

УДК 579.25+575.11.113+577.152.1

Л.А. Жуковская¹, Р.В. Михайлова¹, Т.В. Семашко¹, А.Г. Лобанок¹,
Д.Г. Ярмолинский², Н.А. Картель²

¹ Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, Минск, 220141,
Беларусь, тел. +375(17)267-62-09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, Минск,
220072, Беларусь, тел. +375(17)294-91-80, e-mail: D.Yarmolinsky@igc.bas-net.by

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ В *PENICILLIUM ADAMETZII* ЛФ F-2044.1

Для клонирования гена gox в P. adametzii ЛФ F-2044.1 сконструирован вектор pNOM102-GOX и отработаны условия получения протопластов гриба. Проведена электропорация P. adametzii ЛФ F-2044.1 и отобраны трансформанты, устойчивые к антибиотику генетицин. Штаммы P. adametzii ЛФ F-2044.1.17 и P. adametzii ЛФ F-2044.1.18 обладали повышенным уровнем синтеза глюкозооксидазы по продуцирующей способности мицелия в 2-2,5 раз. Установлено, что для сохранения векторов в составе трансформантов необходимо их поддержание на среде, содержащей антибиотик.

Ключевые слова: Penicillium adametzii, глюкозооксидаза, трансформация, ген gox.

Глюкозооксидаза (ГО) (β -D-глюкозо: O₂-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4.) — фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконолактона и пероксида водорода. Фермент широко используется в пищевой промышленности в качестве антиоксиданта и консерванта [1], в медицине — в качестве диагностического и терапевтического средства [3]. В химической промышленности фермент применяется для получения гидрохинона, глюконовой кислоты и ее солей [13].

До недавнего времени для усовершенствования промышленных штаммов — продуцентов ферментов использовались методы индуцированного мутагенеза и селекции. Эти методы применяются и теперь, но, наряду с ними, все большее распространение получают методы генетической инженерии, позволяющие создавать функционально активные генетические структуры in vitro из фрагментов геномов различных организмов, вводить рекомбинантные или гибридные молекулы в клетку и получать новые высокопродуктивные штаммы микроорганизмов.

В лаборатории ферментов ГНУ “Институт микробиологии НАН Беларуси” отобран *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 — активный продуцент ГО, характеризующий-

© Л.А. Жуковская, Р.В. Михайлова, Т.В. Семашко, А.Г. Лобанок, Д.Г. Ярмолинский, Н.А. Картель, 2008



ся морфологической и биохимической стабильностью [6]. Из ДНК данного гриба выделен и охарактеризован ген *gox*, кодирующий ГО [4].

Цель работы — провести молекулярное клонирование гена *gox* в *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 и получить рекомбинантные штаммы — продуценты ГО.

Материалы и методы

Для выполнения исследований использовали: *Escherichia coli* DH5 α (генотип supE44 delta lacU169 / phi80 lacZ delta M15/ hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1); плазмиды pUC19, pBluescript II KS (+), p35S-NptII из коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, pNOM102, любезно предоставленную доктором P. Punt (Wageningen Center for Food Sciences (WCFS), Wageningen, The Netherlands), а также ген *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.

В качестве объектов исследования использовали *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 и полученные трансформанты гриба.

Геномную ДНК *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 выделяли по методу Punekar с соавт. [12].

Аmplификацию гена *gox* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с помощью праймеров STAGTCATATGATGGTGTCTGTA-TTTCTCAGC и TCAGAGAATTCCSTAGGCACCTTTTGGCATAGTC, синтезированных в ОДО “Прайм-тех” (Беларусь).

Ген *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 встраивали в плазмиду pNOM102 под контроль промотора глицеральдегидфосфатдегидрогеназы *A. nidulans* и терминатора гена индолглицеролфосфатсинтазы *A. nidulans*.

Клонирование амплифицированных генов *gox*, их рестрикционный анализ, трансформацию в *E. coli* DH5 α и электрофорез в агарозном геле проводили согласно стандартным методам [5].

В качестве селективного агента для *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 применяли генетицин (0,1-0,3 мг/мл).

