05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

PEMBANGUNAN MUTAN *prtT* 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

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

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 pemblotan 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 glukoamilase 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.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

UPSI DONE MyTO SCAN

DEVELOPMENT OF *prtT* 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 *prtT*, determine the production of extracellular proteases by the *prtT* mutant and determine the activity and stability of heterologous protein produced by the *prtT* mutant. The *prtT* 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 *An*Δ*prtT* as compared to *A. niger* PY11 either in induced or non-induced conditions. A qualitative extracellular proteolytic activity assays conducted on the *An*Δ*prtT* 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 *An*Δ*prtT* protease activity remained very low. Growth of *A. niger* PY11 and *An*Δ*prtT* was comparable indicating that disruption of *prtT* did not affect fungal growth. Subsequently, extracellular proteases of *A. niger* PY11 and *An*Δ*prtT* 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 *An*Δ*prtT*. Of these, 15 of them were found to be *prt*T–dependent while the other five were *prt*T- independent. To compare the efficiency of the *A. niger* PY11 and *An*Δ*prtT* 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 *An*Δ*prtT* 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 *prtT*. Moreover, heterologous total enzyme was produced higher in *An*Δ*prtT* 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 *An*Δ*prtT* 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 *prtT* 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	Latar Belakang	1
1.2	Objektif Kajian	4
BAB II	**ULASAN KEPUSTAKAAN**	6
2.1	Kulat Berfilamen	6
	2.1.1 *Aspergillus niger*	7
	2.1.2 *A. niger* 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	Protease Kulat	16
2.6	Fungsi Fisiologi Protease	17

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

2.7	Spektrum Protease *A. niger*		20
2.8	Sistem Pengawalaturan Protease		22
2.9	Faktor Transkripsi Spesifik-Protease *prtT*		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 pengenalpastian protein berasaskan spektrometri jisim (*MS-based protein identification*)	32
	2.10.3	Kuantifikasi protein tanpa-label secara relatif (*Label-free relative protein quantification*)	33
2.11	Kajian Proteomik *A. niger*		34
2.12	Transformasi Kulat		35
2.13	Kutinase *Glomerella cingulata*		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

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

	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 *prtT*	52
	3.9.1	Pembinaan pencetus oligonukleotida	53
	3.9.2	Amplifikasi jujukan apitan 5' dan 3' gen *prtT* serta jujukan penanda *pyr*G	54
	3.9.3	PCR cantuman	54
3.10		Transformasi *A. niger* PY11	55
	3.10.1	Penyediaan sferoplas	55
	3.10.2	Transformasi *A. niger* PY11 dengan kaset gangguan gen *prtT*	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

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.13 Pencirian Mutan *AnΔprtT* 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 lengkuk pertumbuhan 65

3.14 Pencirian Protease Ekstra Sel *A. niger* PY11 dan Mutan *AnΔprtT* Melalui Kaedah Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra-Pengionan Elektrosemburan Nano Aliran-Spektrometri Jisim Selari (*Ultra Performance Liquid Chromatography-nano Electrospray Ionasation-Tandem MS/MS*- (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 *pyrG* dalam Mutan *AnΔprtT* 69

3.15.1 Transformasi mutan *AnΔprtT* dengan plasmid ANEp-Cre-ptrA dan penyaringan transforman putatif 70
3.15.2 Pengesahan mutan *AnΔprtT* yang telah kehilangan gen penanda *pyrG* melalui analisis PCR 70

3.16 Penghasilan Protein Heterolog oleh *A. niger* PY11 dan Mutan *AnΔprtT* 71

3.16.1 Transformasi *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* dengan plasmid ANIp2-cut 72
3.16.2 Penyaringan transforman membawa gen kutinase *G. cingulata* 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 Pengasaian aktiviti kutinase heterolog 75

3.17 Ujian Kestabilan Kutinase Heterolog dalam Protein Ekstrak Kasar *A. niger* PY11 dan Mutan *AnΔprtT* 76

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

BAB IV	**PEMBANGUNAN MUTAN *prtT* DARIPADA *Aspergillus niger***		77
4.1	Pengenalan		77
4.2	Penyahaktifan gen *prtT A. niger* PY11		79
	4.2.1	Pengekstrakan DNA genom *A. niger* PY11	79
	4.2.2	Pembinaan kaset gangguan gen *prt*T	79
	4.2.3	Transformasi *A. niger* PY11 dengan kaset gangguan gen *prt*T	81
	4.2.4	Pengesahan integrasi kaset gangguan gen pada lokus *prt*T	81
4.3	Pencirian Mutan *AnΔprtT*		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	Pengasaian 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 *AnΔprtT* 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 *A. niger* PY11 dan Mutan *AnΔprtT*		99
5.3	Perbandingan Sekretom Antara *A. niger* PY11 dengan Mutan *AnΔprtT* Melalui Analisis Kromatografi Cecair Berprestasi Ultra-Pengionan Elektrosemburan Nano Alira-Spektrometri Jisim Selari (UPLC-nanoESI-MS/MS)		101

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

	5.3.1 Perbandingan sekretom antara mutan *AnΔprtT* dengan *A. niger* PY11 pada hari ke-5	103
	5.3.2 Perbandingan sekretom antara mutan *AnΔprtT* dengan *A. niger* PY11 pada hari ke-6	108
	5.3.3 Perbandingan sekretom antara mutan *AnΔprtT* dengan *A. niger* PY11 pada hari ke-7	112
	5.3.4 Perbandingan sekretom antara mutan *AnΔprtT* dengan *A. niger* PY11 pada hari ke-8	116
	5.3.5 Perbandingan sekretom antara mutan *AnΔprtT* dengan *A. niger* PY11 pada hari ke-9	120
5.4	Perbincangan	122
5.5	Kesimpulan	131
BAB VI	**PENGEKSPRESAN KUTINASE HETEROLOG DARIPADA *A. niger* PY11 DAN *AnΔprtT***	132
6.1	Pengenalan	132
6.2	Transformasi *AnΔprtT* dengan Plasmid ANEp-Cre-ptrA untuk Kitar Semula Penanda *pyrG*	134
6.3	Transformasi *AnΔprtT* 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 *prtT* Terhadap Kestabilan Kutinase Heterolog Semasa Penyimpanan	141
6.7	Perbincangan	141
6.8	Kesimpulan	147
BAB VII	**PERBINCANGAN UMUM**	148
BAB VIII	**KESIMPULAN**	152
RUJUKAN		153

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 *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9	194
M	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada strain *A. niger* PY11 pada hari ke-5 hingga 9	206
N	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada mutan *AnΔprtT* 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 *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9	194
M	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada strain *A. niger* PY11 pada hari ke-5 hingga 9	206
N	Senarai protein yang dikenal pasti hanya daripada mutan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9	210

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
2.1	Contoh protein heterolog yang dihasilkan oleh *Aspergillus*	11
2.2	Pengkelasan 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 *prtT*, gen penanda *pyrG* serta PCR cantuman	55
4.1	Kepekatan dan ketulenan RNA jumlah yang dipencilkan daripada *A. niger* strain PY11 dan mutan *AnΔprtT*	85
5.1	Ramalan kehadiran isyarat peptida pada protein yang dikenal pasti daripada *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9	102
5.2	Ringkasan bagi protease yang dikenal pasti daripada *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9	126

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

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 *A. niger*	21
2.3	Sistem proteolitik *A. niger* 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 *prt*T	53
3.3	Skema penyahaktifan gen *prtT* dan kedudukan pasangan pencetus yang direka untuk mengesahkan integrasi kaset gangguan gen *prtT* berlaku pada lokus yang betul pada transforman	58
3.4	Skema kitar semula gen penanda *pyrG* dan kedudukan pasangan pencetus yang direka untuk mengesahkan kehilangan gen penanda *pyrG* daripada mutan *AnΔprtT*	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 *prtT*, jujukan gen penanda *pyrG*, jujukan apitan 3' gen *prtT* dan jujukan lengkap kaset gangguan gen *prtT*	80
4.2	Profil elektroforesis gel agarosa (1%) analisis PCR transforman putatif untuk mengesahkan integrasi kaset gangguan gen *prtT* dalam genom *A. niger* PY11	82
4.3	Skema penyahaktifan gen *prtT* dan analisis pemblotan Southern untuk pengesahan mutan	83
4.4	Profil elektroforesis gel agarosa (1%) analisis RT-PCR	87

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

	bagi pengekspresan gen-gen protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*	
4.5	Pencuraian kanji dan aktiviti proteolitik *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*	89
4.6	Aktiviti proteolitik ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* 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 *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*	91
5.1	Profil pertumbuhan *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 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 *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*	104
5.3	Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-5 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*	104
5.4	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-5	105
5.5	Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* 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 *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*	109
5.7	Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-6 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*	109
5.8	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-6	110
5.9	Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap	111

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

	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 *AnΔprtT* terhadap *A. niger* 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 *pyrG* daripada mutan *AnΔprtT*	136
6.2	Pertumbuhan kulat di atas agar MM tanpa urasil dan uridina pada hari ke-6 selepas proses kitar semula gen penanda *pyrG*	136
6.3	Profil elektroferesis agarosa (1%) bagi analisis penyaringan transforman yang membawa plasmid ANIp2-cut dalam *A. niger* PY11	138
6.4	Profil elektroferesis agarosa (1%) bagi analisis penyaringan transforman yang membawa plasmid ANIp2-cut dalam *AnΔprtT*	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 *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* berbanding hos masing-masing	140
6.7	Kestabilan kutinase heterolog dalam ekstrak kasar *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*	142

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

SENARAI SINGKATAN DAN UNIT

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

A	Bacaan penyerapan (absorbance)
BSA	Bovine serum albumin
C	Sistina
cDNA	Asid deoksiribonukleik komplementari
dH_2O	Air suling steril
ddH_2O	Air ternyahion
DEPC	Dietilpirokarbonat
Dlm.	Dalam
DMSO	Dimetil sufosida
DNA	Asid deoksiribonukleik
DNAse	Deoksiribonuklease
dNTP	Deoksinukleotida trifosfat
DTT	Ditiotreitol
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	*para*-nitrofenol laurat
ppm	*Bahagian per juta*
PVP	Polinivilpirolidon
RNA	Asid ribonukleik
RNAse	Ribonuklease
Q	Glutamina

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

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

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

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

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

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).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

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 *AnΔprtT* daripada *A. niger* PY11 melalui strategi penggantian gen.
2) Mencirikan protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* 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

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

BAB II

ULASAN KEPUSTAKAAN

2.1 KULAT BERFILAMEN

Kulat berfilamen merupakan mikroorganisma multisel yang mempunyai morfologi yang kompleks berbanding mikroorganisma unisel seperti yis dan bakteria. Kulat berfilamen menunjukkan morfologi yang berbeza pada waktu yang berbeza dalam kitar hidupnya. Struktur vegetatif asas bagi kulat berfilamen adalah filamen bertubul yang dikenali sebagai haifa dengan diameter antara 2 hingga 18 μm. Haifa terbentuk daripada percambahan spora reproduktif tunggal. Semasa pertumbuhan haifa, cabang-cabang filamen bertubul yang banyak akan terbentuk dan struktur ini dipanggil miselium (Papagianni 2004). Contoh kulat peringkat tinggi yang mempunyai haifa berseptum termasuklah spesies *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* dan *Fusarium*. Manakala kulat peringkat rendah yang mempunyai haifa tanpa septum adalah spesies *Rhizopus* dan *Mucor*. Kulat berfilamen adalah kemo-organotrof iaitu organisma yang mendapatkan tenaga dan karbon daripada pengoksidaan bahan organik (Ward 2012).

Kulat berfilamen adalah organisma luar biasa yang mempunyai impak yang besar dalam bidang bioteknologi. Melalui teknologi fermentasi secara tradisional, kulat berfilamen boleh menghasilkan pelbagai metabolit primer termasuklah asid organik seperti asid sitrik, asid glukonik, asid fumarik, asid kojik dan asid lemak. Selain itu, metobolit sekunder seperti penisilin, sefalosporin, lovastatin, taksol dan zeranol juga boleh dihasilkan oleh kulat berfilamen sebagai bahan terapeutik manusia. Kebanyakan kulat berfilamen juga berupaya menghasilkan pelbagai jenis

enzim industri seperti selulase, pektinase, protease, lipase, fitase dan ligninase (Ward 2012).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

2.1.1 *Aspergillus niger*

A. niger adalah kulat berfilamen yang hidup secara aerobik di atas bahan organik. Di persekitaran, *A. niger* boleh ditemui pada pelbagai habitat seperti dalam tanah, sampah, kompos atau tumbuhan yang mereput (Schuster et al. 2002). *A. niger* boleh hidup dalam julat suhu yang luas iaitu antara 6 hingga 47°C dan juga mampu hidup dalam julat pH yang luas iaitu antara 1.4 hingga 9. *A. niger* dikategorikan sebagai kulat bukan patogen yang boleh ditemui secara meluas di alam semula jadi. Manusia yang terdedah kepada sporanya setiap hari biasanya tidak dijangkiti apa-apa penyakit. Hanya terdapat beberapa kes di mana *A. niger* berjaya mengkoloni tubuh manusia sebagai patogen oportunis. Namun dalam kebanyakan kes, ianya berlaku pada pesakit yang mempunyai sejarah penyakit yang teruk atau yang menerima rawatan imunosupresif (Schuster et al. 2002).

Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

A. niger adalah salah satu mikroorganisma yang penting dalam industri bioteknologi. Kulat ini telah dieksploitasi secara meluas untuk penghasilan enzim industri dan asid organik (Jacobs et al. 2009). Sebagaimana spesies *Aspergillus* yang lain, *A. niger* merembeskan pelbagai enzim yang berupaya mendegradasi polimer dalam substrat kepada molekul yang boleh diambil dan digunakan sebagai nutrien. Sebagai contoh, amilase dirembeskan untuk degradasi kanji, xilanase untuk degradasi xilan dan pektinase untuk degradasi pektin yang terkandung dalam tumbuhan. Selain kapasiti untuk merembeskan protein dalam jumlah yang besar, perkembangan teknologi fermentasi dan biologi molekul telah menjadikan *Aspergillus* seperti *A. niger* sebagai kilang sel yang menarik bagi penghasilan protein homolog dan heterolog (Meyer et al. 2011).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

2.1.2 *A. niger* PY11

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

A. niger strain PY11 (*cspA1*$^{-}$, *pyrG6*$^{-}$, Δ*glaA::HISG,* Δ*bglA::HISG)* merupakan kulat berfilamen yang dibangunkan secara khusus sebagai hos pengekspresan untuk penghasilan protein heterolog yang tinggi. Strain ini diperoleh daripada Concordia University, Montreal, Kanada (Storms et al. 2005). *A. niger* PY11 berasal daripada strain N593 (*cspA1*$^{-}$ *pyrG6*$^{-}$) (Bos et al. 1988) yang telah dinyahaktifkan gen glukoamilase A (*glaA*) dan β-glukosidase A (*bglA*) melalui kaedah penggantian gen sasaran (Storms et al. 2005). Glukoamilase A dan β-glukosidase A adalah antara protein homolog yang dirembeskan dengan banyak oleh *A. niger*. Ketiadaan glukoamilase A dan β-glukosidase A telah meningkatkan perembesan protein heterolog sehingga 30% selain dapat mengurangkan kehadiran protein hos di dalam supernatan kultur *A. niger* PY11 (Reginald Storms, komunikasi peribadi). *A. niger* PY11 juga adalah auksotrof urasil kerana gen *pyrG* yang diperlukan untuk biosintesis urasil telah dinyahaktifkan. Ini menyebabkan *pyrG* digunakan sebagai gen penanda yang membolehkan penyaringan transforman dilakukan melalui manipulasi medium pertumbuhan. Selain itu, gen *cspA1*$^{-}$ pada *A. niger* PY11 juga telah dinyahaktifkan menyebabkan strain ini mempunyai konidiofor yang pendek (Storms et al. 2005). Fenotip ini memudahkan pengendalian spora *A. niger* di dalam makmal. Secara umumnya, kesemua ciri di atas adalah penting untuk membolehkan *A. niger* PY11 dieksploitasi sebagai hos pengekspresan untuk protein heterolog.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

2.2 KULAT BERFILAMEN SEBAGAI HOS PENGEKSPRESAN PROTEIN HETEROLOG

Tarikan kulat berfilamen sebagai hos pengekspresan protein adalah berdasarkan keupayaan semulajadinya yang dapat merembes pelbagai protein dalam jumlah yang banyak ke dalam medium pertumbuhan (Nevalainen et al. 2005). Ini kerana kulat berfilamen boleh hidup dalam persekitaran yang berbeza-beza seperti pada tanah, bahan buangan organik dan sel tumbuhan mati dengan menggunakan bahan organik tersebut sebagai sumber nutrien (Gouka et al. 1997). Pada masa kini, kulat berfilamen yang mendominasi pasaran sebagai hos pengekspresan adalah *A. niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus awamori* dan *Trichoderma reesei*. Selain itu, beberapa sistem kulat berfilamen yang lain turut mendapat perhatian sebagai hos pengekspresan

Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

seperti *Fusarium graminearum*, *Aspergillus japonicas*, *Aspergillus sojae* dan *Chrysosporium lucknowense*. *C. lucknowense* dikatakan mempunyai frekuensi transformasi yang tinggi, menghasilkan protein pada pH neutral, menghasilkan protease natif yang rendah dan berupaya menghasilkan protein heterolog sehingga 100 g/L (Nevalainen et al. 2005; Verdoes et al. 2007). Kebanyakan strain yang penting kepada industri seperti *A. niger*, *A. oryzae* dan *T. reesei* telah diberi status GRAS (generally recognized as safe) oleh pihak Pentadbiran Makanan dan Dadah (FDA), Amerika. Oleh sebab itu, produk-produk yang disintesis oleh hos pengekspresan berstatus GRAS, lebih mudah diterima berbanding produk-produk yang dihasilkan oleh hos pengekspresan yang tidak diperakui (Fleissner & Dersch 2010).

Keupayaan kulat untuk merembes protein ke dalam medium pertumbuhan merupakan suatu kelebihan dalam proses penghasilan protein. Proses penulenan protein sasaran menjadi lebih mudah apabila langkah-langkah seperti pemecahan sel dan penyingkirkan protein intra sel tidak diperlukan (Sharma et al. 2009). Teknik-teknik fermentasi kulat juga telah dibangunkan dengan baik. Oleh kerana kadar pertumbuhan dan ketumpatan biojisim kulat berfilamen adalah tinggi, pengkulturan kulat boleh dilakukan pada skala yang besar dengan kos substrat yang rendah (Ward 2012). Berbanding sistem pengekspresan bakteria yang tidak mampu untuk menghasilkan protein eukariot yang memerlukan modifikasi pos-translasi seperti glikosilasi dan pembentukan jambatan dwi-sulfida, kulat berfilamen ternyata mampu menghasilkan protein dengan pelipatan yang betul dan berfungsi (van den Hombergh et al. 1997b).

Kulat berfilamen telah digunakan secara meluas dalam industri fermentasi sebagai hos pengekspresan protein terutamanya enzim-enzim industri (Nevalainen et al. 2005). Produktiviti bagi kulat berfilamen yang dapat menghasilkan sekitar 30 hingga 40 g /L enzim homolog seperti selulase dan amilase sudah dikira hebat berbanding sistem pengekspresan yang lain (Sharma et al. 2009). *A. niger* berupaya menghasilkan antara 20 hingga 30 g/L glukoamilase manakala *T. reesei* dilaporkan boleh menghasilkan sehingga 100 g/L protein homolog (Demain & Vaishnav 2009). Sejak lebih dua dekad yang lalu, kulat berfilamen turut dieksplorasi sebagai hos

untuk penghasilan protein heterolog kerana kemampuannya menghasilkan protein homolog dengan baik (Braaksma & Punt 2008). Novozymes, merupakan sebuah syarikat daripada Denmark yang pertama menghasilkan lipase heterolog (Lipolase) daripada *A. oryzae* yang telah dimodifikasi secara genetik pada tahun 1988 (Nevalainen & Te'-o 2003). Namun, tahap penghasilan protein heterolog yang bukan berasal daripada kulat seperti mamalia, tumbuhan dan avian adalah jauh lebih rendah daripada protein heterolog yang berasal daripada kulat. Hasil yang rendah ini menyebabkan protein heterolog bukan kulat sukar dihasilkan pada skala yang besar di peringkat industri (Ward 2012). Hasil beberapa protein heterolog daripada kulat dan bukan kulat yang diekspreskan oleh *Aspergillus* diberi pada Jadual 2.1. Beberapa halangan terhadap penghasilan protein heterolog bukan kulat telah dikenal pasti, antaranya adalah tahap transkripsi mRNA yang rendah, ketidakstabilan mRNA, ketidakefisienan proses translasi, masalah pos-translasi dan degradasi protein sasaran oleh protease natif (Lubertozzi & Keasling 2008).

2.3 TAPAK JALAN PEREMBESAN PROTEIN DALAM KULAT BERFILAMEN

Kulat berfilamen telah menarik minat penyelidik dan syarikat komersil kerana keupayaannya untuk merembes enzim pada jumlah yang besar. Walau bagaimanapun, jumlah protein heterolog yang dirembeskan oleh kulat berfilamen adalah tidak memuaskan berbanding protein homolog (Punt et al. 2002; van den Hombergh et al. 1997b). Justeru, masalah yang dihadapi dalam penghasilan protein heterolog telah merangsang penyelidikan tentang tapak jalan perembesan protein dan kesesakan vesikular dalam kulat berfilamen (Conesa et al. 2001; Shoji et al. 2008).

Secara umumnya, tapak jalan perembesan dalam kulat berfilamen tidak banyak berbeza dengan yis dan eukariot peringkat tinggi. Namun, perbezaan yang paling ketara adalah fenotip pertumbuhan miselium yang terhasil daripada pemanjangan polar pada hujung haifa yang tidak ditemui sama ada pada yis *Saccharomyces cerevisiae* atau eukariot peringkat tinggi (Conesa et al. 2001). Oleh sebab itu, kapasiti perembesan protein dalam kulat berfilamen adalah sepuluh kali ganda lebih tinggi daripada yis (Lubertozzi & Keasling 2008).

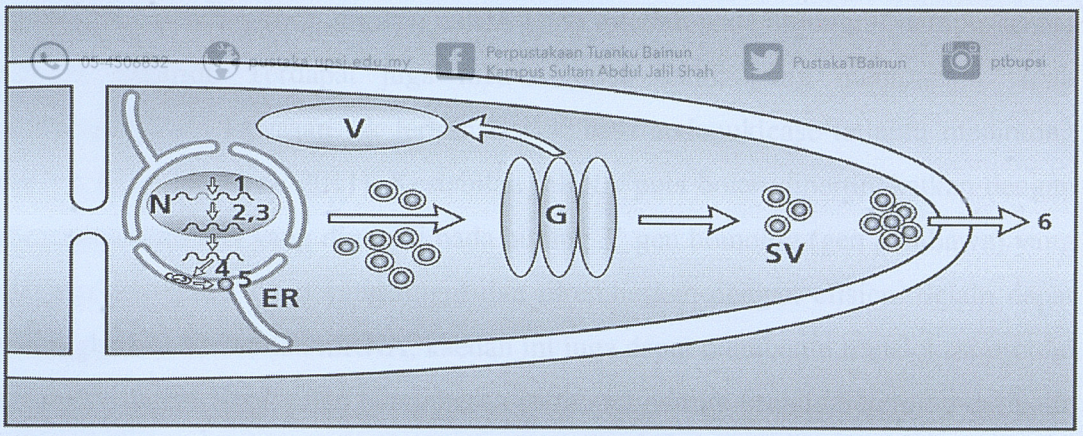
Jadual 2.1 Contoh protein heterolog yang dihasilkan oleh *Aspergillus*

Protein dan sumber	Jumlah protein heterolog	Sistem pengekspresan	Rujukan
Kimosin (sapi)	78 mg/L	*A. oryzae*	Zhu et al. (2012)
Perencat α_1-proteinase (manusia)	12 mg/L	*A. niger*	Karnaukhova et al. (2007)
Interleukin 6 (manusia)	150 mg/L	*A. niger*	Punt et al. (2002)
Lisozim (putih-telur ayam betina)	1.0 mg/L	*A. niger*	Gyamerah et al. (2002)
Glukoamilase (*A. niger*)	4.6 g/L	*A. awamori*	Radzio & Kuck (1997)
Laktoferin (manusia)	2.0 g/L	*A. oryzae*	Ward et al. (1995)
Interferon-a 2 (manusia)	0.2 mg/L	*Aspergillus nidulans*	Macrae et al. (1993)
Kimosin (anak lembu)	0.16 mg/L	*A. oryzae*	Dunn-Coleman et al. (1991)

Rajah 2.1 menunjukkan tapak jalan perembesan protein oleh kulat berfilamen. Protein rembesan memulakan perjalanannya menuju ke medium ekstra sel dengan memasuki retikulum endoplasma (RE). Dalam RE, protein akan mengalami proses pelipatan dan modifikasi seperti glikosilasi, pembentukan jambatan dwisulfida, pemfosfatan dan penyatuan subunit. Seterusnya, protein akan dipakej dalam vesikel pengangkut dan dibawa ke jasad Golgi, di mana proses modifikasi tambahan akan berlaku seperti glikosilasi dan pemprosesan jujukan peptida. Akhir sekali, protein akan dipakej dalam vesikel rembesan dan digerakkan ke membran plasma untuk dirembeskan (Conesa et al. 2001).

2.4 FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI PENGEKSPRESAN PROTEIN HETEROLOG DAN STRATEGI UNTUK MENINGKATKAN PENGHASILAN PROTEIN HETEROLOG

Pada tahap transkripsi, sekurang-kurangnya ada dua faktor yang boleh mempengaruhi tahap mRNA iaitu pemprosesan transkrip yang tidak betul dan kestabilan mRNA yang rendah. Kajian mendapati bahawa jujukan kaya dengan AT dalam kawasan pengkodan gen heterolog bertindak sebagai jujukan poliadenilasi dalaman yang menyebabkan terhasilnya transkrip yang pendek dan tidak lengkap (Koushki et al. 2011). Penamatan pra-matang proses transkripsi boleh diatasi dengan menggantikan



Rajah 2.1 Tapak jalan perembesan protein dalam kulat berfilamen beserta strategi-strategi untuk meningkatkan penghasilan protein heterolog
Polipeptida yang baru disintesis akan mengalami pelipatan dan modifikasi di dalam retikulum endoplasma (ER). Hanya protein yang dilipat dengan betul akan dipakej dalam vesikel untuk meninggalkan ER dan menuju ke Golgi (G). Di Golgi (G), protein akan mengalami modifikasi tambahan sebelum dipakej sekali lagi dalam vesikel perembesan (SV) untuk dirembes keluar melalui hujung haifa. N-Nukleus, ER-Retikulum endoplasma, V-Vesikel, G-Alat Golgi, SV-Vesikel perembesan. Antara strategi yang boleh digunakan untuk meningkatkan penghasilan protein heterolog adalah dengan memperkenalkan multi-salinan gen yang diminati (1), menggunakan promoter yang kuat untuk mengawal atur pengekspresan gen sasaran (2), menggunakan isyarat perembesan yang efisien (3), mencantumkan gen sasaran dengan protein yang dirembeskan dengan baik (4), pengekspresan komponen-komponen gerak balas protein ternyahlipat (GPT) seperti caperon dan foldase (5), menggunakan strain kurang-protease (6).

Sumber: Conesa et al. 2001

jujukan kaya-AT tersebut dengan jujukan yang kaya-GC atau merubah kepincangan kodon (Romanos et al. 1992; Te'o et al. 2000). Apabila gen prokariot seperti α-galaktosidase dan β-galaktosidase diekspreskan dalam *A. niger*, pemangkasan pra-mRNA dapat dihalang dengan menggantikan jujukan kaya-AT dengan jujukan kaya-GC (Gouka et al. 1996).

Kebanyakan mRNA dalam sel eukariot tidak stabil kerana mengandungi jujukan spesifik yang kaya-AU pada kawasan tak tertranslasi 3' yang mengaruh degradasinya. Jujukan kaya-AU ini mempercepatkan degradasi mRNA dengan

merangsang penyingkiran jujukan poli-A yang ditemui pada hujung 3' hampir semua mRNA eukariot. Terdapat juga mRNA tidak stabil yang mempunyai tapak pengenalan pada kawasan tak tertranslasi 3' bagi endonuklease tertentu memotong mRNA (Koushki et al. 2011). Kestabilan mRNA pula boleh dipertingkatkan dengan mencantumkan gen yang diminati pada hujung 3' gen homolog (gen pembawa) yang diekspreskan pada tahap yang tinggi dan direMbeskan dengan efisien. Selain dapat meningkatkan kestabilan mRNA, kaedah ini juga dapat membantu translokasi protein heterolog dalam tapak jalan perembesan serta melindungi protein heterolog daripada degradasi proteolitik (Fleissner & Dersch 2010). Contoh protein pembawa yang dicirikan dengan baik dan sering digunakan adalah selobiohidrolase (CBHI) daripada *T. reesei* dan glukoamilase A (glaA) daripada *A. niger* (Koushki et al. 2011). Penggunaan protein pembawa memerlukan penyingkiran pembawa tersebut supaya protein heterolog dapat berfungsi sepenuhnya. Pemotongan *in vivo* dalam *A. niger* dan *A. nidulans* dilakukan dengan memasukkan peptida penjarak yang membawa tapak pemotongan endoprotease seperti KEX-2-protease (Broekhuijsen et al. 1993).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Protein vakuol dan protein rembesan yang baru disintesis akan dimasukkan ke dalam lumen RE bagi tujuan pelipatan dan modifikasi. RE mempunyai peranan yang penting untuk kawalan kualiti bagi setiap protein (Shoji et al. 2008). Kajian juga menunjukkan bahawa tahap pengekspresan protein heterolog yang rendah juga disebabkan masalah pada tahap pos-translasi. Kemasukan protein yang banyak dan berterusan ke dalam RE akan menyebabkan proses pelipatan yang tidak betul atau lambat. Situasi ini dipanggil tekanan RE atau tekanan perembesan protein (Guillemette et al. 2007). Sel akan bertindak balas dengan tekanan RE melalui mekanisme gerak balas tekanan seperti gerak balas protein ternyahlipat (GPT) (Mori 2000) dan degradasi protein berkait-RE (Jacob et al. 2009). Protein ternyahlipat akan diasingkan di RE dan dihantar ke proteosom (Hampton 2002) atau ke vakuol (Coughlan et al. 2004; Hong et al. 1996; Kruse et al. 2006) untuk didegradasi.

