



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my



Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah



[PustakaTBainun](#)



[ptbupsi](#)

PEMBANGUNAN MUTAN *priT* DAN ANALISIS SEKRETOM UNTUK
MENINGKATKAN KESTABILAN PROTEIN HETEROLOG DALAM
Aspergillus niger

NURHAIDA BINTI KAMARUDDIN



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my



Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah



[PustakaTBainun](#)



[ptbupsi](#)

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH
IJAZAH DOKTOR FALSAFAH

FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
BANGI



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my



Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah



[PustakaTBainun](#)



[ptbupsi](#)

ABSTRAK

Penghasilan protein heterolog oleh *Aspergillus niger* sering dihadkan oleh protease yang dihasilkan oleh hos sendiri. Bagi menambah baik penghasilan protein heterolog, gen mengekod protease ataupun faktor transkripsi yang mengawal atur pengekspresan gen protease perlu dinyahaktifkan. Objektif kajian ini adalah untuk menyahaktifkan gen mengekod faktor transkripsi *prtT*, menentukan penghasilan protease ekstra sel oleh mutan *prtT* dan menentukan aktiviti serta kestabilan protein heterolog yang dihasilkan oleh mutan *prtT*. Gen *prtT* telah dinyahaktifkan dalam *A. niger* PY11 melalui kaedah penggantian gen dan mutan yang terhasil telah disahkan melalui analisis tindak balas berantai polimerase (PCR) dan pembloatan Southern. Analisis transkripsi berbalik tindak balas berantai polimerase (RT-PCR) menunjukkan bahawa tahap pengekspresan gen protease *pepA*, *pepB* dan *pepF* dalam mutan *AnΔprtT* didapati berkurangan berbanding *A. niger* PY11 sama ada dalam keadaan yang teraruh atau tidak teraruh. Pengasaian aktiviti proteolitik ekstra sel secara kualitatif yang dilakukan di atas agar medium minimum yang mengandungi kasein dan gelatin mengesahkan bahawa *AnΔprtT* mempamerkan fenotip mutan. Ia dicirikan melalui kehilangan pembentukan zon 'halo' di sekeliling koloni walaupun *AnΔprtT* menunjukkan pertumbuhan koloni yang sama dengan *A. niger* PY11. Pengasaian aktiviti proteolitik ekstra sel turut diukur secara kuantitatif melalui pencernaan *bovine serum albumin* (BSA) di mana aktiviti protease ekstra sel *AnΔprtT* didapati kekal rendah berbanding *A. niger* PY11 yang menunjukkan peningkatan secara linear sepanjang 6 hari pengkulturan. Penyahaktifan *prtT* ternyata tidak memberi kesan terhadap pertumbuhan *AnΔprtT* apabila pertumbuhannya didapati setara dengan *A. niger* PY11. Seterusnya, protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* dicirikan melalui kaedah kromatografi cecair berprestasi ultra-pengionan elektrosemburan nano aliran-spektrometri jisim selari (UPLC-nanoESI-MS/MS). Keseluruhannya, sebanyak 20 protease ekstra sel dikenal pasti daripada sampel hari ke-5 hingga 9 bagi *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*. Daripada jumlah tersebut, 15 merupakan protease yang bergantung kepada *prtT* manakala lima lagi adalah protease yang tidak bergantung kepada *prtT*. Bagi membandingkan keefisienan *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* sebagai hos untuk penghasilan protein heterolog, gen kutinase daripada *Glomerella cingulata* di bawah kawalan promoter glukamilase A telah diintegrasikan ke dalam kedua-dua genom. Aktiviti kutinase daripada transforman *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* yang membawa gen kutinase *G. cingulata* rekombinan masing-masing meningkat kepada 20 dan 36 kali ganda lebih tinggi berbanding strain induk tak tertransformasi. Ini mencadangkan bahawa keupayaan mutan untuk menghasilkan protein heterolog tidak terjejas dengan penyahaktifan *prtT*. Selain itu, jumlah enzim heterolog juga dihasilkan dengan lebih tinggi dalam *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11. Aktiviti kutinase heterolog daripada kedua-dua strain didapati stabil pada suhu 4°C selama 6 minggu. Manakala semasa penyimpanan pada suhu 25°C, aktiviti kutinase heterolog daripada *AnΔprtT* didapati kekal sehingga lebih daripada 80% selepas dua minggu penyimpanan berbanding aktiviti kutinase daripada *A. niger* PY11 yang tinggal kurang daripada 3% dalam tempoh yang sama. Kesimpulannya, pembangunan mutan faktor transkripsi *prtT* telah mengurangkan aktiviti protease ekstra sel dalam *A. niger* di samping dapat meningkatkan penghasilan dan kestabilan protein heterolog.