Протопласты *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 получали ферментативным методом с использованием литических ферментов *Trichoderma harzianum* (“Sigma”, США) (100 мг препарата/1 г мицелия). К суспензии протопластов ($5 \cdot 10^5$) добавляли 16 мкг селективной плазмиды и 16 мкг экспрессионной плазмиды. Электропорацию проводили на приборе “CellJectPro” (“Thermo Electron Corporation”, США) в 10 мм кювете при напряжении 1,1 кВ, сопротивлении 1,54 кОм, электрической емкости 25 мкФ. Для регенерации протопласты инкубировали в жидкой питательной среде в течение 2 ч при температуре 26°C и высевали на чашки с сусло-агаром и селективным агентом. Трансформанты отбирались в два этапа: 1) по устойчивости к селективному агенту, 2) по результатам ПЦР-анализа.

Для обнаружения вставок вектора pNOM102-GOX в трансформированных штаммах *P. adametzii* использовали праймеры *gpdA-F* (CGCAGACCGGGAACA-CAAGC) и *GODPa-R* (CCAGTCAAACCACCACCAGCA). Продукты амплификации разделяли в 1 % агарозном геле в присутствии этидиумбромиды. О положительной амплификации судили по появлению фрагмента длиной 553 п. о.

Анализ вставок вектора p35S-NptII проводили при помощи амплификации с праймерами NptII-F-F (CATGATATCATGATTGAACAAGATGGA) и NptII-F-R (TTAGATATCTCAGAGAАCT-CGTCAAG). В присутствии вставок этого гена наблюдалась амплификация фрагмента длиной 813 п. о.



Способность к образованию внеклеточной ГО трансформантов *P. adametzii* оценивали после их глубинного культивирования на питательной среде Билай с 6 % глюкозы в качестве источника углерода [2].

Культивирование трансформантов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (180 об/мин) при температуре 24-26°C в течение 96 часов. Плотность посева – $0,97-1,5 \cdot 10^6$ спор/мл. Подсчет спор проводили в камере Горяева [7].

Активность внеклеточной ГО определяли спектрофотометрическим методом в модификации Magkwell с соавт. [10], и выражали в ед/мл культуральной жидкости, ед/мг биомассы (продуцирующая способность мицелия).

Редуцирующие вещества (РВ) измеряли, используя 3,5-динитросалициловую кислоту [11]. Белок анализировали по методу Bradford [8], рН – потенциметрически.

Анализ генетической стабильности рекомбинантных штаммов осуществляли на протяжении 6 мес.

Приведенные результаты представляют собой усредненные величины 3-5 опытов, выполненных в трех повторностях.

Результаты исследований обрабатывали статистически, о достоверности различий судили при $P=0,05$.

Результаты и их обсуждение

Для встраивания гена *gox* *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 в плазмиду pNOM102 вводили полилинкер, несущий ряд дополнительных сайтов рестрикции. В буфер, содержащий 10 мМ Tris-HCl (рН 8,0), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА добавляли 100 пмоль олигонуклеотидов Linker NcoI-BamHI – F (CATGGATATCG-GTACCG) и Linker NcoI-BamHI – R (GATCCGGTACCGATATC). Смесь прогревали при 95°C 5 мин на водяной бане и медленно охлаждали до комнатной температуры. ДНК переосаждали спиртом и использовали для лигирования с плазмидой pNOM102, линеаризованной ферментами NcoI и BamHI. Сконструированная плазида обозначена pNOM102-GOX (рис. 1а).

Известно, что векторы, используемые для трансформации, должны иметь генетические маркеры [9]. В связи со сложностью репликации крупных плазмид для трансформации мицелиальных грибов обычно используют 2 вектора: экспрессионный и селективный. При котрансформации частота штаммов, несущих неселективный вектор составляет от 30 до 90 %.

С целью подбора селективного агента *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 был проверен на устойчивость к гигромицину, глифосату и генетицину. Установлено, что *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 чувствителен к указанным соединениям в концентрациях 1,0 мг/мл (гигромицин), 0,25 мг/мл (генетицин), 15,0 мг/мл (глифосат).

Так как чувствительность к генетицину проявлялась в наименьшей концентрации, то данный антибиотик применяли в качестве селективного агента при отборе трансформантов. В опытах использовался вектор p35S-NptII, несущий кассету, состоящую из 35S промотора вируса цветной мозаики капусты, гена неомифосфотрансферазы II (NptII) и терминатора 35S (рис. 1б), взятого из набора реактивов pGreen [14] и придающего трансформантам устойчивость к генетицину. Для прямой трансформации вектор линеаризован EcoRV.