Maka, tekanan RE dilihat sebagai salah satu daripada halangan dalam penghasilan protein heterolog kerana pengekspresan protein heterolog sering mencetuskan GPT dan pengekspresan protein pengiring. Mekanisme GPT mengesan kehadiran protein ternyahlipat dalam RE dan mengaruh sintesis enzim-enzim

pelipatan (Conesa et al. 2001). GPT melibatkan tapak jalan pengisyaratan yang kompleks di mana faktor transkripsi, HACA memainkan peranan penting (Sharma et al. 2009). Mulder et al. (2004) menunjukkan bahawa HACA *A. niger* mengikat pada elemen GPT pada jujukan promoter beberapa protein pengiring RE dan foldase. Sementara itu, Valkonen et al. (2003) menunjukkan bahawa aruhan secara konstitutif tapak jalan GPT dalam *A. niger var awamori* boleh dicapai dengan mengekspreskan faktor transkripsi, *hacA* dalam bentuk aktif. GPT terdiri daripada pengaktifan transkripsi beberapa gen yang mengekod komponen-komponen yang terlibat dalam pelipatan protein, glikosilasi dan pengangkutan (Fleissner & Dersch 2010). Dalam *A. awamori*, pengekspresan protein pengiring pembantu-pelipatan RE, BipA menunjukkan peningkatan 2 hingga 2.5 kali ganda penghasilan taumatin, sejenis pemanis berkalori rendah (Lombrana et al. 2004). Strain *A. awamori* yang mengandungi multi-salinan gen *pdiA* yang mengekod protein disulfida isomerase telah menghasilkan lima kali ganda taumatin. Protein disulfida isomerase, pdiA bertanggungjawab dalam pembentukan dan isomerasasi ikatan disulfida (Moralejo et al. 2001).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Glikosilasi protein merupakan aspek penting dalam kajian yang melibatkan pengekspresan protein heterolog kerana ia berperanan dalam pelipatan protein yang betul, memberi maklumat tentang degradasi protein serta sebagai kawalan kualiti (Helenius & Aebi 2004). Glikosilasi juga adalah cabaran utama untuk menghasilkan protein rekombinan mamalia oleh kulat berfilamen kerana ia boleh mempengaruhi fungsi protein, separuh hayat serum (*half life*) dan keimunogenan (Nevalainen & Peterson 2014). Bagi mengatasi masalah dalam perembesan protein heterolog, beberapa pendekatan telah dilakukan untuk menambah baik glikosilasi protein heterolog. Sebagai contoh, pengekspresan kalneksin, faktor kualiti RE telah meningkatkan sehingga lima kali ganda rembesan manganese proksidase daripada *Phanerochaete chrysosporium* (Conesa et al. 2002). Selain itu, penambahbaikan tapak N-glikosilasi atau penambahan tapak glikosilasi didapati menunjukkan peningkatan yang signifikan terhadap penghasilan kimosin dalam *A. niger* (van den Brink et al. 2006).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Selepas meninggalkan RE, protein akan diangkut melalui vesikel ke dalam kompartmen Golgi di mana glikosilasi tambahan akan berlaku. Kemudian, protein akan diangkut sekali lagi melalui vesikel menuju ke dinding sel sebelum dirembes ke medium ekstra sel (Fleissner & Dersch 2010). Sejurus tiba di medium ekstra sel, protein heterolog terdedah kepada risiko degradasi proteolitik. Sebagai organisma saprofit, kulat berfilamen sememangnya merembeskan enzim protease pada jumlah yang signifikan dan boleh mendegradasi protein heterolog dengan efisien (van den Hombergh et al. 1997b). Banyak usaha untuk mengatasi masalah ini difokuskan kepada pembangunan dan penggunaan strain kulat kurang-protease sebagai hos pengekspresan (Koushki et al. 2011). Penggunaan strain kurang-protease telah memperbaiki tahap penghasilan protein heterolog dalam *A. niger* (Berka et al. 1990; Broekhuijsen et al. 1993; Roberts et al. 1992).

Tahap penghasilan sesuatu protein oleh strain semula jadi yang sedia ada biasanya terlalu rendah untuk diaplikasikan secara komersil. Oleh itu, strategi penambahbaikan strain secara tradisional telah dilakukan melalui pelbagai kaedah mutagenesis dan pendekatan ini didapati dapat membantu meningkatkan penghasilan protein sasaran (Punt et al. 2002).

Radiasi sinar X atau ultra lembayung dan mutagenesis menggunakan bahan kimia adalah antara kaedah mutagenesis yang boleh digunakan untuk menjana mutan. Pada masa kini, mutagenesis ke atas spora sering dilakukan dengan menggunakan radiasi ultra lembayung yang kurang aggresif berbanding sinar X (Braaksma & Punt 2008). Kaedah ini telah berjaya memencilkan beberapa mutan kurang-protease daripada *A. niger* (Mattern et al. 1992; van den Hombergh et al. 1995) dan *A. nidulans* (Katz et al. 1996). Selepas proses mutagenesis, spora akan dipiringkan di atas medium yang mengandungi susu atau gelatin dan kasein. Mutan yang mempunyai aktiviti proteolitik yang rendah disaring dengan melihat penurunan degradasi kasein yang ditunjukkan melalui pengurangan zon halo pada piring tersebut. Menerusi kaedah ini, Mattern et al. (1992) telah berjaya memencilkan mutan-mutan *A. niger* yang menunjukkan aktiviti proteolitik ekstra sel residual yang berbeza-beza iaitu, antara 2% hingga 80% daripada aktiviti protease jenis liar. Katz et

al. (1996) pula berjaya memencilkan mutan *A. nidulans* yang menunjukkan pengurangan aktiviti protease pada tahap sepuluh kali ganda berbanding jenis liar.

Walaupun kaedah mutagenesis secara rawak dapat menghasilkan mutan yang baik untuk penghasilan protein, namun asas genetiknya tidak diketahui. Mutan tersebut juga berkemungkinan menunjukkan kesan pleotropik yang tidak diingini pada prestasi fermentasi kulat seperti gangguan pada pengekspresan gen dan kadar pertumbuhan. Justeru, strategi penggantian gen telah menjadi pilihan setelah kaedah genetik molekul semakin berkembang (Braaksma & Punt 2008). Berka et al. (1990) adalah yang pertama membina vektor penggantian gen untuk *Aspergillus* dan digunakan untuk menyahaktif gen mengekod asid protease ekstra sel, aspergillopepsin A (*pepA*) dalam *A. awamori*. Gangguan pada gen *pepA* tersebut telah menyebabkan penurunan aktiviti proteolitik ekstra sel berbanding jenis liar. Hasil yang sama diperoleh dengan gangguan gen aspergilliopepsin A dalam *A. niger* (Mattern et al. 1992).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Pendekatan kejuruteraan bioproses juga terbukti berjaya mengawal aktiviti protease ekstra sel. Pemegunan (*immobilization)* sel *A. niger* kepada bahan seperti pad bersalut logam atau manik Celite didapati mengurangkan perembesan protease ekstra sel dan meningkatkan perembesan glukoamilase (Liu et al. 1998; Papagianni et al. 2002). Manipulasi morfologi *A. niger* dengan cara mengawal tahap inokulum (kepekatan spora) atau jenis inokulum (vegetatif atau spora) juga menunjukkan kesan terhadap tahap protease (Papagianni & Moo-Young 2002; Xu et al. 2000). Pertumbuhan miselium dalam bentuk pelet yang besar memberikan hasil aktiviti protease spesifik yang lebih rendah disamping meningkatkan penghasilan protein berbanding morfologi berfilamen (Grimm et al. 2005). Braaksma et al. (2009) turut mengkaji kesan pH dan pelbagai komponen medium terhadap tahap aktiviti protease ekstra sel dalam kultur fermentasi terkawal dalam *A.niger*.

2.5 PROTEASE KULAT

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Berdasarkan Jawatankuasa Tatanama Kesatuan Antarabangsa Biokimia dan Biologi Molekul, protease diklasifikasikan dalam kumpulan kecil 4, iaitu di bawah kumpulan

3 (hidrolase) (E.C.3.4). Berdasarkan tapak tindakan pada substrat protein, protease dibahagikan kepada dua kumpulan utama iaitu eksopeptidase dan endopeptidase (Jadual 2.2). Eksopeptidase memotong ikatan peptida hanya pada hujung rantaian polipeptida substrat, sama ada di terminal N (aminopeptidase) atau C (karboksipeptidase). Endopeptidase pula memotong ikatan peptida dalam kawasan rantaian polipeptida substrat, iaitu jauh daripada kedua-dua terminal. Endopeptidase dikelaskan kepada empat kumpulan kecil berdasarkan kepada kumpulan fungsi yang hadir pada tapak aktif, iaitu protease serina, aspartik, sisteina dan metaloprotease (Jadual 2.2) Berdasarkan kepada pH optimum bagi sesuatu protease itu berfungsi, enzim proteolitik juga dikategorikan kepada protease asid, neutral atau alkali (Nirmal et al. 2011).

Protease kulat menarik minat ramai pengkaji disebabkan kepelbagaiannya yang tinggi, kespesifikan substrat yang luas dan kestabilannya pada keadaan ekstrem. Protease kulat aktif pada julat pH yang luas (pH 4 hingga 11). Walau bagaimanapun, protease kulat mempunyai kadar tindak balas dan toleransi haba yang rendah berbanding bakteria (Rao et al. 1998). Suhu optimum bagi protease kulat berada dalam julat 35 hingga 50°C. Kulat berupaya untuk menghasilkan protease asidik, neutral, alkali dan metalo (Nirmal et al. 2011). Protease asidik mempunyai pH optimum di antara 4 hingga 4.5 dan stabil di antara pH 2.5 hingga 6. Protease asidik banyak digunakan dalam pembuatan keju disebabkan kespesifikan suhu dan pH yang terhad. pH optimum bagi protease neutral adalah di antara 6 hingga 8. Manakala protease alkali biasanya stabil pada pH di antara 6 hingga 10 dan digunakan dengan meluas dalam industri pembuatan bahan pencuci dan modifikasi protein makanan (Rao et al. 1998). Protease kulat boleh diperoleh dengan mudah melalui proses fermentasi-keadaan pepejal. Fermentasi kulat mempunyai kelebihan dari segi pemisahan miselium dengan protein melalui penapisan yang mudah (Jisha et al. 2013).

2.6 FUNGSI FISIOLOGI PROTEASE

Protease atau peptidase adalah satu kelas enzim yang mempunyai peranan yang penting dalam fisiologi dan patologi organisma hidup serta dalam bidang komersil.

Jadual 2.2 Pengkelasan dan mekanisme tindakan spesifik protease

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

No. E.C	Jenis Protease	Mekanisma tindakan
Eksopeptidase		Memotong ikatan peptida proksimal kepada terminal N atau C pada substrat.
3.4.11-	Aminopeptidase	Bertindak pada terminal N bebas dan membebaskan residu asid amino tunggal.
3.4.13-	Dipeptidase	Bertindak hanya pada dipeptida.
3.4.14-	Peptidase dipeptidil	Membebaskan dipeptida pada terminal N daripada rantai polipeptida.
3.4.14-	Peptidase tripeptidil	Membebaskan tripeptida pada terminal N daripada rantai polipeptida.
3.4.15-	Dipeptidase peptidil	Membebaskan dipeptida pada terminal C bebas.
3.4.16-	Karboksipeptidase (serina)	Membebaskan residu tunggal pada terminal C daripada rantai polipeptida. Mempunyai serina pada tapak aktif yang terlibat dalam aktiviti katalitik.
3.4.17-	Karboksipeptidase (metalo)	Membebaskan residu tunggal pada terminal C daripada rantai polipeptida. Memerlukan ion metal dalam mekanisme katalitik.
3.4.18-	Karboksipeptidase (sistina)	Membebaskan residu tunggal pada terminal C daripada rantai polipeptida. Mempunyai sistina pada tapak aktif yang terlibat dalam aktiviti katalitik.
3.4.19-	Omega peptidase	Membebaskan residu termodifikasi daripada terminal N atau C.
Endopeptidase		Memotong ikatan dalaman dalam rantai polipeptida.
3.4.21-	Endopeptidase serina	Mempunyai serina pada tapak aktif yang terlibat dalam aktiviti katalitik.
3.4.22-	Endopeptidase sistina	Mempunyai sistina pada tapak aktif yang terlibat dalam aktiviti katalitik.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

bersambung...

...sambungan

3.4.23-	Endopeptidase aspartik	Mempunyai aspartik pada tapak aktif yang terlibat dalam aktiviti katalitik.
3.4.24-	Endopeptidase metalo	Memerlukan ion metal dalam mekanisme katalitik.
3.4.99-	Endopeptidase yang tidak diketahui mekanisme katalitiknya	Bertindak pada ikatan peptida.

Sumber: Jisha et al. 2013

Antara proses fisiologi dan patologi yang melibatkan protease adalah seperti katabolisme protein, pertumbuhan dan migrasi sel, perembesan hormon, pembekuan darah, morfogenesis, inflamasi dan sebagainya (Lata et al. 2014). Secara umumnya, protease intra sel mempunyai fungsi yang kritikal dalam pengawalaturan metabolisme (Rao et al. 1998). Manakala, protease ekstra sel pula berperanan untuk degradasi protein kepada peptida yang lebih kecil atau asid amino bagi membekalkan nutrien kepada sel apabila tiada sumber karbon atau nitrogen pilihan (Braaksma et al. 2009).

Semua sel hidup mengekalkan perolehan protein (*protein turn over*) melalui degradasi dan sintesis protein secara berterusan. Katabolisme protein menyediakan longgokan asid amino tersedia yang bertindak sebagai prekursor untuk sintesis protein yang baharu. Protease dalam sel adalah enzim yang terlibat dalam melaksanakan perolehan protein (Rao et al. 1998).