DEVELOPMENT OF *priT* MUTANT AND SECRETOME ANALYSIS TO INCREASE HETEROLOGOUS PROTEIN STABILITY IN *Aspergillus niger*



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my

Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

PustakaTBainun



ptbupsi

ABSTRACT

Production of heterologous proteins in *Aspergillus niger* is often limited by the high levels of proteases produced by the fungus. To improve heterologous production, protease genes or a transcription factor controlling expression of extracellular protease-encoding genes has to be deactivated. The objective of this work are to deactivate a gene encoding transcription factor *priT*, determine the production of extracellular proteases by the *priT* mutant and determine the activity and stability of heterologous protein produced by the *priT* mutant. The *priT* gene was inactivated in *A. niger* PY11 via gene replacement and the mutant produced was verified via polymerase chain reaction (PCR) and Southern blotting. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed reduced expression levels of several protease genes, *pepA*, *pepB* and *pepF* in *AnΔpriT* as compared to *A. niger* PY11 either in induced or non-induced conditions. A qualitative extracellular proteolytic activity assays conducted on the *AnΔpriT* mutant confirmed that this strain exhibited the mutant phenotype, characterised by loss of halo production on minimal medium containing casein and gelatine plates even though the mutant has similar colonial growth to the parent strain. Extracellular proteolytic activity was also measured quantitatively via bovine serum albumin degradation whereby the protease activity of *A. niger* PY11 showed a linear increase throughout six days culturing while *AnΔpriT* protease activity remained very low. Growth of *A. niger* PY11 and *AnΔpriT* was comparable indicating that disruption of *priT* did not affect fungal growth. Subsequently, extracellular proteases of *A. niger* PY11 and *AnΔpriT* were characterized via Ultra Performance Liquid Chromatography-nano Electrospray Ionisation-Tandem MS/MS (UPLC-nanoESI-MS/MS). Overall, 20 extracellular proteases were identified from day 5 to 9 for samples of both *A. niger* PY11 and *AnΔpriT*. Of these, 15 of them were found to be *priT*-dependent while the other five were *priT*-independent. To compare the efficiency of the *A. niger* PY11 and *AnΔpriT* as hosts for heterologous protein production, the *Glomerella cingulata* cutinase gene under control of the glucoamylase A promoter was integrated into each genome. Cutinase activity of *A. niger* PY11 and *AnΔpriT* harbouring the recombinant *G. cingulata* cutinase gene was increased 20 and 36-fold higher, respectively than the untransformed parental strains, suggesting that the ability of the mutant to produce heterologous protein was not affected by deletion of *priT*. Moreover, heterologous total enzyme was produced higher in *AnΔpriT* compared to *A. niger* PY11. Heterologous cutinase activity in both strains was stable at 4°C for six weeks. Meanwhile, the heterologous cutinase activity in *AnΔpriT* was retained with greater than 80% activity after two week incubation at 25°C compared to less than 3% activity remaining in *A. niger* PY11. In conclusion, development of *priT* transcription factor mutant reduced extracellular protease activity in *A. niger* as well as increased the production and stability of the heterologous proteins.



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my

Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

PustakaTBainun



ptbupsi

KANDUNGAN

	 05-4506832  pustaka.upsi.edu.my  Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah  PustakaTBainun  ptbupsi Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xiii
SENARAI RAJAH	xiv
SENARAI SINGKATAN DAN UNIT	xviii
BAB 1 PENGENALAN	1
1.1  05-4506832  pustaka.upsi.edu.my  Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah  PustakaTBainun  ptbupsi	1
1.2 Objektif Kajian	4
BAB II ULASAN KEPUSTAKAAN	6
2.1 Kulat Berfilamen	6
2.1.1 <i>Aspergillus niger</i>	7
2.1.2 <i>A. niger</i> PY11	8
2.2 Kulat Berfilamen Sebagai Hos Pengekspresan Protein Heterolog	8
2.3 Tapak Jalan Perembesan Protein dalam Kulat Berfilamen	10
2.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pengekspresan Protein Heterolog dan Strategi untuk Meningkatkan Penghasilan Protein Heterolog	11
2.5  05-4506832  pustaka.upsi.edu.my  Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah  PustakaTBainun  ptbupsi	16
2.6 Fungsi Fisiologi Protease	17

2.7	Spektrum Protease <i>A. niger</i>	20
2.8	Sistem Pengawalan Protease	22
2.9	Faktor Transkripsi Spesifik-Protease <i>prtT</i>	25
2.10	Kajian Proteomik	28
2.10.1	Kromatografi cecair (LC) dan spektrometri jisim selari (MS/MS)	30
2.10.2	Pendekatan kajian bagi mengenalpastian protein berasaskan spektrometri jisim (<i>MS-based protein identification</i>)	32
2.10.3	Kuantifikasi protein tanpa-label secara relatif (<i>Label-free relative protein quantification</i>)	33
2.11	Kajian Proteomik <i>A. niger</i>	34
2.12	Transformasi Kulat	35
2.13	Kutinase <i>Glomerella cingulata</i>	38
BAB III	BAHAN DAN KAEDAH	40
3.1	Bahan Kimia	40
3.2	Enzim Penyekatan, Penanda DNA dan Protein, Reagen dan Kit Komersil	41
3.3	Sumber Kulat, Bakteria dan Plasmid	41
3.4	Pencetus	42
3.5	Strategi Keseluruhan Kajian	42
3.6	Pemencilan DNA dan RNA	45
3.6.1	Pengekstrakan DNA genom menggunakan polivinil pirolidon (PVP)	45
3.6.2	Perlakuan untuk pengekstrakan RNA	46
3.6.3	Pengekstrakan RNA jumlah	46
3.6.4	Penulenan RNA jumlah	47
3.6.5	Pengekstrakan plasmid	48
3.6.6	Penentuan kepekatan DNA atau RNA	49
3.6.7	Elektroforesis gel agarosa bagi sampel DNA dan RNA	49
3.6.8	Pengekstrakan dan penulenan DNA daripada gel agarosa	50