Изучена зависимость образования протопластов от возраста мицелия гриба, инкубационной среды и количества осмотического стабилизатора. *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 выращивали глубинно в течение 24, 36 и 48 часов в жидкой среде, содержащей в качестве источника углерода 1 % глюкозы. По окончании культивирования мицелий отделяли центрифугированием (5 тыс. об/мин, 10 мин), промывали и ресуспендировали в 0,1 М фосфатном буфере с осмотическим стабилизатором, содержащим препарат литических ферментов. Инкубацию проводили в течение 1 - 4 часов при 26 °С в термостате. Лучшие результаты получены при 4-х часовой обработке суточного мицелия литическими ферментами.

При анализе влияния рН на выход протопластов показано, что обработка мицелия гриба ферментами при рН 5,5 (0,1М фосфатный буфер) была неэффективной, протопласты в реакционной среде отсутствовали. Частичный лизис клеточных стенок под действием литических ферментов отмечен при рН буфера 6,5 (выход протопластов составил $2 \cdot 10^4$ на 1 мл), а максимальный выход протопластов ($2 \cdot 10^5 \cdot 8 \cdot 10^5$ на 1 мл) получен при проведении ферментативной обработки грибного мицелия при рН 6,0.

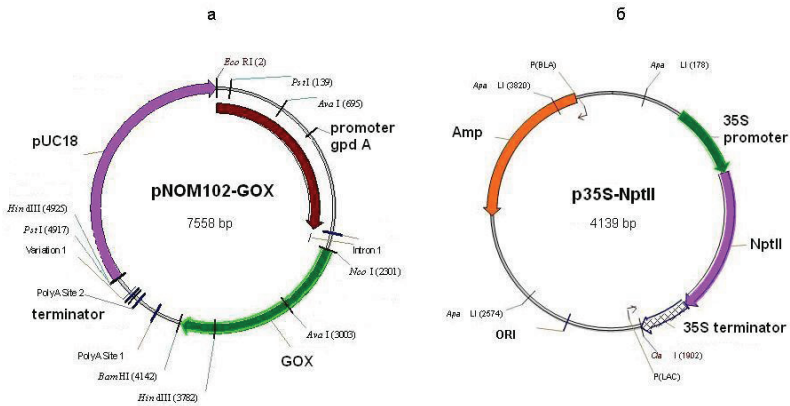


Рис. 1. Карты векторов:

а — экспрессионный вектор pNOM102-GOX; б — селективный вектор p35S-NptII

Fig. 1. Maps of vectors:

а — expression vector pNOM102-GOX; б — selective vector p35S-NptII

В качестве осмотического стабилизатора в работе использовали KCl (0,4-1,0 М). Применение 0,9 М KCl в реакционной смеси оказалось оптимальным для получения протопластов.

Таким образом, установлено, что максимальный выход протопластов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 обеспечивается обработкой 24-часового мицелия гриба литическими ферментами *T. harzianum* при 25°С в течении 2 - 4 часов в фосфатном буфере (рН 6,0), содержащем 0,9 М KCl в качестве осмотического стабилизатора.

Для получения трансформантов протопласты гриба отделяли от мицелия и клеточных остатков, отмывали в STC-буфере. К суспензии протопластов добавляли селективный и экспрессионный векторы и проводили электропорацию.

Отобрано 36 трансформантов *P. adametzii*, устойчивых к генетицину. При помощи ПЦР установлено, что из них 19 штаммов содержали вектор pNOM102-

GOX, несущий ген *gox P. adametzii* ЛФ F-2044.1, и вектор p35S-NptII, несущий ген устойчивости к антибиотику генетицин, а 17 штаммов — только вектор p35S-NptII.

Проведенный анализ полученных трансформантов при их глубинном культивировании показал, что штаммы, несущие только вектор p35S-NptII, практически не отличались от исходной культуры по характеристикам (изменении активной кислотности среды, накоплении биомассы и белка, потреблении глюкозы, уровню синтеза внеклеточной ГО), изучаемых процессов. Это позволяет сделать вывод, что придание *P. adametzii* устойчивости к генетицину не оказывает влияния на рост трансформантов и продукцию фермента.

Штаммы, несущие оба трансформированных гена обладали повышенным уровнем синтеза ГО на 109,51-186,79 % (таблица).