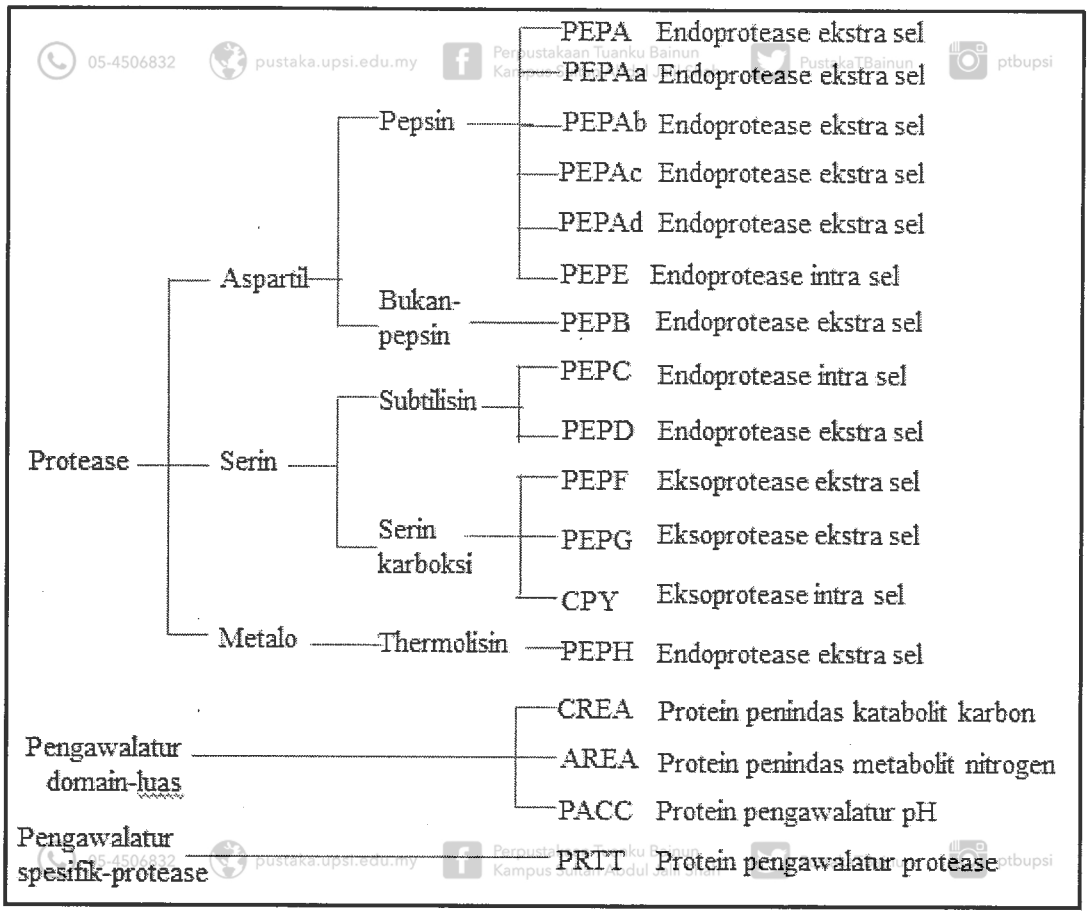
Pembentukan askospora dalam yis diploid, jasad buah dalam kulapuk lendir dan pelepasan konidia daripada konidiofor kulat, kesemuanya melibatkan perolehan protein yang intensif (Esposito & Klapholz 1981; North 1982; Rao et al. 1998). Pembentukan askospora dalam dipoid yis telah ditunjukkan berkaitan dengan peningkatan aktiviti protease A (Nirmal et al. 2011). Protease serina alkali

Conidiobolus coronatus telah ditunjukkan terlibat dalam pelepasan konidium secara paksa melalui pemencilan mutan yang menunjukkan kurang pembentukan konidium (Jisha et al. 2013).

Spora dorman mempunyai kurang asid amino yang penting untuk percambahan. Degradasi protein dalam spora dorman oleh endoproteinase serina menjadikan asid amino dan nitrogen tersedia untuk biosintesis protein dan nukleotida yang baru (Jisha et al. 2013). Begitu juga dengan percambahan mikrokonidium dan cantuman haifa, yang melibatkan protease serina alkali yang spesifik (Rao et al. 1998). Protease asid ekstra sel dipercayai terlibat dalam memutuskan rantaian polipeptida dinding sel semasa percambahan spora *Dictyostelium discoideum* (Jackson & Cotter 1984).

2.7 SPEKTRUM PROTEASE *A. niger*

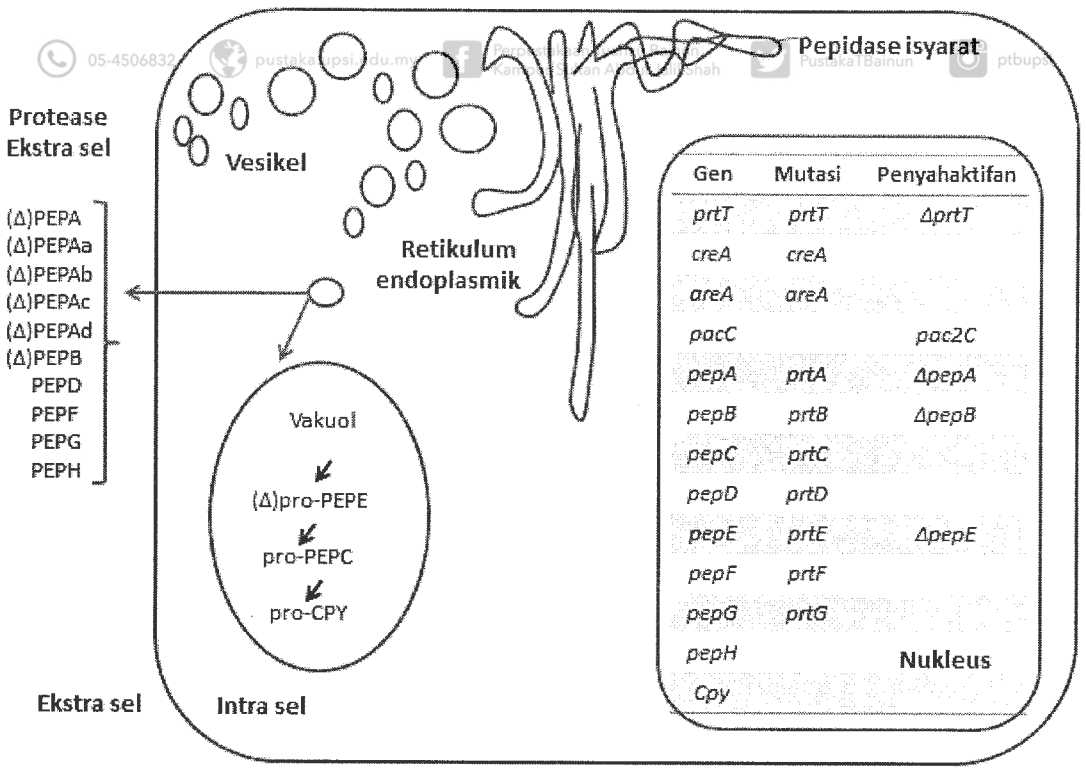
Aspergillus menghasilkan protease dalam spektrum yang luas dan jenis protease yang dihasilkan bersifat spesifik terhadap spesies (Bartling et al. 1996). Bagi *A. niger*, protease asidik didapati mendominasi protease ekstra sel yang dihasilkan. Empat protease ekstra sel telah dicirikan iaitu dua protease aspartil (PepA dan PepB) dan dua karboksipeptidase serina (PepF dan PepG) (Berka et al. 1990; Inoue et al. 1991; Krishnan & Vijayalakshimi 1985; Mattern et al. 1992; van den Hombergh et al. 1994). Kemudian, protease serina jenis-subtilisin, PepD telah diklon berdasarkan penjajaran jujukan asid amino terpulihara dengan subtilisin yang lain (Jarai et al. 1994a). Tiga gen protease yang homolog kepada gen protease pada vakuol yis juga telah diklonkan daripada *A. niger* iaitu endoprotease aspartil jenis-pepsin (*pepE*) yang berhomolog dengan gen protease vakuol (*pep4*) daripada yis, endoprotease serina jenis-subtilisin (*pepC*) dan karboksipeptidase serina (*cpy*) (Frederick et al. 1993; Jarai et al. 1994b). Seterusnya, empat gen (*pepAa, pepAb, pepAc* dan *pepAd*) yang mengekod protease aspartik mirip-pepsin telah dikenal pasti melalui pendekatan perbandingan genom (Wang et al. 2008). Setiap protein tersebut memiliki ciri yang berbeza dan dijangkakan mempunyai fungsi yang berbeza. Pengkelasan protease dan sistem proteolitik dalam *A. niger* ditunjukkan pada Rajah 2.2 dan 2.3.



Rajah 2.2 Pengkelasan protease dan protein pengawal atur yang terlibat dalam pengawalaturan protease dalam *A. niger*

Sumber: Punt et al. 2008; van den Hombergh et al. 1997b; Wang et al. 2008

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 2.3 Sistem proteolitik *A. niger* dan lokalisasi protease individu di dalam sel
Mutan protease dipencilkan sama ada melalui kaedah mutagenesis atau penyahaktifan gen.

Sumber: Punt et al. 2008; van den Hombergh et al. 1997b; Wang et al. 2008

2.8 SISTEM PENGAWALATURAN PROTEASE

Dua kumpulan gen pengawal atur telah dikenal pasti setakat ini iaitu gen yang mengekod pengawal atur spesifik bagi gen-gen protease dan gen yang mengekod pengawal atur domain-luas (Braaksma & Punt 2008). Bagi kumpulan gen pengawal atur yang pertama, hanya terdapat satu gen yang telah dikenal pasti dalam spesies yis dan kulat setakat ini iaitu gen *prtT*. Gen *prtT* diklonkan daripada mutan *A. niger* yang diaruh dengan UV. Analisis menunjukkan bahawa *prtT* adalah gen pengawal atur yang mengekod ahli keluarga kluster Zn-dwinuklear (Punt et al. 2008). Menariknya, *prtT* adalah unik bagi spesies *Aspergillus*, namun tidak ditemui pada *A. nidulans*. Gen pengawal atur domain-luas seperti yang telah ditunjukkan pada Rajah 2.2, mempengaruhi pengekspresan pelbagai enzim termasuk protease. Antaranya adalah

gerak balas terhadap pH ambien (gen *pacC*), sumber nitrogen (gen *areA*) atau sumber karbon (*creA*) (Braaksma & Punt 2008).

Gen *pacC* diekspreskan pada pH beralkali dan mengekod protein yang boleh mengaktifkan pengekspresan gen-gen yang diekspreskan pada keadaan beralkali serta untuk menghalang pengekspresan gen-gen yang diekspreskan pada keadaan berasid (Penalva & Arst 2002). Dalam *A. nidulans*, pengekspresan gen protease alkali yang utama, *prtA* diaktifkan oleh PacC. Walau bagaimanapun, penyahaktifan kawasan pengkodan *pacC* menjejaskan pertumbuhan *A. nidulans* dengan sangat teruk. Ini menjadikan pendekatan ini tidak sesuai untuk membangunkan strain sebagai hos pengekspresan protein (Tilburn et al. 1995). pH ambien merupakan parameter persekitaran yang sangat mempengaruhi pengekspresan protease. *A. niger* mempunyai ciri pengasidan medium kultur yang kuat yang menerangkan mengapa aktiviti protease berasid menyebabkan masalah utama semasa pengekspresan protein homolog dan heterolog (van den Hombergh et al. 1997b). Mengekalkan pH pada takat 6 semasa penghasilan GFP (*Green Fluorescence Protein*) oleh *A. niger* menyebabkan penghasilan GFP meningkat 10 kali ganda berbanding kultur yang dikawal pada pH 3. Peningkatan ini disebabkan berkurangnya degradasi GFP oleh protease (O'Donnell et al. 2001). Penghasilan interleukin-6 sitokin manusia oleh mutan kurang-protease yang tidak mengasidkan medium didapati memperbaiki hasil dan kestabilan protein tersebut (Punt et al. 2002).

Gen *areA* diekspreskan semasa ketiadaan sumber nitrogen pilihan seperti ammonia dan mengekod protein yang mengaktifkan transkripsi gen-gen mengekod enzim-enzim seperti protease yang terlibat dalam penggunaan sumber-sumber nitrogen yang lain (Ward et al. 2005). Penyahaktifan gen *areA* dalam *A. oryzae* menyebabkan peningkatan penghasilan protein heterolog kimosin disebabkan berkurangnya aktiviti protease (Christensen & Hynes 2000). Walau bagaimanapun, penyahaktifan gen *areA* dalam *A. oryzae* dan juga *A. niger* didapati mengganggu pertumbuhan kulat walaupun di dalam medium pengkulturan yang mengandungi tahap ammonium yang rendah (Christensen et al. 1998).

Gen *creA* diekspreskan semasa kehadiran sumber karbon pilihan seperti glukosa. Protein CreA menindas sintesis enzim-enzim seperti protease yang terlibat dalam katabolisme sumber-sumber karbon alternatif (Ruijter & Visser 1997). Walau bagaimanapun, percubaan untuk menyahaktif gen *creA* dalam *A. nidulans* menghasilkan mutan yang menunjukkan kesan morfologi yang sangat teruk selain daripada penurunan kadar pertumbuhan dan konidiasis (Shroff et al. 1997). Jelas sekali bahawa, pendekatan penyahaktifan gen-gen pengawalaturan domain luas seperti *pacC*, *areA* dan *creA* tidak sesuai untuk menjana hos kulat kurang-protease bagi penghasilan protein disebabkan kecacatan pertumbuhan pleiotropik yang ditunjukkan oleh mutan-mutan tersebut.

Kajian menunjukkan bahawa kehadiran protein dalam medium seperti penggunaan sumber karbon dan nitrogen kompleks boleh merangsang penghasilan protease ekstra sel (Fukushima et al. 1989; Singh et al. 1994). Namun, kesan yang sebaliknya juga telah dilaporkan apabila protein pendarfluor hijau (GFP) ekstra sel tidak dapat dikesan dalam hos *A. niger* yang dikultur dalam medium yang ditentukan kandungannya (*defined medium*). Namun begitu apabila susu soya terubahsuai digunakan sebagai medium, pendarfluor dapat dikesan. Menurut Gordon et al. (2000), keadaan ini bukan disebabkan oleh kesan penindasan protein susu soya yang digunakan, tetapi disebabkan oleh perencat protease semula jadi yang hadir dalam medium susu soya tersebut. Selain itu, pH ambien dapat dikekalkan pada tempoh lebih lama dalam medium yang ditentukan kandungannya (*defined medium*) pada tahap di mana aruhan protease dihadkan. Kemungkinan yang lain adalah kehadiran substrat yang banyak untuk protease telah melambatkan degradasi protein pendarfluor hijau (GFP).

Gen protease *pepA* dan *pepB* dalam *A. niger* diaruh apabila miselium dipindahkan ke medium yang mengandungi elastin. Manakala pengekspresan kedua-dua gen ditindas dalam medium yang mengandungi glukosa dan elastin (Ruijter & Visser 1997). Jarai dan Buxton (1994) pula menunjukkan hasil yang sedikit berbeza dalam eksperimen yang lebih kurang sama iaitu *A. niger* mengekspreskan *pepA* dan *pepB* dengan kehadiran glukosa sekiranya BSA (*bovine serum albumin*) turut hadir. Apabila medium ditambahkan dengan urea dan ammonia, pengekspresan kedua-dua

gen ditindas. Hasil ini mencadangkan bahawa aruhan disebabkan oleh kehadiran protein ekstra sel hanya memainkan peranan sekunder dalam pengawalaturan protease ekstra sel. Menurut Braaksma dan Punt (2008), ada kemungkinan bahawa protein itu sendiri bukanlah yang mengaruh protease. Malah protease diaruh oleh protein yang ditambah atau produk degradasi peptida yang menjadi sumber karbon dan nitrogen serta memainkan peranan yang penting dalam mekanisme pengawalaturan domain luas bagi kawalan metabolit nitrogen dan katabolit karbon.

