

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии**

АНТОНОВИЧ
Екатерина Дмитриевна

**Получение штамма *Aspergillus awamori* с точечной заменой G137A в
гене глюкоамилазы**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
к.х.н., доцент О. Б. Русь

Минск 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 46 страниц, 18 рисунков, 9 таблиц, 29 источников.

Ключевые слова: глюкоамилаза, сайт-направленный мутагенез, *Aspergillus*, трансформация протопластов, ферментативная активность, термостабильность.

Объект исследования: *Aspergillus awamori* 1/3а.

Цель дипломной работы: количественный анализ ферментативной активности мутантного варианта глюкоамилазы, продуцируемой трансформантами *A. awamori*.

Методы исследования: ПЦР, безлигазное клонирование СРЕС, трансформация протопластов *A. awamori*, культивирование микроорганизмов на селективных средах, колориметрия.

Результаты работы:

1. В результате безлигазного клонирования СРЕС отобрана плаزمида со вставкой мутантного варианта кДНК *glaA* (Gly137Ala) и промоторными и терминаторными областями гена глюкоамилазы *A. awamori*.
2. Проведена трансформация протопластов *A. awamori*, на селективной среде с гигромицином В отобран трансформант, несущий замену Gly137Ala в гене *glaA*.
3. Исследовано влияние температурного фактора на активность полученной мутантной формы глюкоамилазы.
4. Через 10 мин после начала термообработки остаточная активность немутантной формы глюкоамилазы составила ($11 \pm 1\%$), а варианта Gly137Ala – ($21,5 \pm 4\%$).

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: 46 старонак, 18 малюнкаў, 9 табліц, 29 крыніц.

Ключавыя словы: глюкоамілаза, сайт-накіраваны мутагенэз, *Aspergillus*, трансфармацыя пратапластаў, ферментатыўная актыўнасць, тэрмастабільнасць.

Аб'ект даследавання: *Aspergillus awamori* 1/3а.

Мэта дыпломнай работы: колькасны аналіз ферментатыўнай актыўнасці мутантнага варыянту глюкоамілазы, якую прадукуюць трансфарманты *A. awamori*.

Метады даследавання: ПЦР, безлігазнае кланаванне СРЕС, трансфармацыя пратапластаў *A. awamori*, культываванне мікраарганізмаў на селектыўных асяроддзях, калорыметрыя.

Вынікі работы:

1. У выніку безлігазнага кланавання СРЕС адабраная плазмідна з устаўкай мутантнага варыянту кДНК *glaA* (Gly137Ala), прамотарнымі і термінатарнымі ўчасткамі гена глюкоамілазы *A. awamori*.

2. Праведзена трансфармацыя пратапластаў *A. awamori*, на селектыўным асяроддзі з гіграміцынам В адабраны трансфармант, які нясе замену Gly137Ala ў гене *glaA*.

3. Даследаваны ўплыў тэмпературнага фактару на актыўнасць атрыманай мутантнай формы глюкоамілазы.

4. Праз 10 хв пасля пачатку тэрмаабробкі рэшткавая актыўнасць немутантнай формы глюкоамілазы склала (11±1%), а варыянту Gly137Ala – (21,5±4%).

ABSTRACT

Degree work: 46 pages, 28 pictures, 9 tables, 29 sources.

Keywords: glucoamylase, site-directed mutagenesis, *Aspergillus*, protoplast transformation, enzyme activity, thermostability.

Subject of inquiry: *Aspergillus awamori* 1/3a.

Objective: quantitative assay of mutant glucoamylase activity, produced by *A. awamori* transformants.

Research methods: PCR, Circular Polymerase Extension Cloning, *A. awamori* protoplast transformation, microorganism cultivation using selective media, colorimetry.

After optimization of culturing conditions of *A. awamori* 137, the glucoamylase enzyme preparation may be used in biotechnology for starch processing and glucose production.

Результаты работы:

1. As a result of CPEC a plasmid with mutant *glaA* cDNA (Gly137Ala) with *A. awamori* glucoamylase promoter and terminator was obtained.
2. *A. awamori* protoplasts were transformed and selected with a medium containing hygromycin B. The transformant has Gly137Ala substitution in *glaA* gene.
3. Effects of temperature on the activity of the mutant glucoamylase were analyzed.
4. After 10 min of heat treatment the residual activity of wild-type glucoamylase was (11±1%), and (21,5±4%) for Gly137Ala form.