3.6.9	Pencernaan DNA dengan enzim penyekatan	50
3.7	Penyediaan dan Transformasi Sel Kompeten	51
3.7.1	Penyediaan sel kompeten	51
3.7.2	Transformasi sel kompeten	51
3.8	Tindak Balas Berantai Polimerase (PCR)	51
3.9	Pembinaan Kaset Gangguan Gen <i>prrT</i>	52
3.9.1	Pembinaan pencetus oligonukleotida	53
3.9.2	Amplifikasi jujukan apitan 5' dan 3' gen <i>prrT</i> serta jujukan penanda <i>pyrG</i>	54
3.9.3	PCR cantuman	54
3.10	Transformasi <i>A. niger</i> PY11	55
3.10.1	Penyediaan sferoplas	55
3.10.2	Transformasi <i>A. niger</i> PY11 dengan kaset gangguan gen <i>prrT</i>	56
3.10.3	Pemencilan transforman	57
3.10.4	Pemencilan spora tunggal	57
3.10.5	Penyaringan transforman yang menghasilkan fenotip mutan	57
3.10.6	Penyaringan transforman melalui PCR	58
3.11	Pemblotan Southern	59
3.11.1	Pengekstrakkan DNA genom	59
3.11.2	Pencernaan DNA genom	59
3.11.3	Pemprosesan gel	59
3.11.4	Pemblotan kapilari	59
3.11.5	Pemprosesan membran	60
3.11.6	Penghibridan	60
3.11.7	Penyediaan prob berlabel	61
3.11.8	Pencucian membran	61
3.11.9	Penjanaan dan pengesanan isyarat	62
3.12	Analisis Pengekspresan Gen Melalui PCR Transkripsi Berbalik (RT-PCR)	62
3.12.1	Pembinaan pencetus oligonukleotida	62
3.12.2	Pengkulturan dan pengekstrakan RNA jumlah	63
3.12.3	Transkripsi berbalik RT-PCR	63



3.13	Pencirian Mutan <i>AnΔprtT</i>	63
3.13.1	Asai aktiviti perembesan protein ekstra sel	63
3.13.2	Asai aktiviti proteolitik ekstra sel	64
3.13.3	Asai aktiviti proteolitik ekstra sel secara kuantitatif	64
3.13.4	Analisis lengkok pertumbuhan	65
3.14	Pencirian Protease Ekstra Sel <i>A. niger</i> PY11 dan Mutan <i>AnΔprtT</i> Melalui Kaedah Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra-Pengionan Elektrosemburan Nano Aliran-Spektrometri Jisim Selari (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography-nano Electrospray Ionisation-Tandem MS/MS</i> - (UPLC-nanoESI-MS/MS))	65
3.14.1	Penghasilan protein ekstra sel	65
3.14.2	Penyediaan sampel protein	66
3.14.3	Penentuan kepekatan protein	66
3.14.4	Pencernaan protein	67
3.14.5	Kromatografi cecair berprestasi ultra-pengionan elektrosemburan nano aliran-spektrometri jisim selari (UPLC-nanoESI-MS/MS)	67
3.15	Kitar Semula Gen Penanda <i>pyrG</i> dalam Mutan <i>AnΔprtT</i>	69
3.15.1	Transformasi mutan <i>AnΔprtT</i> dengan plasmid ANEp-Cre-ptrA dan penyaringan transforman putatif	70
3.15.2	Pengesahan mutan <i>AnΔprtT</i> yang telah kehilangan gen penanda <i>pyrG</i> melalui analisis PCR	70
3.16	Penghasilan Protein Heterolog oleh <i>A. niger</i> PY11 dan Mutan <i>AnΔprtT</i>	71
3.16.1	Transformasi <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i> dengan plasmid ANIp2-cut	72
3.16.2	Penyaringan transforman membawa gen kutinase <i>G. cingulata</i> melalui analisis PCR	72
3.16.3	Pengekspresan kutinase heterolog	73
3.16.4	Elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE)	73
3.16.5	Pemblotan Western	74
3.16.6	Pengasaan aktiviti kutinase heterolog	75
3.17	Ujian Kestabilan Kutinase Heterolog dalam Protein Ekstrak Kasar <i>A. niger</i> PY11 dan Mutan <i>AnΔprtT</i>	76