2.9 FAKTOR TRANSKRIPSI SPESIFIK-PROTEASE *prtT*

Melalui pendekatan genetik klasik, Mattern et al. (1992) telah berjaya memencilkan strain *A. niger* AB1.13 yang menunjukkan aktiviti protease ekstra sel yang jauh lebih rendah berbanding strain asal. Gen protease ekstra sel yang utama dalam *A. niger* iaitu aspergillopepsin A (*pepA*) juga didapati telah dinyahaktifkan dalam strain mutan tersebut. Hasil ini mencadangkan bahawa mutan tersebut adalah mutan pengawalaturan yang mempengaruhi pengekspresan lebih daripada satu gen protease. Analisis genetik menunjukkan bahawa mutasi tersebut dipetakan pada lokus tunggal pada kromosom VI di mana, tiada satu pun gen yang mengekod protease ekstra sel yang utama dipetakan pada kromosom tersebut (Mattern et al. 1992; van den Hombergh et al. 1997a). Analisis Northern telah dilakukan bagi menganalisis kesan mutasi pada strain AB1.13 terhadap pengekspresan tujuh gen protease dalam *A. niger* termasuklah protein rembesan dan vakuol daripada famili protease yang berbeza-beza. Hasil analisis menunjukkan bahawa empat gen iaitu protease aspartik A1 (*pepA*), protease glumatik G1 (*pepB*), protease serina S8 (*pepD*) dan karboksipeptidase serina S10 (*pepF*) menunjukkan tiada pengekspresan yang signifikan berbanding strain AB4.1 (jenis liar). Tiga gen lagi iaitu protease serina vakuol S8 (*pepC*), protease aspartik vakuol A1 (*pepE*) dan karboksipeptidase vakuol S10 (*cpy*) menunjukkan tahap pengekspresan yang sama bagi kedua-dua strain. Manakala, bagi metaloprotease M36 (*pepH*), tiada pengekspresan yang dikesan bagi kedua-dua strain (Punt et al. 2008).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Berdasarkan pendekatan yang digunakan untuk mengeklon gen pengawalaturan xilanase yang utama iaitu *XlnR*, pendekatan pemilihan fungsi direka

menggunakan gen *amdS A. nidulans* yang dikawal atur oleh promoter di bawah kawalan gen pengawalaturan protease sebagai penanda untuk penyaringan (Punt et al. 2008; van Peij et al. 1998). Pendekatan ini telah berjaya untuk mengeklon gen yang mengekod protein pengawalaturan yang unik bagi spesies *Aspergillus*. Analisis jujukan bagi fragmen bersaiz 2.5 kb yang berkomplemen dengan mutasi pada strain AB1.13 menunjukkan rangka bacaan terbuka mengekod faktor transkripsi yang mempunyai ciri kluster dwinuklear-$Zn(II)_2Cys6$. Gen yang mengekod faktor transkripsi ini diberi nama *prtT* (Punt et al. 2008). Perbandingan jujukan protein menunjukkan bahawa *prtT* mempunyai homolog dalam beberapa spesies *Aspergillus* seperti *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. clavatus* dan *A. terreus*. *prtT* didapati mempunyai empat intron yang terpulihara dalam kawasan pengkodannya. Berbanding pengawal atur spesifik tapak jalan yang lain seperti AmyR dan XlnR, PrtT tidak mempunyai ortolog dalam mana-mana spesies selain *Aspergillus*. Namun lebih mengejutkan, *prtT* juga tidak ditemui dalam *A. nidulans*. Bagi semua spesies *Aspergillus* yang mempunyai homolog *prtT*, gen ini didapati berkelompok dengan kelompok gen-gen yang terlibat dalam degradasi kanji seperti α-amilase (*amyA*), α-glukosidase A (*agdA*) dan gen pengawal atur $Zn(II)_2Cys6$ bagi gen-gen amilolitik (*amyR*). *prtT* diekspreskan secara konstitutif dan pengawalaturannya berlaku pada tahap pos-transkripsi (Punt et al. 2008).

Bagi membuktikan bahawa fenotip mutan yang ditunjukkan oleh *A. niger* strain AB1.13 adalah disebabkan alel mutan *prtT,* penyahaktifan gen *prtT* telah dilakukan ke atas strain AB4.1 (jenis liar). Perbandingan antara strain mutan *prtT* dengan strain mutan AB1.13 menunjukkan fenotip protease yang sama (Punt et al. 2008). Hasil yang sama turut dicirikan oleh van Peij dan Parenicova (2006) pada mutan *prtT A. niger* dan *A. oryzae*. Oleh kerana profil protease yang dihasilkan oleh *A. oryzae* berbeza dengan *A. niger*, maka kesan penyahaktifan *prtT* dalam *A. oryzae* turut dikaji oleh Punt et al. (2008). Melalui asai zimogram kasein menggunakan teknik iso-elektrik bertumpu, protease serina alkali S8 (*AlpA*) dan metaloprotease neutral M36 (*NpI*) didapati diekspreskan pada tahap yang rendah dalam mutan *prtT A. oryzae*. Ini mengesahkan bahawa *prtT A. oryzae* juga terlibat dalam pengawalaturan gen-gen protease yang utama dalam *A. oryzae*.

Kajian mengenai peranan protease ekstra sel terhadap kevirulenan kulat patogen *A. fumigatus* telah membawa kepada kerja-kerja pengklonan dan penyahaktifan gen *prtT* (Sharon et al. 2009). Penyahaktifan *prtT* telah menyebabkan kehilangan aktiviti protease ekstra sel dalam *A. fumigatus*. Melalui kaedah RT-PCR, tahap pengekspresan enam protease ekstra sel iaitu protease alkali (ALP), metaloprotease (MEP), karboksipeptidase serina (Cpds), peptidase dipeptidil IV (Dpp4), karboksipeptidase serina (AFUA_2G17330) dan protease serina (AFUA_7G06220) didapati menurun dengan ketara. Ampaian kultur daripada mutan *prtT A. fumigatus* menunjukkan pengurangan kematian sel epitelium paru-paru dan aktiviti hemolisis. Walau bagaimanapun, mutan *prtT A. fumigatus* tidak menunjukkan perubahan kevirulenan pada tikus yang mempunyai jangkitan paru-paru. Hasil ini mencadangkan bahawa PrtT bukan merupakan faktor kevirulenan yang signifikan dalam *A. fumigatus* (Sharon et al. 2009). Bergmann et al. (2009) pula mengkaitkan kevirulenan *A. fumigatus* dengan gaya hidup saprofitik kulat tersebut yang telah berkembang. Fungsi utama saprofitisme bergantung kepada protease ekstra sel yang membolehkan asimilasi substrat yang berprotein. Penurunan tahap pengekspresan beberapa protease ekstra sel yang utama telah menyebabkan ketidakupayaan mutan *prtT A. fumigatus* menggunakan protein sebagai sumber nutriennya. Analisis pengekspresan mendapati beberapa protease ekstra sel *A. fumigatus* tidak dikawal atur oleh *prtT* (Bergmann et al. 2009).

Fungsi *prtT A. fumigatus* dikaji dengan lebih mendalam dengan melakukan analisis transkripsi dan proteomik ke atas mutan *prtT*. Analisis mikroatur mendedahkan bahawa selain daripada penurunan pengekspresan protease yang sememangnya telah dijangkakan, pengekspresan gen-gen yang terlibat dalam pengambilan ion besi dan sintesis ergosterol juga menurun secara dramatik dalam mutan *prtT*. Penyahaktifan *prtT* turut menyebabkan pengawalaturan naik kluster-kluster gen yang terlibat dalam biosintesis metabolit sekunder. Pengaktifan kluster metabolit sekunder mungkin merupakan tindak balas tidak langsung terhadap tekanan disebabkan ketidakupayaan mutan *prtT* untuk menggunakan protein-protein dalam medium. Manakala, analisis proteomik pula mengenal pasti penurunan pengekspresan tiga protease ekstra sel iaitu protease alkali (ALP1), peptidase tripeptidil (tppA) dan peptidase serina (AFUA_2G01250). Selain itu, tahap

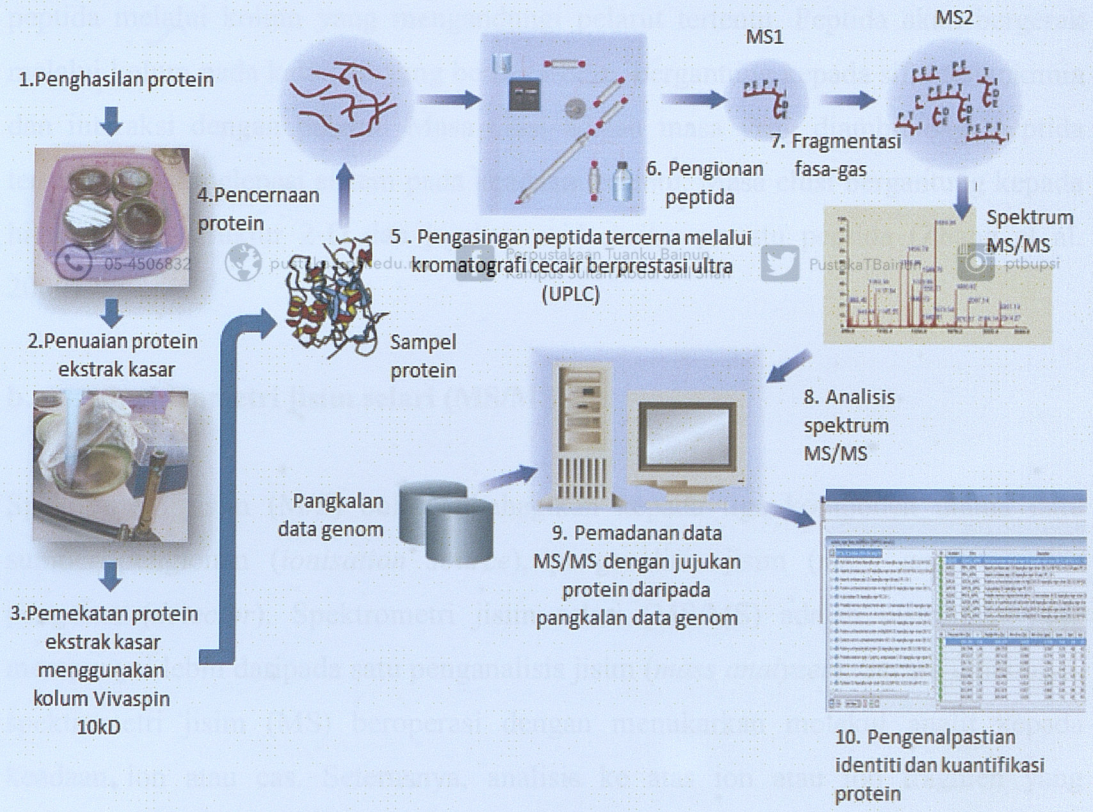
pengekspresan tiga enzim degradasi-polisakarida ekstra sel didapati meningkat. Ini mungkin disebabkan tindak balas terhadap ketidakupayaan mutan *prtT* untuk mendapatkan nutrien yang mencukupi daripada hidrolisis protein (Hagag et al. 2012).

Kewujudan jujukan genom *A. niger* membolehkan analisis *in siliko* dilakukan terhadap kawasan huluan (promoter) gen-gen sasaran *prtT* bagi menentukan tapak pengikatan *prtT* (Parenicova & van Peij 2007; Pel et al. 2007). Tapak pengikatan DNA boleh didefinisikan sebagai jujukan nukleotida konsensus, manakala fungsinya merujuk kepada keupayaan *prtT* untuk mengawal atur pengaktifan transkripsi melalui jujukan tersebut. Tapak pengikatan *prtT* telah dikenal pasti oleh Parenicova dan van Peij (2007). Analisis dilakukan terhadap kawasan promoter bersaiz 1 kb bagi gen-gen sasaran dengan menggunakan perisian '*Multiple Alignment and Analysis Workbench*' (MACAW). Analisis tersebut telah mengesan jujukan palindrom tidak sempurna sepanjang tujuh nukleotida 5'-C C G A/T C G G-3' dalam semua gen-gen mengekod protease yang diuji. Pencarian lanjutan pada kawasan huluan dan hiliran jujukan palindrom telah membawa kepada pembaikan jujukan palindrom tersebut kepada jujukan sepanjang 33 nukleotida 5' –G/C $(N)_5$ C C G A/T C G G $(N)_{19}$ G/C- 3'; di mana N=C atau G atau A atau T.

2.10 KAJIAN PROTEOMIK

Kepentingan *A. niger* sebagai hos pengekspresan bagi enzim-enzim industri telah ditunjukkan melalui usaha-usaha untuk menjujuk genomnya oleh beberapa pihak (Andersen et al. 2011; Pel et al. 2007). Maklumat jujukan lengkap genom ini membolehkan kajian pos-genomik seperti transkriptomik, proteomik dan metabolomik dilakukan. Antara teknik-teknik 'omik' ini, analisis proteomik adalah yang paling mendapat perhatian kerana ia membolehkan aktiviti-aktiviti molekul yang berlaku di dalam organisma difahami secara sistematik pada pelbagai peringkat fisiologi. Analisis proteomik juga dapat memberikan maklumat sehingga peringkat terakhir yang diinginkan seperti tahap pengekspresan sesuatu gen, meramalkan fungsi protein hipotetikal dan tapak jalan yang terlibat dengannya (Kim et al. 2007). Terma proteomik merangkumi banyak aspek analisis protein seperti pengenalpastian, kuantifikasi, pencirian, modifikasi pos-translasi dan lokalisasi sel (Kniemeyer 2011).

Pengenalpastian dan kuantifikasi protein dalam sampel biologi memainkan peranan yang penting dalam kajian biologi dan bioperubatan. Kaedah yang paling berkesan untuk pengenalpastian dan kuantifikasi protein adalah melalui kombinasi kaedah kromatografi cecair (LC) dengan spektrometri jisim (MS) (Zhang et al. 2009). Kajian proteomik berasaskan LC-MS yang tipikal melibatkan langkah-langkah seperti penyediaan sampel, pemisahan protein atau peptida melalui kolum *high performance liquid chromatography* (HPLC) tunggal atau berganda, ionisasi, pengesanan cas berganda peptida atau protein oleh spektrometri jisim dan diikuti analisis data (Tuli et al. 2012). Secara umumnya carta alir proses pengenalpastian dan kuantifikasi protein untuk kajian proteomik ditunjukkan pada Rajah 2.4.