Таблица

Биосинтез ГО рекомбинантными штаммами *P. adametzii*, содержащими векторы pNOM 102-GOX и p35S-NptII

Table

Biosynthesis go recombinant strains *P. Adametzii* contained the vectors pNOM 102-GOX and p35S-NptII

Штаммы <i>P. adametzii</i> ЛФ F-2044.1.	рН	Биомасса, мг/мл	Белок, мкг/мл	РВ, мг/мл	ГО			
					ед/мл	%	ед/мг	%
4	3,2	7,62±0,23	57,20±1,72	3,28±0,10	5,64±0,17	109,51	0,74±0,022	129,82
5	3,2	7,38±0,22	57,64±1,73	3,21±0,10	5,76±0,17	111,84	0,76±0,023	133,33
8	3,1	7,53±0,23	57,75±1,73	3,30±0,10	5,65±0,17	109,71	0,75±0,023	131,58
9	3,1	7,33±0,22	58,00±1,74	3,11±0,10	5,86±0,18	113,79	0,80±0,024	140,35
13	3,1	7,60±0,23	58,40±1,75	3,00±0,09	5,93±0,18	115,15	0,78±0,023	136,84
14	3,2	7,50±0,23	62,00±1,86	2,84±0,09	6,00±0,18	116,50	0,79±0,023	138,60
15	3,1	7,81±0,23	63,56±1,91	2,60±0,08	6,25±0,19	121,44	0,80±0,024	140,50
16	3,2	7,64±0,23	62,89±1,89	2,65±0,08	6,11±0,18	118,64	0,80±0,024	140,35
17	3,1	6,63±0,20	110,90±3,33	1,84±0,06	9,62±0,29	186,79	1,45±0,043	255,00
18	3,1	6,79±0,20	94,50±2,84	2,28±0,07	7,94±0,24	154,20	1,17±0,035	206,00
19	3,2	7,80±0,23	63,12±1,89	2,63±0,08	6,20±0,17	120,39	0,80±0,024	140,35
20	3,1	7,34±0,22	57,80±1,73	3,15±0,09	5,80±0,17	112,62	0,79±0,023	138,60
21	3,0	7,56±0,23	58,53±1,76	3,00±0,09	5,97±0,18	115,92	0,79±0,023	138,60
23	3,2	7,76±0,23	62,70±1,88	2,88±0,09	6,05±0,18	117,48	0,78±0,023	136,84
28	3,1	7,88±0,24	63,30±1,90	2,63±0,08	6,15±0,18	119,42	0,78±0,023	136,84
29	3,1	7,82±0,23	58,00±1,74	3,23±0,10	5,79±0,17	112,43	0,74±0,022	129,82
30	3,2	8,05±0,24	63,12±1,89	2,65±0,08	6,12±0,18	118,83	0,76±0,023	133,33
33	3,1	7,69±0,23	62,34±1,87	2,84±0,09	6,00±0,18	116,50	0,78±0,023	136,84
36	3,1	7,81±0,23	58,21±1,75	3,21±0,10	5,86±0,18	113,79	0,75±0,023	131,58
контроль	3,1	9,04±0,27	56,40±1,69	3,54±0,11	5,15±0,15	100,00	0,57±0,017	100,00

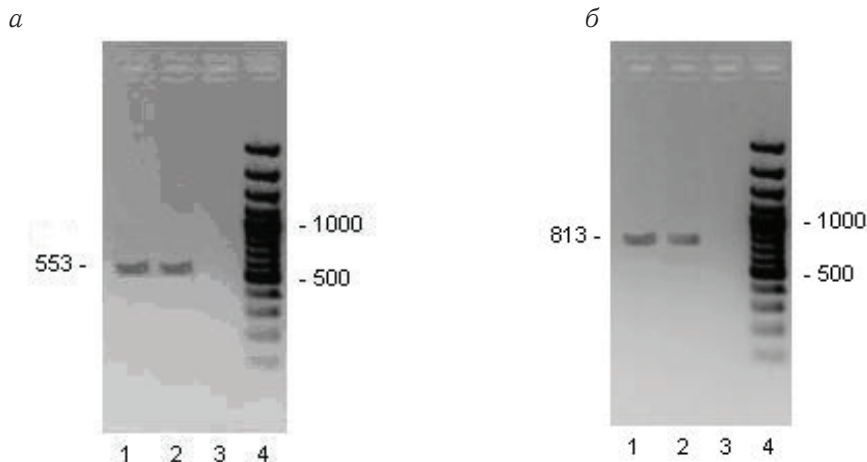


Ферментации этих штаммов проходили при изменении pH с 5,0 до 3,0-3,2. Грибы накапливали 6,63 - 8,05 мг биомассы в мл: минимальным этот показатель был у *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.17, а максимальным — у *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.30.