BAB IV

PEMBANGUNAN MUTAN *prrT* DARIPADA *Aspergillus niger*

77



4.1	Pengenalan	77
4.2	Penyahaktifan gen <i>prrT</i> <i>A. niger</i> PY11	79
4.2.1	Pengekstrakan DNA genom <i>A. niger</i> PY11	79
4.2.2	Pembinaan kaset gangguan gen <i>prrT</i>	79
4.2.3	Transformasi <i>A. niger</i> PY11 dengan kaset gangguan gen <i>prrT</i>	81
4.2.4	Pengesahan integrasi kaset gangguan gen pada lokus <i>prrT</i>	81
4.3	Pencirian Mutan <i>AnΔprrT</i>	84
4.3.1	Analisis pengekspresan gen melalui transkripsi berbalik tindak balas berantai polimerase (RT-PCR)	84
4.3.2	Pengekstrakan dan penulenan RNA jumlah	84
4.3.3	Analisis pengekspresan gen protease terpilih melalui RT-PCR	85
4.3.4	Pengasaan aktiviti enzim secara kualitatif dan kuantitatif	88
4.4	Perbincangan	92
4.5	Kesimpulan	96

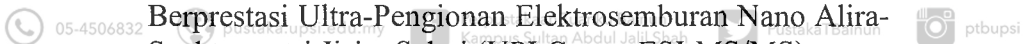


BAB V

PENCIRIAN PROTEASE EKSTRA SEL *A. niger* PY11 DAN MUTAN *AnΔprrT* MELALUI KAEDAH KROMATOGRAFI CECAIR BERPRESTASI ULTRA-PENGIONAN ELEKTROSEMBURAN NANO ALIRAN- SPEKTROMETRI JISIM SELARI (UPLC-nanoESI-MS/MS)

97

5.1	Pengenalan	97
5.2	Penyediaan Protein Ekstra Sel <i>A. niger</i> PY11 dan Mutan <i>AnΔprrT</i>	99
5.3	Perbandingan Sekretom Antara <i>A. niger</i> PY11 dengan Mutan <i>AnΔprrT</i> Melalui Analisis Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra-Pengionan Elektrosemburan Nano Aliran- Spektrometri Jisim Selari (UPLC-nanoESI-MS/MS)	101



5.3.1	Perbandingan sekretom antara mutan <i>AnΔprtT</i> dengan <i>A. niger</i> PY11 pada hari ke-5	103
5.3.2	Perbandingan sekretom antara mutan <i>AnΔprtT</i> dengan <i>A. niger</i> PY11 pada hari ke-6	108
5.3.3	Perbandingan sekretom antara mutan <i>AnΔprtT</i> dengan <i>A. niger</i> PY11 pada hari ke-7	112
5.3.4	Perbandingan sekretom antara mutan <i>AnΔprtT</i> dengan <i>A. niger</i> PY11 pada hari ke-8	116
5.3.5	Perbandingan sekretom antara mutan <i>AnΔprtT</i> dengan <i>A. niger</i> PY11 pada hari ke-9	120
5.4	Perbincangan	122
5.5	Kesimpulan	131
BAB VI	PENGKEKSPRESAN KUTINASE HETEROLOG DARIPADA <i>A. niger</i> PY11 DAN <i>AnΔprtT</i>	132
6.1	Pengenalan	132
6.2	Transformasi <i>AnΔprtT</i> dengan Plasmid ANEp-Cre-ptrA untuk Kitar Semula Penanda <i>pyrG</i>	134
6.3	Transformasi <i>AnΔprtT</i> dengan Kaset Pengekspresan Gen Pelapor	135
6.4	Penyaringan Transforman Membawa Gen Pelapor Melalui Analisis PCR	137
6.5	Pengekspresan Kutinase Heterolog	137
6.6	Kesan Penyahaktifan <i>priT</i> Terhadap Kestabilan Kutinase Heterolog Semasa Penyimpanan	141
6.7	Perbincangan	141
6.8	Kesimpulan	147
BAB VII	PERBINCANGAN UMUM	148
BAB VIII	KESIMPULAN	152

LAMPIRAN



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my

Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

PustakaTBainun



ptbupsi

A	Medium Pengkulturan	172
B	Larutan dan Penimbal	178
C	Penyediaan Gel Pemisah dan Gel Pemampat	185
D	Peta Plasmid ANIp2-cut	186
E	Peta Plasmid pyrG-Anid	187
F	Peta Plasmid ANEp-Cre-ptrA	188
G	Peta Plasmid ANEp2	189
H	Pengiraan Konidia dan Sferoplas	190
I	Pemblotan Kapilari	191
J	Lengkuk Piawai Tirosina	192
K	Lengkuk Piawai p-Nitrofenol	193
L	Senarai protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i> pada hari ke-5 hingga 9	194
M	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada strain <i>A. niger</i> PY11 pada hari ke-5 hingga 9	206
N	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada mutan <i>AnΔprtT</i> pada hari ke-5 hingga 9	210



