характарызуюцца падвышанай здольнасцю гідралізаваць крухмал ў чашачным тэсце.

Увядзенне вектара з генам глюкаамілазы ў геном *Aspergillus awamori* пацвердзілі з дапамогай ПЦР з праймерамі pH4-hygf - *glaA1* г, якія аджыгаюцца ў вобласці T7 прамотара і гена глюкаамілазы адпаведна.

Пры правядзенні колькаснай ацэнкі глюкаамілазнай актыўнасці з дапамогай рэагента з ДНС і глюкааксідазным-пераскідазным метадам паказана статыстычна значнае ( $p < 0,05$ ) павелічэнне глюкаамілазнай актыўнасці ў атрыманых трансформантов ў сярэднім у 2 і больш разоў.

## ABSTRACT

Diploma work 50 pages, 15 tables, 39 literary sources.

Key words: glucoamylase, mycelial fungi, *Aspergillus awamori*, protoplast transformation, PCR.

Object of the study: mycelial fungi *Aspergillus awamori*.

Objective: to introduce an additional copy of the glucoamylase gene *glaA* into the genome of mycelial fungi *Aspergillus awamori* 1/3a.

Methods of research: cultivation of mycelial fungi, transformation of protoplasts, qualitative and quantitative determination of glucoamylase activity, PCR.

The method of transformation of protoplasts of mycelial fungi *Aspergillus awamori* was optimized. In the course of six transformation experiments, nine transformants were selected because of forming a mycelium on the agarized Czapek medium with starch with 300-500 µg/ml hygromycin B and characterized by an increased ability to hydrolyze starch in a cup test.

Integration of the vector with the glucoamylase gene into the genome of *Aspergillus awamori* was confirmed by PCR with primers pH4-hygf-glaA1r annealed in the T7 promoter and glucoamylase gene, respectively.

For all strains studied, the results of the measurements proved to be statistically significant ( $p < 0.05$ ), an increase in activity of 200%, in the case of a reagent with dinitrosalicylic acid and glucooxidase-peroxidase method. Thus, in this study, an increase in glucoamylase activity was observed for the *Aspergillus awamori* strains studied after the introduction of an additional copy of the glucoamylase gene in their genome relative to the original strain.