P. adamentzii ЛФ F-2044.1.4, *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.8, *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.29 медленнее других штаммов потребляли глюкозу (3,23-3,3 мг/мл). Для них характерен также более низкий уровень синтеза ГО (5,64-5,79 ед/мл).

Интенсивное потребление источника углерода характерно для трансформантов *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.15, ЛФ F-2044.1.16, ЛФ F-2044.1.17, ЛФ F-2044.1.18, ЛФ F-2044.1.28 (остаточный сахар — 1,84 - 2,65 мг/мл). Что касается внеклеточного белка, то, установлено, что по окончании культивирования его количество составило 57,2 - 110,9 мкг/мл и коррелировало с уровнем синтеза внеклеточной ГО данными штаммами. Наилучшие результаты по уровню синтеза ГО (154,2 - 186,8 %) и продуцирующей способности мицелия (206 - 255 %) получены у *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.17, *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.18 по сравнению с исходной культурой.

P. adamentzii ЛФ F-2044.1.17 и *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.18 отобраны для дальнейших исследований, как штаммы, обладающие более высоким уровнем синтеза внеклеточной ГО и содержащие оба трансформированных вектора (рис. 2).



P. adamentzii ЛФ F-2044.1.17, 2- *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.18, 3- контроль *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1, 4- маркер (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas))

Рис. 2. ПЦР-анализ наличия векторов pNOM102-GOX (а) и p35S-NptII (б) у трансформантов *P. adamentzii*

Fig. 2. PCR-analysis of presence of vectors pNOM102-GOX (a) and p35S-NptII (б) in *P. adamentzii* transformants

Изучено влияние условий поддержания *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adamentzii* ЛФ F-2044.1.18 на способность синтезировать внеклеточную ГО. По результатам ПЦР анализа данных штаммов, поддерживаемых в течение 6 мес в неселективных и селективных условиях, установлено, что в первом случае происходит утрата трансформированного гена (рис. 3). Следовательно, для сохранения трансформированных генов в рекомбинантных штаммах *P. adamentzii* необходимо поддержание культур на средах, содержащих селективный агент.

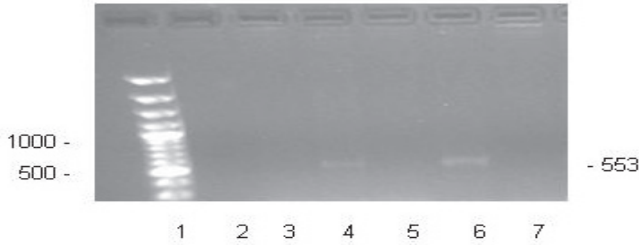


Рис. 3. ПЦР-анализ ДНК рекомбинантных штаммов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, поддерживаемых в течение 6 мес в селективных и неселективных условиях

Fig. 3. PCR-analysis of DNA of recombinant *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 and *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 strains maintained during 6 months in selective and nonselective conditions

1 – маркер (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas)), 2 – контроль (исходный штамм *P. adametzii* ЛФ F-2044.1), 3 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, хранимый в неселективных условиях, 4 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17, хранимый в селективных условиях, 5 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, хранимый в неселективных условиях, 6 – *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, хранимый в селективных условиях, 7 – отрицательный контроль ПЦР

Таким образом, в результате выполненных исследований сконструирован вектор pNOM102-GOX, отработаны условия получения протопластов *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 и проведена трансформация гриба. По устойчивости к генетицину и наличию трансформированных генов отобраны трансформанты *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 и *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18, обладающие повышенным уровнем синтеза ГО по продуцирующей способности мицелия в 2-2,5 раз.

Авторы выражают благодарность доктору P. Punt (Wageningen Center for Food Sciences (WCFS), Wageningen, The Netherlands) за предоставленную плазмиду pNOM102.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андеркофлер Л. М. Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. / Под ред. Р. В. Фениксовой. – М.: Пищепромиздат, 1963. – С. 73–88.
2. Билай В. И. Основы общей микологии // Киев: Вища школа, 1974. – 396 с.
3. Билай В. И., Пидопличко И. М., Артемчук Н. Я. Белки в медицине и народном хозяйстве. / Отв. ред. М. Ф. Гулый. – Киев: Наук думка, 1965. – С. 124–131.
4. Жуковская Л. А., Ярмолинский Д. Г., Михайлова Р. В., Семашко Т. В., Картель Н. А., Лобанок А. Г. Секвенирование и характеристика гена глюкозооксидазы *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. – 2008. – № 1. – С. 69-73.
5. Маниатис Т., Фрич Э. Молекулярное клонирование // М.: Мир, 1984. – 479 с.