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my

Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

PustakaTBainun



ptbupsi

LAMPIRAN

 05-4506832  pustaka.upsi.edu.my  Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah  PustakaTBainun  ptbupsi			
A	Medium Pengkulturan		172
B	Larutan dan Penimbal		178
C	Penyediaan Gel Pemisah dan Gel Pemampat		185
D	Peta Plasmid ANIp2-cut		186
E	Peta Plasmid pyrG-Anid		187
F	Peta Plasmid ANEp-Cre-ptrA		188
G	Peta Plasmid ANEp2		189
H	Pengiraan Konidia dan Sferoplas		190
I	Pemblotan Kapilari		191
J	Lengkuk Piawai Tirosina		192
K	Lengkuk Piawai p-Nitrofenol		193
L	Senarai protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i> pada hari ke-5 hingga 9		194
M	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada strain <i>A. niger</i> PY11 pada hari ke-5 hingga 9		206
N	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada mutan <i>AnΔprtT</i> pada hari ke-5 hingga 9		210

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
2.1	Contoh protein heterolog yang dihasilkan oleh <i>Aspergillus</i>	11
2.2	Pengelasan dan mekanisme tindakan spesifik protease	18
3.1	Pencetus oligonukleotida yang digunakan dalam kajian ini	43
3.2	Komposisi campuran untuk PCR	52
3.3	Komposisi campuran untuk amplifikasi jujukan 5' dan 3' gen <i>prtT</i> , gen penanda <i>pyrG</i> serta PCR cantuman	55
4.1	Kepekatan dan ketulen RNA jumlah yang dipencilkan daripada <i>A. niger</i> strain PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i>	85
5.1	Ramalan kehadiran isyarat peptida pada protein yang dikenal pasti daripada <i>A. niger</i> PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i> pada hari ke-5 hingga 9	102
5.2	Ringkasan bagi protease yang dikenal pasti daripada <i>A. niger</i> PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i> pada hari ke-5 hingga 9	126

SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
2.1	Tapak jalan perembesan protein dalam kulat berfilamen beserta strategi untuk meningkatkan penghasilan protein heterolog	12
2.2	Pengkelasan protease dan protein pengawal atur yang terlibat dalam pengawalaturan protease dalam <i>A. niger</i>	21
2.3	Sistem proteolitik <i>A. niger</i> dan lokalisasi protease individu di dalam sel	22
2.4	Carta alir proses pengenalpastian dan kuantifikasi protein untuk kajian proteomik	29
3.1	Carta alir strategi keseluruhan kajian	45
3.2	Strategi pembinaan kaset gangguan gen <i>priT</i>	53
3.3	Skema penyahaktifan gen <i>priT</i> dan kedudukan pasangan pencetus yang direka untuk mengesahkan integrasi kaset gangguan gen <i>priT</i> berlaku pada lokus yang betul pada transforman	58
3.4	Skema kitar semula gen penanda <i>pyrG</i> dan kedudukan pasangan pencetus yang direka untuk mengesahkan kehilangan gen penanda <i>pyrG</i> daripada mutan <i>AnΔpriT</i>	71
3.5	Peta plasmid ANIp2-cut dan kedudukan pasangan pencetus yang digunakan dalam analisis PCR bagi mengesahkan integrasi vektor pengekspresan ANIp2-cut dalam genom transforman	73
4.1	Profil elektroforesis gel agarosa (1%) bagi produk PCR mengekod jujukan apitan 5' gen <i>priT</i> , jujukan gen penanda <i>pyrG</i> , jujukan apitan 3' gen <i>priT</i> dan jujukan lengkap kaset gangguan gen <i>priT</i>	80
4.2	Profil elektroforesis gel agarosa (1%) analisis PCR transforman putatif untuk mengesahkan integrasi kaset gangguan gen <i>priT</i> dalam genom <i>A. niger</i> PY11	82
4.3	Skema penyahaktifan gen <i>priT</i> dan analisis pemblotan Southern untuk pengesanan mutan	83
4.4	Profil elektroforesis gel agarosa (1%) analisis RT-PCR	87

bagi pengekspresan gen-gen protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*

4.5	Pencuraian kanji dan aktiviti proteolitik <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i>	89
4.6	Aktiviti proteolitik ekstra sel <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i> di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kasein 1% (j/i) dan gelatin 1% (j/i) ditunjukkan melalui pembentukan zon ‘halo’ disekeliling koloni kulat	90
4.7	Lengkung pertumbuhan dan aktiviti proteolitik protein ekstra sel <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i>	91
5.1	Profil pertumbuhan <i>A. niger</i> PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i> yang dikultur dalam medium MMJ pada 30°C secara statik selama 10 hari	101
5.2	Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-5 bagi <i>A. niger</i> PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i>	104
5.3	Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-5 bagi <i>A. niger</i> PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i>	104
5.4	Diagram Venn yang menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara <i>A. niger</i> PY11 (bulatan biru) dengan mutan <i>AnΔprtT</i> (bulatan merah) bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-5	105
5.5	Carta bar nisbah pengekspresan mutan <i>AnΔprtT</i> terhadap <i>A. niger</i> PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-5	107
5.6	Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-6 bagi <i>A. niger</i> PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i>	109
5.7	Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-6 bagi <i>A. niger</i> PY11 dan mutan <i>AnΔprtT</i>	109
5.8	Diagram Venn yang menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara <i>A. niger</i> PY11 (bulatan biru) dengan mutan <i>AnΔprtT</i> (bulatan merah) bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-6	110
5.9	Carta bar nisbah pengekspresan mutan <i>AnΔprtT</i> terhadap	111