Rajah 2.4 Carta alir proses pengenalpastian dan kuantifikasi protein untuk kajian proteomik

Bagi analisis proteomik, antara cabaran yang dihadapi adalah dalam penyediaan sampel, pengenalpastian protein yang menunjukkan tahap pengekspresan yang rendah (*low abundance*) dan nyahglikosilasi (*deglycosylation*) kerana rantai sisi

polisakarida pada protein akan membuatkan pengenalpastian protein tersebut menggunakan spektrometri menjadi sukar (Kim et al. 2007).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

2.10.1 Kromatografi Cecair (LC) dan Spektrometri Jisim Selari (MS/MS)

a. Kromatografi cecair (LC)

Selepas penghasilan dan penulenan, protein akan dicerna kepada peptida oleh enzim pada kedudukan tertentu yang boleh diramalkan. Pencernaan tersebut akan menjana kombinasi peptida dengan jisim yang berbeza-beza. Kromatografi cecair adalah suatu teknik makmal untuk memisahkan campuran peptida dengan melalukan sampel peptida melalui kolum yang mengandungi pelarut tertentu. Peptida akan bergerak melalui kolum pada kelajuan yang berbeza-beza, bergantung kepada sifat fisikokimia dan interaksi dengan pelarut. Masa elusi adalah masa yang diambil bagi peptida tertentu untuk melepasi sistem pada keadaan tertentu. Masa elusi bergantung kepada hidrofobisiti, struktur 2-D dan jujukan asid amino sesuatu peptida (Zhang et al. 2009).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

b. Spektrometri jisim selari (MS/MS)

Spektrometri jisim (M/S) boleh dibahagikan kepada tiga komponen utama iaitu sumber pengionan (*ionisation source*), penganalisis jisim (*mass analyzer*) dan pengesan (*detector*). Spektrometri jisim selari (MS/MS) adalah instrumen yang mempunyai lebih daripada satu penganalisis jisim (*mass analyzer*). Secara umumnya, spektrometri jisim (MS) beroperasi dengan menukarkan molekul analit kepada keadaan ion atau cas. Seterusnya, analisis ke atas ion atau ion fragmen yang dihasilkan semasa proses ionisasi adalah berdasarkan nisbah jisim (m) kepada cas (z), m/z (Pitt 2009).

Elctrospray ionisation (ESI) adalah salah satu kaedah pengionan yang banyak digunakan. Sampel cecair dipam melalui kapilari logam, dibiarkan pada 3 hingga 5 kV dan dinebulasi pada hujung kapilari untuk membentuk semburan halus titisan-titisan cas. Titisan-titisan tersebut akan tersejat dengan pantas melalui aplikasi haba

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

dan nitrogen kering. Cas elektrik residual pada titisan-titisan tersebut akan dipindahkan kepada analit. Analit yang telah diionkan akan dipindahkan kepada vakum tinggi spektrometri jisim melalui siri bukaan dan voltan bertumpu. Dalam keadaan normal, ESI dianggap sebagai kaedah pengionan yang lembut kerana secara relatifnya, hanya sedikit tenaga dipindahkan kepada analit dan menyebabkan hanya sedikit fragmentasi. Penganalisis jisim berfungsi untuk mengasingkan dan menyelesaikan ion-ion yang terbentuk daripada sumber pengionan berdasarkan nisbah jisim terhadap cas (m/z). Fungsi pengesan pula adalah untuk memantau isyarat yang dihasilkan oleh ion, menguatkan isyarat dan memindahkan isyarat tersebut kepada bentuk spektrum jisim. Nilai m/z bagi ion-ion diplotkan terhadap intensiti spektrum untuk menunjukkan bilangan komponen di dalam sampel selain jisim molekul dan kelimpahan relatif setiap komponen di dalam sampel (Pitt 2009).

c. Kromatografi cecair (LC) digandingkan dengan spektrometri jisim selari (MS/MS)

Apabila kromatografi cecair digabungkan dengan spektrometri jisim selari (LC-MS/MS), banyak kesukaran elektroforesis gel 2-D dalam analisis proteom dapat diatasi. Ini terutamanya dari segi perlaksanaan *ultra-high performance liquid chromatography* (ultra-HPLC) yang menggunakan skala aliran nano untuk meningkatkan tahap pengasingan peptida dan kecekapan turus di mana sensitiviti jisim, resolusi analisis, automasi dan kelajuan telah diperbaiki dan dipertingkatkan (Romijn et al. 2003).

Bagi LC-MS/MS, analisis peptida tercerna dilakukan dengan menggunakan turus LC berdiameter 50 hingga 100 μm yang memerlukan penghantaran pelarut pada kecerunan yang berbeza pada kadar aliran nanoliter per minit. Biasanya, campuran peptida dimuatkan ke dalam turus nano (dengan diameter dalaman 75 μm) yang mempunyai bahan fasa berbalik C_{18} dan dielut secara terus ke dalam spektrometri jisim selari dengan kecerunan pelarut. Peptida dielut pada kadar aliran yang perlahan, biasanya 100 hingga 200 nL per minit dan masa elusi bagi setiap peptida adalah 10 hingga 30 saat. Peptida dielut keluar dari turus ke dalam sumber pengionan bagi spektrometri jisim. Pertamanya, spektrum jisim dalam imbasan tinjauan (*survey scan mode*) bagi peptida utuh diperoleh. Dalam mod pengambilalihan bergantung-data

(*data-dependent acquisition mode*), instrumen boleh ditetapkan untuk melakukan fragmentasi peptida secara automatik dan mengumpul data MS/MS bagi mana-mana peptida yang diperhatikan dalam spektrum MS dengan berdasarkan intensiti, nilai m/z atau keadaan cas. Melalui pendekatan LC-MS/MS ini, pengasingan dapat dicapai pada kapasiti puncak kira-kira 10^{3-6} dalam kurang daripada 3 jam walaupun bagi pengasingan campuran peptida yang kompleks (Romijn et al. 2003).

2.10.2 Pendekatan Kajian Bagi Pengenalpastian Protein Berasaskan Spektrometri Jisim (*MS-based Protein Identification*)

Umumnya, terdapat dua pendekatan berbeza yang boleh digunakan untuk melakukan pengenalpastian protein yang berasaskan spektrometri jisim daripada campuran kompleks iaitu "*top-down*" dan "*bottom-up*". Strategi "*top-down*" bermula dengan protein utuh yang dipotong dalam fasa gas berbanding dalam fasa cecair. Protein difragmentasi di dalam spektrometri jisim untuk menjana ion yang menunjukkan jujukan. Perbezaan nilai m/z pada ion-ion fragmen menunjukkan kedudukan dan jujukan asid amino di dalam protein (Lin et al. 2003).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Manakala pendekatan "*bottom-up*" mengenal pasti protein melalui analisis spektrometri jisim selari bagi peptida yang diperoleh hasil daripada pencernaan campuran protein yang utuh. Peptida tercerna tersebut kemudiannya diasingkan melalui kaedah kromatografi sebelum diperkenalkan kepada spektrometri jisim selari. Spektrometri jisim selari boleh memilih ion peptida individu daripada campuran ion untuk dianalisis. Corak fragmentasi yang diterbitkan untuk setiap peptida menunjukkan jujukan asid amino bagi peptida tersebut. Corak fragmentasi ini boleh digunakan untuk mengenal pasti identiti protein daripada pangkalan data jujukan tanpa perlu menginterpretasi jujukan daripada spektrum. Corak fragmentasi yang diramalkan bagi setiap peptida dalam pangkalan data kemudian dibandingkan dengan spektrum yang diperoleh. Jujukan asid amino boleh dipilih untuk digunakan dalam analisis seterusnya daripada pangkalan data berdasarkan jisim peptida (Lin et al. 2003).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Pendekatan *shotgun proteomic* bermaksud analisis sampel protein yang kompleks dilakukan tanpa elektroforesis gel poliakrilamida terlebih dahulu. Ekstrak

protein larut yang tercerna terbukti boleh dianalisis secara terus dengan efisien (Porteus et al. 2011). Pendekatan tanpa-gel melibatkan adaptasi kromatografi cecair (LC) berprestasi-ultra atau berprestasi-tinggi yang beroperasi dalam mod gradien 2-dimensi (2D) bagi mendapatkan resolusi yang mencukupi. LC-2D biasanya terdiri daripada kombinasi kolum penukaran kation dengan kolum fasa terbalik terubahsuai (Yates et al. 2009). Peptida yang dielut selepas melalui fasa pemisahan LC akan diionkan dan dianalisis dengan ion perangkap spektrometri jisim (MS). Pelbagai konfigurasi MS wujud untuk pendekatan *shotgun proteomic*. Namun, proses ini memerlukan MS dengan kombinasi resolusi yang tinggi, julat yang dinamik dan penentuan jisim yang tepat (Hu et al. 2005; Yates et al. 2009).

2.10.3 Kuantifikasi Protein Tanpa-label Secara Relatif (*Label-free relative protein quantification*)

Bagi pendekatan kuantifikasi protein-berlabel, sampel protein yang berbeza dilabelkan secara berasingan sebelum dicampur untuk dianalisis bersama melalui LC-MS/MS. Berbeza dengan kaedah kuantifikasi protein tanpa-label, setiap sampel disediakan secara berasingan sebelum dianalisis melalui LC-MS/MS juga secara berasingan (Zhu et al. 2010). Pengukuran pembezaan pengekspresan protein menggunakan kaedah tanpa-lebel telah mendapat banyak perhatian kerana kos yang efektif dan memberikan hasil yang lebih dinamik. Selain sampel tidak perlu dilebel, protokol penyediaan sampel juga lebih mudah (Tuli et al. 2012). Pada umumnya, kuantifikasi protein dilakukan berdasarkan dua kategori pengukuran. Kategori yang pertama adalah pengukuran perubahan intensiti ion dengan melihat kedudukan puncak peptida atau tinggi puncak semasa kromatografi. Kategori yang kedua adalah berdasarkan pengiraan spektra protein yang dikenal pasti selepas analisis MS/MS. Intensiti puncak peptida atau pengiraan spektra diukur bagi setiap larian individu LC-MS/MS dan perubahan dalam kelimpahan protein dikira melalui perbandingan terus di antara analisis-analisis yang berbeza (Zhu et al. 2010).

Kaedah pengesanan sampel tanpa-label yang berbeza-beza telah digunakan seperti pengiraan spektrum (Old et al. 2005), liputan jujukan (Florens et al. 2002), pengiraan peptida (Gao et al. 2003) dan intensiti ion prekursor (Radulovic et al. 2004). Tiga kaedah yang pertama memberikan maklumat berkenaan kelimpahan

relatif ion berdasarkan fragmentasi MS/MS. Walau bagaimanapun, kaedah ini mudah menyingkirkan ion dengan bilangan yang sedikit dan tidak terpilih semasa imbasan spektrometri jisim tahap pertama (MS) ke fragmentasi MS/MS. Sebagai alternatif, perbandingan terus semua ion prekursor pada tahap MS dianalisis di mana ia boleh menangkap ion yang sedikit. Walau bagaimanapun, pendekatan ini memerlukan pengesanan puncak, tapisan, penjajaran dan normalisasi yang perlu dilakukan dengan berhati-hati (Tuli et al. 2012).

2.11 KAJIAN PROTEOMIK *A. niger*

Tsang et al. (2009) menggunakan pendekatan *in siliko* dan spektrometri jisim untuk mencirikan sekretom daripada *A. niger* strain ATCC 1015. Strain ini diramalkan mempunyai 11 200 gen putatif dan daripada jumlah tersebut, sebanyak 691 hingga 881 protein diramal sebagai protein ekstra sel. Dalam kajian tersebut, *A. niger* telah dikultur di dalam enam medium yang berbeza (glukosa, gliserol, sorbitol, xilan, pektin dan *locust bean gum*) dan protein ekstra sel yang terhasil dianalisis menggunakan spektrometri jisim. Sebanyak 222 protein telah dikenal pasti dengan 39 protein diekspreskan dalam keenam-enam medium dan 74 protein diekspreskan hanya dalam satu medium sahaja.

Kesan pH terhadap perembesan protein luar oleh *A. niger* dan mutannya turut dikaji menggunakan penanda isobarik untuk kuantifikasi secara relatif atau absolut (iTRAQ) berasaskan LC-MS/MS (Adav et al. 2010). *A. niger* dikultur dalam medium minimum tanpa substrat selulosa pada pH yang berbeza-beza iaitu daripada pH 2 hingga 7 dalam fermenter bersaiz 5 L yang terkawal. Teknik iTRAQ berjaya mengenal pasti dan menentukan kuantiti secara relatif sebanyak 102 protein unik dalam sekretom *A. niger*. Antara protein ekstra sel yang dikenal pasti termasuklah enzim-enzim hidrolisis seperti selulase, hemiselulase, glikosida hidrolase, protease dan peroksidase (Adav et al. 2010).

Nitsche et al. (2012) dalam kajiannya telah melihat respon *A. niger* terhadap karbon terhad semasa pengkulturan tenggelam (*submerged*). Pengkulturan secara kumpulan bioreaktor karbon-terhad tenggelam dilakukan dan dikekalkan pada tahap

karbon terhad selama enam hari selepas pengurangan karbon. Seterusnya, bagi mencirikan fisiologi dan morfologi *A. niger*, profil sekretom dan transkriptom bagi tiga fasa karbon terhad yang jelas telah dianalisis. Data pengekspresan beberapa kumpulan gen tertentu seperti protease, kitinase dan glukanase turut dilihat. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa karbon terhad dalam kultur tenggelam menyebabkan perubahan morfologi yang kompleks, pembezaan sel termasuklah kemunculan haifa kosong dan pertumbuhan sekunder filamen nipis yang tidak bercabang. Seiring dengan itu, autofagi dan gen-gen yang terlibat dalam tapak jalan pembentukan struktur konidia didapati jelas teraruh pada tahap transkripsi.

2.12 TRANSFORMASI KULAT

Bagi kulat berfilamen, transformasi genetik boleh dicapai melalui integrasi di antara DNA yang diperkenalkan dengan genom sesuatu organisma. Transformasi berperantarakan sferoplas, elektroporasi, biolistik dan transformasi berperantarakan *Agrobacterium* merupakan antara kaedah transformasi yang sering digunakan bagi kulat berfilamen (Prabha & Punekar 2004). Sistem transformasi yang efisien mesti memenuhi beberapa kriteria seperti (i) membenarkan integrasi homolog berlaku pada kadar yang tinggi (ii) mempunyai sistem penanda yang boleh dikitar semula untuk penyahaktifan tanpa had dan (iii) sistem pemilihan transforman-positif dwiarah (Steiger et al. 2011).

Perkembangan kaedah transformasi ini telah membuka peluang kepada kajian fungsi dan pengawalaturan sesuatu gen dilakukan khususnya melalui kaedah penyahaktifan atau penggantian gen (Prabha & Punekar 2004). Bagi tujuan mengkaji fungsi sesuatu gen, rekombinasi homolog melalui transformasi berperantarakan DNA adalah pra-syarat utama untuk berlakunya penggantian gen sasaran dalam sesuatu organisma. Malangnya, integrasi DNA dalam kulat berfilamen sebahagian besarnya berlaku melalui mekanisme penyambungan hujung tanpa homolog. Manakala mekanisme rekombinasi homolog pada tapak spesifik hanya berlaku pada frekuensi yang rendah (kurang daripada 1%) (Kuck & Hoff 2010). Secara umumnya, terdapat dua bentuk transforman yang berbeza iaitu transforman *knock-in* yang membawa jujukan DNA asing yang diselitkan pada gen sasaran, dan transforman *knock out*

apabila gen sasaran digantikan dengan gen penanda. Kesannya, gen sasaran pada transforman tidak lagi diekspreskan.

Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Sistem penanda dan penyaringan yang efektif adalah sangat penting dalam eksperimen transformasi genetik. Penanda-penanda yang biasa digunakan dalam transformasi boleh dibahagikan kepada tiga kelas. Kelas pertama adalah penanda yang paling kerap digunakan dalam kulat iaitu gen-gen kerintangan terhadap dadah sintetik seperti *hph* (kerintangan terhadap higromisin B), *ble* (kerintangan terhadap fleomisin) dan *neo* (kerintangan terhadap neomisin) (Weld et al. 2006). Kelas penanda yang kedua digunakan untuk menghasilkan perbezaan visual seperti gen *gus*, *lacZ* dan *GFP*. Produk-produk *lacZ* dan *gus* iaitu β-D-galaktosidase dan β-glukuronidase bertindak sebagai protein pelapor dengan menghidrolisis substrat masing-masing iaitu X-Gal dan X-Gluc bagi menghasilkan warna biru pada transforman (Ward 2012). Penanda dalam kelas yang ketiga terdiri daripada gen-gen berfungsi iaitu penanda auksotrofik seperti *pyrG* (gen orotidin-5'-monofosfat dekarboksilase) dan *argB* (gen ornitin karbamoiltransferase) serta penanda nutrisi seperti *HPD4* (gen p-hidroksifenilpiruvate dioksigenase) dan *ptrA* (gen kerintangan terhadap piritiamin) (Jin et al. 2004; Kubodera et al. 2002; Oh et al. 2013). Dalam kes-kes tertentu, lebih daripada satu penanda digunakan dalam sistem penyaringan bagi meningkatkan spesifisiti dan mengatasi masalah penanda tunggal serta hasil positif yang palsu (Jiang et al. 2013).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Gen-gen pemilihan positif/negatif seperti *pyrG* membolehkan satu siri transformasi yang berturutan dilakukan dengan menggunakan kaset 'blaster' (d' Enfert 1996). Kaset 'blaster' adalah berdasarkan penanda auksotrofik URA3, yang membenarkan transformasi berturutan dilakukan dalam yis dan kulat berfilamen (Noble & Johnson 2005). Di dalam kaset 'blaster', gen *ura3/pyrG* diapit oleh dua jujukan berulangan langsung yang pendek. Jujukan berulang yang kerap digunakan ialah *loxP* (Forment et al. 2006; Mizutani et al. 2012; Steiger et al. 2011). Apabila berada pada DNA tertransformasi, kaset 'blaster' membenarkan pemilihan untuk transforman dilakukan di atas medium tanpa urasil/uridina. Setelah transforman dipencilkan, gen *ura3/pyrG* boleh dikeluarkan melalui rekombinasi di antara dua jujukan berulangan langsung, lalu mengembalikan transforman tersebut kepada

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun PustakaTBainun ptbupsi

prototrof uridina. Transforman yang telah dikeluarkan gen *ura3/pyrG* daripada genomnya boleh disaring dengan kehadiran 5-FOA. Transforman ini seterusnya boleh ditransformasi dengan vektor lain yang membawa kaset 'blaster' (Weld et al. 2006).

Gen *pyrG* mengekod orotidin-5'-monofosfat (OMP) dekarboksilase, iaitu enzim dalam tapak jalan biosintesis pirimidin yang penting untuk sintesis uridina. Mutagen asid 5'-fluoroorotik (5-FOA) merencat proliferasi sel dalam kebanyakan organisma dengan memasuki tapak jalan sintesis pirimidina yang mana ianya akan ditukarkan kepada analog pirimidina iaitu fluorooritidin monofosfat. Melalui tindakan seterusnya oleh ribonukleotida reduktase, fluorooritidin monofosfat ditukarkan kepada fluorodeoksiuridin, sejenis perencat membunuh diri yang berkesan bagi enzim timidilat sintase iaitu enzim yang menukarkan deoksiuridin monofosfat kepada prekursor DNA yang penting iaitu timidilat (Boeke et al. 1984). Kerintangan terhadap 5-FOA boleh dicapai dengan menyekat tapak jalan pirimidina melalui penyahaktifan mutasi orotidin-5'-monofosfat (OMP) dekarboksilase yang memangkinkan dekarboksilasi oritidin monofosfat (OMP) untuk membentuk uridin monofosfat (UMP). Dalam kulat berfilamen, auksotrof pirimidin boleh diperoleh melalui penyahaktifan gen dekarboksilase OMP (juga dikenali sebagai gen *pyrG*) yang merupakan auksotrofik kepada kepada uridina dan/atau urasil serta rintang kepada 5-FOA (Long et al. 2008; Oh et al. 2013).

Sistem Cre-lox membolehkan pembinaan mutasi tanpa had dilakukan pada sesuatu organisma yang mempunyai latar belakang genetik yang sama. Cre rekombinase adalah protein bersaiz 38 kDa daripada famili integrase. Enzim ini memangkinkan rekombinasi bebas-kofaktor di antara dua tapak pengenalannya yang dipanggil *loxP*. Jujukan konsensus bagi tapak *loxP* terdiri daripada penjarak teras bersimetri bersaiz 8 bp yang mentakrifkan orientasi tapak *loxP* serta dua jujukan apitan palindromik bersaiz 13 bp (Abremski et al. 1983; Hoess & Abremski 1985). Jujukan DNA yang diapit oleh tapak *loxP* akan dikeluarkan apabila tapak-tapak *loxP* berorientasi secara konvergen, manakala jujukan DNA tersebut diterbalikkan apabila tapak-tapak *loxP* berorientasi secara divergen. Cre rekombinase boleh bertindak pada kedua-dua tapak *loxP* secara inter- dan intramolekul, namun, rekombinasi

intramolekul pada tapak-tapak *lox* lebih digemari secara kinetiknya (Langer et al. 2002).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

2.13 KUTINASE *Glomerella cingulata*

Kutinase adalah enzim ekstra sel yang mempunyai aktiviti lipolitik dan estereolitik yang dirembeskan oleh kulat fitopatogen. Kutinase diberi nama bersempena kebolehannya untuk mencernakan ikatan ester kutin. Enzim ekstra sel ini terlibat dalam penembusan kutikel oleh kulat fitopatogen tertentu semasa tahap awal infeksi. Enzim ini memangkinkan hidrolisis kutin, iaitu komponen struktur bagi lapisan luar (kutikel) bagi tumbuhan peringkat tinggi dan polimer terutamanya C16 dan C18 asid lemak hidroksil yang dihubungkan oleh ikatan ester (Purdy & Kolattukudy 1975).

G. cingulata, sejenis askomisit, merupakan kulat patogen tumbuhan yang menyebabkan penyakit pada hos yang berbeza termasuklah buah-buahan dan tanaman. *G. cingulata* menyebabkan jangkitan dengan melekatkan sporanya pada permukaan hos, membentuk apresorium dan kemudiannya menembusi kutikel (Bailey et al. 1993). Penembusan apresorium dan perembesan kutinase dipercayai memainkan peranan utama dalam proses penembusan oleh kulat. *G. cingulata* adalah tahap seksual (teleomof) dan tahap aseksual (anamof) dipanggil *Colletotrichum gloeosporioides* (Bailey et al. 1993).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kutinase *G. cingulata* adalah enzim bersaiz 21 kDa yang terdiri daripada 209 residu, dengan nilai pI teori 6.77 dan mempunyai identiti sebanyak 50% dengan kutinase *Fusarium solani pisi* (Farah Diba et al. 2001). Data jujukan nukleotida menunjukkan gen kutinase *G. cingulata* terdiri daripada dua ekson bersaiz 189 bp dan 486 bp yang dipisahkan oleh intron bersaiz 52 bp. Permodelan homologi protein telah menunjukkan kutinase ini mempunyai dua ikatan dwisulfida yang dibentuk oleh empat residu sistina (Farah Diba et al. 2001). Gen kutinase daripada *G. cingulata, cutA* (No. aksesi GenBank AF444194) diperoleh daripada perpustakaan DNA genom dan cDNA pula dipencilkan daripada mRNA miselium *G. cingulata* yang dituai daripada spora yang diaruh oleh kutin betik (Farah Diba et al. 2001). Enzim yang dikodkan oleh cDNA kutinase diekspeskan di dalam *E. coli* dan struktur tiga dimensi

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

serta fungsinya juga telah dicirikan (Farah Diba et al. 2001; Chin et al. 2013; Nyon et al. 2008, 2009).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kutinase adalah enzim versatil yang menunjukkan beberapa ciri yang perlu diberi perhatian untuk aplikasi produk dan proses industri. Kutinase boleh menggunakan substrat dalam julat yang luas. Secara *in vitro*, kutinase mempamerkan aktiviti hidrolitik terhadap pelbagai ester, daripada ester sintetik terlarut seperti *p*-nitrofenilester sehingga rantaian panjang trigliserida tak larut (Carvalho et al. 1998). Tindak balas hidrolitik dan sintesis oleh kutinase mempunyai kegunaan dalam industri kimia, pemprosesan makanan, minuman, pulpa/kertas, farmaseutikal, pertanian, industri, tekstil dan barangan kulit (Panda & Gowrishankar 2005).

Dalam industri makanan, kutinase digunakan sebagai pemangkin yang kuat (*potent catalysts*) untuk menghasilkan buah-buahan kering, beberapa produk tenusu, sebatian perasa dan beberapa asid lemak penting seperti asid dokosaheksanoik (DHA) dan asid eikosapentanoik (EPA) (Dutta et al. 2009). Dalam industri kimia, kutinase boleh digunakan untuk penghasilan biodiesel, sebatian fenolik dan surfaktan. Oleh kerana kutinase menunjukkan kestabilan yang baik pada julat suhu antara 20-50°C dan julat pH antara 8-11 serta stabil dengan kehadiran enzim lain walaupun H_2O_2, kutinase dikatakan lebih bernilai daripada lipase komersil bagi menghapuskan triasilgliserol dan menghidrolisis lemak tanpa penambahan kalsium (Dutta et al. 2009). Dalam industri alam sekitar, kutinase berguna dalam biodegradasi bahan buangan seperti polimer dan racun perosak (Bhardwaj et al. 2013; Dutta et al. 2009).

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

BAB III

BAHAN DAN KAEDAH

3.1 BAHAN KIMIA

Semua bahan kimia yang digunakan adalah daripada gred analisis dan biologi molekul. Agar bakteriologikal, tripton, pepton, ekstrak yis, susu skim, asid kasamino, ammonium sulfat $(NH_4)_2SO_4$ dibekalkan oleh Oxoid, England. Glukosa, natrium klorida (NaCl), natrium hidroksida (NaOH), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), dikalium hidrogen fosfat (K_2HPO_4), magnesium sulfat heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$), mangan sulfat ($MnSO_4$), zink sulfat ($ZnSO_4$), kobalt klorida ($CoCl_2$), kalsium klorida ($CaCl_2$), natrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), natrium nitrat ($NaNO_3$), potassium klorida (KCl), mangan klorida tetrahidrat ($MnCl.4H_2O$), ferum sulfat heptahidrat ($FeSO_4.7H_2O$), kumprum sulfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$), sukrosa, maltosa, kalsium klorida ($CaCl_2$), dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), natrium kalium tartrat ($NaKC_4H_4O_6$), metanol, asid asetik, etanol, klofororm, Tween 20, Tween 80, asid etilindiaminatetraasetik (EDTA), asid etilindiaminadiasetik, isopropanol dan gliserol diperoleh daripada HmBg Chemical, Jerman. Tris bes, glisina, natrium asetat (NaOAc), sodium dodesil sulfat (SDS) dan reagen Bradford dibekalkan oleh Amresco, USA. Akrilamida, piridoksin-HCl, asid p-aminobenzoik, asid nikotina, tiamina-HCl, asid 5'-fluoroorotik, piritiamin, urasil, enzim lisis daripada *Trichoderma harzianum*, sorbitol, N,N'-metilen-bis-akrilamida, β-merkaptoetanol, bovine serum albumin (BSA), kasein, gelatin dan pNP-laurat (pNPL) diperoleh daripada Sigma Aldrich, USA. Amonium persulfat dan N.N.N',N'-tetrametiletilenediamin (TEMED) diperoleh daripada Promega, USA. Etidium bromida (EtBr), dietilpirokarbonat (DEPC) dan reagen Folin Ciocalteu (FC)

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

dibekalkan oleh Fluka, Switzerland. Bromofenol biru, uridina dan ampisilin diperoleh daripada Calbiochem, USA. Agarosa diperoleh daripada Vivantis, Malaysia. Asid borik, ammonium molibdat tetrahidrat, kanji dan kolin-HCl dibekalkan oleh Bendosen, Norway. Riboflavin dan aluminon dibekalkan oleh R & M, Jerman. Isopropil-β-D-tiogalaktosida (IPTG) dan bromo-4-kloro-3-inodoil-β-D-galaktosida (X-gal) dibekalkan oleh 5-Prime, USA.

3.2 ENZIM PENYEKATAN, PENANDA DNA DAN PROTEIN, REAGEN DAN KIT KOMERSIL

Enzim penyekatan *Bam*HI dan *Eco*RV, penimbal ligase, T4 DNA ligase dan kit pengekstrakan plasmid Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System diperoleh daripada Promega, USA. Semua komponen untuk tindak balas berantai polimerase (PCR) adalah daripada kit *Taq* DNA Polymerase daripada Invitrogen, USA dan Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix daripada Finnzymes, Finland. Penanda DNA 1 kb dibekalkan oleh Vivantis, Malaysia, penanda jisim DNA dibekalkan oleh Fermentas, Jerman. Kit transkripsi berbalik RT-PCR iaitu SuperScript® III First-Strand Synthesis System dan reagen TRIzol® dibekalkan oleh Invitrogen, USA. Antibodi monoklon IgG arnab berkonjugat HRP diperoleh daripada Novagen, Jerman. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate dibekalkan oleh Pierce, USA. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit dibekalkan oleh Applied Biosystems Inc., USA. Membran Hybond N+ dan Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems diperoleh daripada GE Healthcare, USA manakala kertas turas dibekalkan oleh Whatman, USA. Kit Clean Up RNeasy dan RNase-free DNase untuk penulenan RNA jumlah diperoleh daripada Qiagene, USA. Penulenan DNA dan produk PCR menggunakan kit MEGA-spin™ Agarose Gel Extraction daripada Intron Biotechnology, Korea.