6. Михайлова Р. В., Жуковская Л. А., Лобанок А. Г. Изучение спонтанной изменчивости *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044 — продуцента глюкозооксидазы // Прикл. биохимия и микробиология. — 2007. — Т.43. — № 2. — С. 207-211.
7. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. // М.: МГУ, 1971. — С. 142-146.
8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Annal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
9. Diez R. B. Strategies for the transformation of filamentous fungi // Journal of Applied Microbiology. — 2002. — Vol. 92. — P. 189-195.
10. Markwell I., Frakes L. G., Brott E. C., Osterman I, Wagner F. W. *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1989. — Vol. 30. — № 2. — P. 166–169.
11. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. — 1959. — Vol. 31. — P. 426–428.
12. Punekar N. S. et al Isolation of genomic DNA from acetone-dried *Aspergillus* mycelia // Fungal Genet. Newsl. — 2003. — Vol. 50. — P. 15-16.
13. Roehr M., Kubicek Ch. P., Kominek I. Gluconic acid // In Rehm H. S., Reed G., editors. Biotechnology. — 1996. — Vol. 6. — P. 347-362.
14. Roger H. P. et al pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation // Plant Mol. Bio. — 2000. — Vol. 42. — P. 819-832.



Л. О. Жуковська, Р. В. Міхайлова¹, Т. В. Семашко¹, А. Г. Лобанок¹, Д. Г. Ярмолінський², Н. А. Картель²

¹Інститут мікробіології НАН Білорусі, вул. Купрєвіча, 2, Мінськ, 220141, Білорусь, тел.: +375(17)267-62-09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

²Інститут генетики і цитології НАН Білорусі, вул. Академічна, 27, Мінськ, 220072, Білорусь, тел.: +375(17)294-91-80, e-mail: D.Yarmolinsky@igc.bas-net.by

КЛОНУВАННЯ ГЕНА ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ В *PENICILLIUM ADAMETZII* ЛФ F-2044.1

Реферат

Для клонування гена *gox* в *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 сконструйовано вектор pNOM102-GOX і відпрацьовані умови отримання протопластів гриба. Проведена електропорація *P. adametzii* ЛФ F-2044.1 і відібрані трансформанти, стійкі до антибіотику генетицину. Штами *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.17 і *P. adametzii* ЛФ F-2044.1.18 мали підвищений рівень синтезу глюकोзооксидази по продуктивній здатності міцелію в 2-2,5 рази. Встановлено, що для зберігання векторів в складі трансформантів необхідно їх підтримання на середовищі, що містить антибіотик генетицин.

К л ю ч о в і с л о в а : *Penicillium adametzii*, глюкозооксидаза, трансформація, ген *gox*

L. A. Zhukouskaya¹, R. V. Mikhailova¹, T. V. Semashko¹, A. G. Lobanok¹, D. G. Yarmolinsky², N. A. Kartel²

¹Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Kuprevich str., 2, Minsk, 220141, Belarus, tel.: +375(17)267-62-09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

²Institute of genetic and cytology, Belarus National Academy of Sciences, Academycheskaya str., 27, Minsk, 220072, Belarus, tel. +375(17)294-91-80, e-mail: D.Yarmolinsky@igc.bas-net.by

KLONING OF GLUCOSE OXIDASE GENE IN *PENICILLIUM ADAMETZII* LF F-2044.1

Summary

Vector pNOM102-GOX was engineered to cloning gene *gox* in *P. adametzii* LF F-2044.1 and conditions were optimized for production of fungal protoplasts. Electroporation of *P. adametzii* LF F-2044.1 was conducted and transformants resistant to antibiotic geneticin were selected. Strains *P. adametzii* LF F-2044.1.17 and *P. adametzii* LF F-2044.1.18 displayed increased levels of glucose oxidase synthesis — mycelium productivity rose 2 - 2.5 times. It was found that efficient preservation of vectors in the transformants requires maintenance on the media containing antibiotic geneticin.

К e y w o r d s : *Penicillium adametzii*, glucose oxidase, transformation, gene *gox*