A. niger PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-6

- 5.10 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-7 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 113
- 5.11 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-7 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 113
- 5.12 Diagram Venn yang menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara *A. niger* PY11 (bulatan biru) dengan mutan *AnΔprtT* (bulatan merah) bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-7 114
- 5.13 Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-7 115
- 5.14 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-8 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 117
- 5.15 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-8 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 117
- 5.16 Diagram Venn yang menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara *A. niger* PY11 (bulatan biru) dengan mutan *AnΔprtT* (bulatan merah) bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-8 118
- 5.17 Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-8 119
- 5.18 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-9 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 121
- 5.19 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-9 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 121
- 5.20 Diagram Venn yang menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara *A. niger* PY11 (bulatan biru) dengan mutan *AnΔprtT* (bulatan merah) bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-9 122

5.21	Carta bar nisbah pengekspresan mutan <i>AnΔprtT</i> terhadap <i>A. niger</i> PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-9	123
6.1	Profil elektroforesis agarosa (1%) produk PCR bagi pengesahan kitar semula penanda <i>pyrG</i> daripada mutan <i>AnΔprtT</i>	136
6.2	Pertumbuhan kulat di atas agar MM tanpa urasil dan uridina pada hari ke-6 selepas proses kitar semula gen penanda <i>pyrG</i>	136
6.3	Profil elektroferesis agarosa (1%) bagi analisis penyaringan transforman yang membawa plasmid ANIp2-cut dalam <i>A. niger</i> PY11	138
6.4	Profil elektroferesis agarosa (1%) bagi analisis penyaringan transforman yang membawa plasmid ANIp2-cut dalam <i>AnΔprtT</i>	138
6.5	Analisis SDS-PAGE (Panel a) dan pemedapan Western (Panel b) bagi pengekspresan kutinase heterolog	139
6.6	Aktiviti kutinase heterolog yang dihasilkan oleh <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i> berbanding hos masing-masing	140
6.7	Kestabilan kutinase heterolog dalam ekstrak kasar <i>A. niger</i> PY11 dan <i>AnΔprtT</i>	142



SENARAI SINGKATAN DAN UNIT

A	Bacaan penyerapan (absorbance)
BSA	Bovine serum albumin
C	Sistina
cDNA	Asid deoksiribonukleik komplementari
dH ₂ O	Air suling steril
ddH ₂ O	Air ternyahion
DEPC	Dietilpirokarbonat
Dlm.	Dalam
DMSO	Dimetil sufosida
DNA	Asid deoksiribonukleik
DNAse	Deoksiribonuklease
dNTP	Deoksinukleotida trifosfat
DTT	Ditiotreititol
ECL	Enhanced chemiluminescence
ESI	Pengionan elektro-semburan
EtBr	Etidium bromida
EDTA	Asid etilindiaminatetrasetik
FC	Folin Ciocalteu
fmol	Femtomol
FOA	Asid 5'-fluoroorotik
g/L	Gram per liter
HCl	Asid hidroklorik
HRP	Horseradish peroksidase
IAA	Iodoacetamida
IgG	Imunoglobulin G
i/i	Isipadu per isipadu
IPTG	Isopropil-β-tiogalaktopiranosidase
JGI	Joint genome institute
j/i	Jisim per isipadu
kb	Kilo pasangan bes
kDa	Kilo Dalton

KOAc	Kalium asetat
LB	Luria Bertani
LC	Kromatografi cecair
M	Metionina
mg/mL	Milligram per mililiter
ML	Medium lengkap
MM	Medium minimum
MMJ	Medium minimum J
MM-KCL	Medium minimum-potasium klorida
MOPS	Asid 3-(N-morfolino) propanasulfonik
mRNA	RNA pengutus
MS	Spektrometri jisim
MS/MS	Spektrometri jisim selari
MW	Berat molekul
MWCO	'cut off' berat molekul
m/z	Nisbah jisim terhadap cas
N	Asparagina
NaOAc	Natrium asetat
ng	Nanogram
OD	Ketumpatan optik
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline tween
PCR	Tindak balas berantai polimerase
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	Polietilina glikol
PLGS	ProteinLynx Global Server
pnyt.	Penyunting
pNPL	<i>para</i> -nitrofenol laurat
ppm	<i>Bahagian per juta</i>
PVP	Polinivilpirolidon
RNA	Asid ribonukleik
RNAse	Ribonuklease
Q	Glutamina

ROS	Spesies oksigen reaktif
rpm	Pusingan per minit
RT-PCR	Transkripsi berbalik-tindak balas berantai polimerase
S	Serina
SDS	Sodium dodesil sulfat
SDS-PAGE	Sodium dodesil sulfat-gel elektroforesis poliakrilamid
T	Treonina
TAE	Tris/Asid asetik/EDTA (penimbal)
TCA	Asid trikloroasetik
TEMED	N,N,N',N' tetramethylethylenediamine
TFA	Asid trifluoroasetik
UV	Ultra-ungu
UPLC	Kromatografi cecair berprestasi ultra
U/mL	Unit per mililiter
μg	Mikrogram
V	Voltan
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indoyl-β-galaktopiranosid
Y	Tirosina





BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Kulat berfilamen digunakan secara meluas dalam industri bioteknologi sebagai kilang sel untuk penghasilan bahan kimia, farmaseutikal dan enzim (Meyer 2008). Strain industri kulat berfilamen berupaya menghasilkan produk komersil dalam kuantiti yang besar dalam bioreaktor seperti sefalosporin 25 g/L, glukoamilase 30 g/L, selulase 40 g/L, penisilin 50 g/L dan asid sitrik 140 g/L (Gordon et al. 2000; Grimm et al. 2005; Papagianni 2004). Antara kulat berfilamen yang mendominasi industri bioteknologi sebagai hos pengekspresan adalah *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* dan *Trichoderma reesei* (Nevalainen et al. 2005).

A. niger merupakan kulat berfilamen yang menarik kerana kapasiti perembesan protein yang tinggi dan sering digunakan sebagai organisma model. *A. niger* diberi status 'generally regarded as safe' (GRAS) kerana mempunyai sejarah panjang dalam penghasilan makanan yang selamat digunakan. Status GRAS ini juga membantu untuk mendapatkan kelulusan bagi produk makanan dan dadah yang baru (Lubertozzi & Keasling 2008). *A. niger* mempunyai beberapa kelebihan sebagai hos pengekspresan berbanding sistem pengekspresan yang lain. Antaranya termasuklah: (1) berupaya menghasil dan merembeskan protein pada jumlah yang banyak ke dalam medium pengkulturan, (2) berupaya mengekspreskan protein eukariot dengan pelipatan yang betul dan berfungsi terutama bagi protein yang memerlukan modifikasi pos-translasi seperti glikosilasi dan pembentukan jambatan dwisulfida dan (3) rekombinan yang stabil boleh dipencilkan dan ini membolehkan pembiakan strain dilakukan secara terkawal (van den Hombergh et al. 1997b).

A. niger telah dibangunkan untuk penghasilan protein homolog dan juga heterolog. Walaupun *A. niger* dapat merembeskan protein homolog dengan efisien, namun terdapat kekurangan dari segi keupayaan kulat ini untuk menghasilkan protein heterolog. Faktor-faktor seperti tahap transkripsi yang rendah bagi sesetengah gen, ketidakstabilan mRNA dan translasi yang tidak cekap bagi protein bukan hos telah menghadkan tahap penghasilan protein heterolog. Selain dari itu, persaingan dengan protein natif hos untuk memasuki sistem rembesan juga merupakan faktor yang mengurangkan tahap penghasilan protein heterolog. Walaupun berjaya dirembes keluar dengan efisien, protein heterolog juga menghadapi masalah ancaman degradasi oleh protease ekstra sel yang dihasilkan oleh hos (Gouka et al. 1997b; Sharma et al. 2009). Degradasi protein heterolog oleh protease ekstra sel seperti aspergillopepsin telah ditunjukkan dalam beberapa kajian (Archer et al. 1992; Berka et al. 1990; Broekhuijsen et al. 1993).

Sebagai sebahagian daripada gaya hidup saprofitik, *A. niger* merembeskan sejumlah enzim proteolitik yang signifikan. Menurut Pel et al. (2007), genom *A. niger* mengekod hampir 200 gen protease. Protease ini tertumpu sama ada di dalam sel termasuk vakuol, pada dinding sel atau dirembes ke dalam medium sebagai protease ekstra sel (Gouka et al. 1997b; van den Hombergh et al. 1997b). Daripada 200 protease tersebut, sebanyak 32 diramal mempunyai isyarat peptida atau mempunyai persamaan yang tinggi dengan protease ekstra sel daripada organisma lain (Pel et al. 2007). Bilangan protease yang besar ini menggambarkan pengawalan protease yang kompleks dalam *A. niger*.

Spektrum protease bagi spesies *Aspergillus* adalah pelbagai dan jenis protease yang dihasilkan bersifat spesifik terhadap spesies. Spektrum proteolitik *A. niger* menunjukkan protease asidik seperti *pepA*, *pepB*, *pepF* dan *pepG* mendominasi protease ekstra sel yang dihasilkan oleh kulat ini (Berka et al. 1990; Inoue et al. 1991; Krishnan & Vijayalakshimi 1985; Mattern et al. 1992; van den Hombergh et al. 1994). Menurut van den Hombergh et al. (1997b), aktiviti protease asidik sering dikaitkan dengan masalah degradasi protein homolog dan heterolog dalam *A. niger* kerana kulat ini diketahui mudah melakukan pengasidan medium pengkulturan. Selain itu, tiga protease yang berhomolog dengan protease vakuol daripada yis iaitu

pepC, *pepE* dan *cpy* juga telah diklonkan daripada *A. niger* (Frederick et al. 1993; Jarai et al. 1994b). Seterusnya, empat gen (*pepAa*, *pepAb*, *pepAc* dan *pepAd*) yang mengekod protease aspartik mirip-pepsin dikenal pasti melalui pendekatan perbandingan genom oleh Wang et al. (2008).

Gen yang mengekod pengawal atur spesifik bagi gen-gen protease dan gen yang mengekod pengawal atur domain-luas adalah dua kumpulan gen pengawal atur yang terlibat dalam pengawalaturan pengekspresan protease (Braaksma & Punt 2008). Gen *priT* adalah satu-satunya gen pengawalatur-spesifik protease yang dikenal pasti dalam spesies kulat dan yis setakat ini. Faktor transkripsi *priT* daripada *A. niger* telah diklon dan dicirikan oleh Punt et al. (2008). PriT didapati mengawal atur pengekspresan beberapa gen protease ekstra sel di dalam *A. niger* (Punt et al. 2008). Penyahaktifan *priT* telah menyebabkan pengurangan aktiviti protease ekstra sel dalam *A. niger*. Selain *priT*, gen pengawal atur domain-luas seperti *pacC*, *areA* dan *creA* turut mempengaruhi pengekspresan pelbagai enzim termasuklah protease (Braaksma & Punt 2008).

Beberapa strategi telah dibangunkan untuk memperbaiki penghasilan protein heterolog daripada *A. niger* seperti memperkenalkan gen bersalinan tinggi ke dalam genom kulat, menggunakan promoter yang kuat dan isyarat rembesan yang efisien, mengaruh penghasilan komponen-komponen gerak balas protein ternyahlipat seperti protein pengiring dan foldase, mencantumkan gen sasaran dengan gen yang mengekod protein yang dirembes dengan efisien dan menggunakan strain hos yang kurang menghasilkan protease (Sharma et al. 2009). Masalah protease boleh ditangani melalui strategi bioproses dan pembangunan strain-kurang protease. Strategi bioproses boleh dilakukan melalui pengoptimuman komposisi medium dan protokol fermentasi (Braaksma et al. 2009; O'Donnell et al. 2001; Papagianni et al. 2002; Papagianni & Moo-Young 2002; Xu et al. 2000). Strain-kurang protease pula dijana sama ada melalui kaedah mutagenesis (Mattern et al. 1992; van den Hombergh et al. 1995) atau dengan menyahaktifkan gen protease tertentu (van den Hombergh et al. 1997a; Wang et al. 2008). Mutan protease yang terhasil ternyata dapat meningkatkan pengekspresan protein heterolog (Wang et al. 2008; Zhu et al. 2012).

Tujuan kajian ini adalah untuk menambah baik *A. niger* PY11 sebagai hos pengekspresan protein heterolog. *A. niger* PY11 adalah strain yang dibangunkan dengan ciri-ciri khusus sebagai hos pengekspresan bagi penghasilan protein heterolog yang tinggi. Dua protein rembesan utama iaitu glukoamilase A dan β -glukosidase A telah dinyahaktifkan dalam strain ini bagi meningkatkan keefisienan perembesan protein heterolog (Reginald Storms, komunikasi peribadi). Ketiadaan protein rembesan utama hos akan meningkatkan peluang protein heterolog untuk memasuki sistem rembesan dan dieksport ke luar sel.

Dalam kajian ini usaha dilakukan bagi menambah baik keupayaan *A. niger* PY11 sebagai hos pengekspresan protein heterolog. Strategi yang digunakan adalah dengan mengurangkan aktiviti protease ekstra sel melalui penyahaktifan faktor transkripsi *prtT*. Pengurangan protease ekstra sel hos dijangka dapat meningkatkan rembesan protein heterolog ke medium kerana kurangnya saingan untuk memasuki sistem rembesan hos. Protein heterolog yang terhasil juga dijangka lebih stabil semasa penyimpanan kerana kurangnya protease ekstra sel hos yang hadir dalam medium pertumbuhan. Selain itu, protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan *prtT* dicirikan bagi mengenal pasti protease yang dikawal atur oleh *prtT*. Keefisienan *A. niger* PY11 dan mutan *prtT* sebagai hos pengekspresan untuk menghasilkan protein heterolog kemudiannya diuji sebelum kestabilan protein heterolog yang dihasilkan oleh kedua-dua strain dibandingkan. Usaha penambahbaikan strain ini diharap dapat meningkatkan kuantiti dan kualiti protein heterolog yang dihasilkan oleh *A. niger* PY11.

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Objektif kajian ini adalah:

- 1) Menjana dan mencirikan mutan *An Δ prtT* daripada *A. niger* PY11 melalui strategi penggantian gen.
- 2) Mencirikan protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan *An Δ prtT* melalui kaedah kromatografi cecair berprestasi ultra-pengionan elektrosemburan nano aliran-spektrometri jisim selari (UPLC-nanoESI-MS/MS).

3) Membandingkan aktiviti dan kestabilan protein heterolog yang dihasilkan oleh *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*.



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my

Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

PustakaTBainun



ptbupsi



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my

Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

PustakaTBainun



ptbupsi



05-4506832



pustaka.upsi.edu.my

Perpustakaan Tuanku Bainun
Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

PustakaTBainun



ptbupsi