3.3 SUMBER KULAT, BAKTERIA DAN PLASMID

Kulat berfilamen *Aspergillus niger* strain PY11 (*cspA1-, pyrG6-, ΔglaA::HISG, ΔbglA::HISG)* yang digunakan dalam kajian ini diperoleh daripada Concordia University, Montreal, Kanada (Storms et al. 2005). Kulat ini dikultur di atas agar

medium lengkap (ML) (Lampiran A) selama 6 hingga 7 hari pada suhu 30°C. Penuaian spora dilakukan dengan memasukkan 10 mL larutan garam/tween (Lampiran A) dan 5 hingga 10 manik kaca bersaiz ~3 mm ke dalam kultur. Kemudian, campuran digoncang untuk menanggalkan spora daripada permukaan agar. Ampaian spora yang diperoleh dipindahkan ke dalam botol universal dan divorteks selama 30 saat pada kelajuan maksimum untuk memisahkan spora-spora tersebut.

Strain bakteria *Escherichia coli* DH5α yang digunakan sebagai sel perumah untuk pengklonan diperoleh daripada Invitrogen, USA. Vektor-vektor seperti ANIp2-cut (Lampiran D), pyrG-Anid (Lampiran E), ANEp-Cre-ptrA (Lampiran F) dan ANEp2 (Lampiran G) diperoleh daripada Profesor Reginald Storms, Concordia University, Montreal, Kanada.

3.4 PENCETUS

Pencetus yang digunakan direka bentuk dengan menggunakan perisian Primer Premier 4 (Primer Biosoft International, USA) dan disintesiskan oleh 1st Base Laboratories, Malaysia. Jadual 3.1 menunjukkan maklumat bagi pencetus yang digunakan dalam kajian ini.

3.5 STARTEGI KESELURUHAN KAJIAN

Secara umumnya kajian ini boleh dibahagikan kepada tiga bahagian utama (Rajah 3.1). Pada bahagian pertama, mutan *prtT* daripada *A. niger* PY11 dijana melalui strategi penggantian gen dan mutan yang terhasil dicirikan. Pada bahagian yang kedua, protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* dicirikan melalui kaedah kromatografi cecair berprestasi ultra-pengionan elektrosemburan nano aliran-spektrometri jisim selari (UPLC-nanoESI-MS/MS). Seterusnya, pada bahagian yang terakhir kutinase heterolog diekspreskan di dalam *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* dan jumlah serta kestabilan kutinase rekombinan daripada kedua-dua strain dicirikan.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Jadual 3.1 Pencetus oligonukleotida yang digunakan dalam kajian ini

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Nama	Amplifikasi	Jujukan (5'---3')
Pencetus 1	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi jujukan 5' gen *prtT* bersaiz 2.3 kb bagi pembinaan kaset gangguan gen.	5-CGGAGAAGTTGCCTCTATCG TTGGC-3
Pencetus 3	Pencetus berbalik untuk amplifikasi jujukan 5' gen *prtT* bersaiz 2.3 kb bagi pembinaan kaset gangguan gen.	5-ATGTATGCTATACGAAGTTT GGCGCGCCATCCTTAATTAACT CGCCAAGCTCTTGTGCTCCCAT -3
Pencetus 4	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi jujukan 3' gen *prtT* bersaiz 2.0 kb bagi pembinaan kaset gangguan gen.	5-GCATACATTATACGAAGTTA TACGCGTGCGGCCGCCACCGC GGTGATGGGATACTCAACGGA ATGC-3
Pencetus 6	Pencetus berbalik untuk amplifikasi jujukan 3' gen *prtT* bersaiz 2.0 bagi pembinaan kaset gangguan gen.	5-CTCCCAGGAACAGGCTACAC AGCCG-3
Pencetus 2	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi gen penanda *pyrG* bersaiz 3.5 kb daripada plasmid pyrG-Anid bagi pembinaan kaset gangguan gen.	5-AGATCAAATACGAAACGCCT TCTTCATGGGAGCACAAGAGC TTGGCGAGTTAATTAAGGATG GCG-3
Pencetus 5	Pencetus berbalik untuk amplifikasi gen penanda *pyrG* bersaiz 3.5 kb daripada plasmid pyrG-Anid bagi pembinaan kaset gangguan gen.	5-CGATACGCTGCTAGCCCAGT CACAGGCATTCCGTTGAGTAT CCCATAAGCTGGAGCTCCACC GCGG-3
Pencetus 7	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi kaset gangguan gen *prtT* yang lengkap bersaiz 7.8 kb.	5-TGTCGAGCGTCATGGCTAAT AACGTTA-3
Pencetus 8	Pencetus berbalik untuk amplifikasi kaset gangguan gen *prtT* yang lengkap bersaiz 7.8 kb.	5-GCCAAAAGATTACTGAAATC TATACCTGCA-3
Fwd_Out_ Ds	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen bersaiz 2.2 kb bagi menentukan integrasi yang betul kaset gangguan *prtT* pada lokus *prtT*.	5-CCCTTCTGAAGTGTGTATTG AGC-3
Rev_Out_ Ds	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen bersaiz 2.2 kb bagi menentukan integrasi kaset gangguan *prtT* pada lokus *prtT*.	5-GAACTACCCCATCTACCAAG ACACC-3
prtT-F	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen *prtT* bersaiz 1.8 kb dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-GAAACGCCTTCTTCATGGGA G-3
prtT-R	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen *prtT* bersaiz 1.8 kb dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-GAGTCGATAGCGCCCTTGG-3
gpd-F	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen *gpdA* bersaiz 1.3 kb dengan kaedah RT-PCR sebagai kawalan muatan.	5-CCATCCTCTCTTCATCACTTC CCTC-3
gpd-R	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen *gpdA* bersaiz 1.3 kb dengan kaedah RT-PCR sebagai kawalan muatan.	5-TCGGCAATCAGTCTCACTCA CAG-3

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

bersambung...

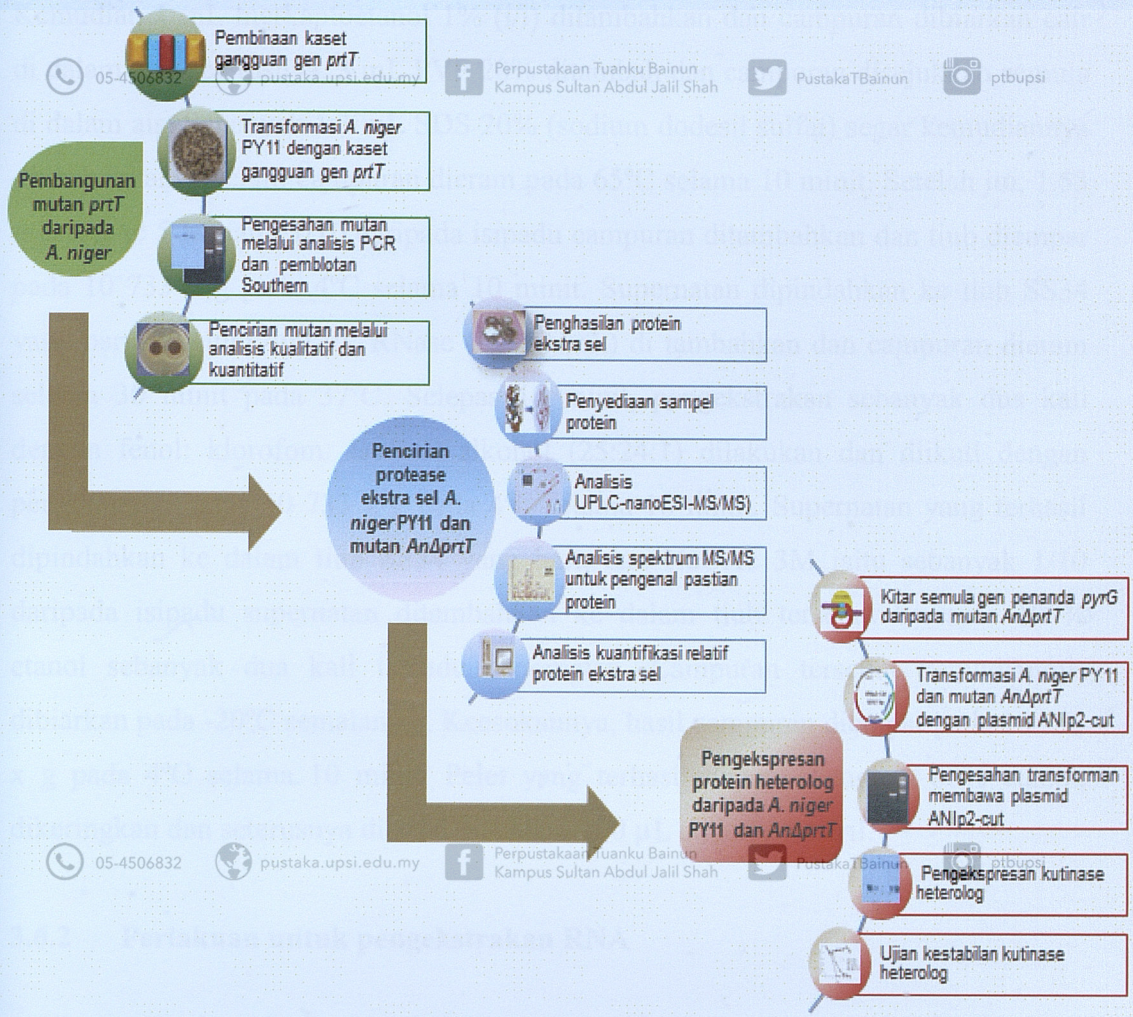
sambungan...

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

pepA-F	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen *pepA* bersaiz 642 bp dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-GGCTACACTTGGGACATCTC CTACG-3
pepA-R	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen *pepA* bersaiz 642 bp dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-AGTCGAGATGGGAGCGTAGT TG-3
pepB-F	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen *pepB* bersaiz 900 bp dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-TCTGGATCCATGAAGTTCTCT ACCATCCT-3
pepB-R	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen *pepB* bersaiz 900 bp dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-GATGAATTCGACGTAGGTGA CAGTGACGC-3
pepD-F	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen *pepD* bersaiz 1.1 kb dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-TTCAGTGCCACAGAACAGGT CC-3
pepD-R	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen *pepD* bersaiz 1.1 kb dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-CCACATTGGTGACAGCATTC C-3
pepF-F	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen *pepF* bersaiz 856 bp dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-ATGCTGTTTCGCAGTCTGTTG TC-3
pepF-R	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen *pepF* bersaiz 856 bp dengan kaedah RT-PCR bagi analisis pengekspresan.	5-CACATTGCTCATGGATGCTC TCTAG-3
F2'	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen *loxP-pyrG-loxP* bersaiz 3.5 kb bagi mengesan kehadiran penanda *pyrG* dalam mutan AnΔ*prtT*.	5-ATAACTTCGTATAGCATACA TTATACGAAGTTATTCCATCCA CCAATTGCCC-3
R5'	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen *loxP-pyrG-loxP* bersaiz 3.5 kb bagi mengesan kehadiran penanda *pyrG* dalam mutan AnΔ*prtT*.	5-ATAACTTCGTATAATGTATG CTATACGAAGTTATAATGTGCT GGTGTTAAGATG-3
pyrG-F	Pencetus kehadapan untuk amplifikasi fragmen bersaiz 1.4 kb bagi mengesahkan integrasi plasmid ANIp2-cut dalam genom PY11 dan AnΔ*prtT*.	5-GTGGAAATGTGTAACGGTAT TGACT-3
GlaTt-R	Pencetus berbalik untuk amplifikasi fragmen bersaiz 1.4 kb bagi mengesahkan integrasi plasmid ANIp2-cut dalam genom PY11 dan AnΔ*prtT*.	5-ATTGTCTACCGCCAGGTGTC AGTC-3

Nombor aksesi jujukan genom *A. niger* daripada JGI (http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html); *prtT* (57330), *pepA* (201655), *pepB* (52082), *pepD* (203039), *pepF* (56161).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 3.1 Carta alir strategi keseluruhan kajian
Bahagian pertama: Pembangunan mutan *prtT* daripada *A. niger* PY11; Bahagian kedua: Pencirian protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*; Bahagian ketiga: Pengekspresan dan pencirian protein kutinase rekombinan oleh *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*.

3.6 PEMENCILAN DNA DAN RNA

3.6.1 Pengekstrakan DNA genom menggunakan polivinil pirolidon (PVP)

DNA genom *A. niger* diekstrak mengikut kaedah Oh et al. (2009) yang dimodifikasi. Sebanyak 2 g miselium yang telah disejuk beku menggunakan nitrogen cecair ditumbuk sehingga halus. Miselium yang telah ditumbuk dipindahkan ke dalam tiub pengempar SS34 dan dicampurkan dengan 10 mL penimbal ekstraksi (Lampiran B).

Kemudian 1 mL merkaptoetanol 1% (i/i) ditambahkan dan campuran dibiarkan cair di dalam ais. Seterusnya, 3 mL PVP 20% ditambah dan campuran disejukkan semula di dalam ais. Sebanyak 1.3 mL SDS 20% (sodium dodesil sulfat) segar kemudiannya ditambahkan sebelum campuran dieram pada 65°C selama 10 minit. Setelah itu, 1.53 mL KOAc 5 M, iaitu 1/10 daripada isipadu campuran ditambahkan dan tiub diempar pada 10 733 x g pada 4°C selama 10 minit. Supernatan dipindahkan ke tiub SS34 yang baru sebelum 400 µL RNase (20 mg/mL) di tambahkan dan campuran dieram selama 30 minit pada 37°C. Selepas 10 minit, pengekstrakan sebanyak dua kali dengan fenol: klorofom: isoamil alkohol (25:24:1) dilakukan dan diikuti dengan pengemparan pada 10 733 x g pada 4°C selama 10 minit. Supernatan yang terhasil dipindahkan ke dalam tiub SS34 yang baru dan NaOAc 3M iaitu sebanyak 1/10 daripada isipadu supernatan ditambahkan ke dalam tiub tersebut bersama 100% etanol sebanyak dua kali isipadu supernatan. Campuran tersebut kemudiannya dibiarkan pada -20°C semalaman. Keesokannya, hasil campuran diempar pada 10 733 x g pada 4°C selama 10 minit. Pelet yang terhasil dicuci dengan 80% etanol, dikeringkan dan seterusnya dilarutkan dalam 100 µL air suling steril.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.6.2 Perlakuan untuk pengekstrakan RNA

Sebelum memulakan langkah-langkah pemencilan RNA, RNAse perlu disingkirkan. Bagi menyingkirkan RNAse, semua alat kaca untuk pemencilan RNA seperti mortar, penumbuk dan spatula perlu dipanaskan pada suhu 200˚C semalaman. Bahan pakai buang seperti tip mikropipet dan tiub pengempar pula perlu direndam dalam DEPC (dietil pirokarbonat) 0.01% semalaman sebelum diautoklaf pada suhu 121˚C selama 20 minit.

3.6.3 Pengekstrakan RNA jumlah

RNA jumlah bagi miselium *A. niger* diekstrak menggunakan reagen TRIzol®. Sebanyak 1 g tisu yang sejuk beku ditumbuk sehingga halus dan kemudian dipindahkan ke dalam 10 mL reagen TRIzol®. Tisu dilisis hingga homogen dalam reagen TRIzol® dengan cara mevorteks campuran selama 1 minit. Tisu yang telah homogen dieram pada suhu bilik selama 5 minit. Kemudian homogen tersebut

dialikuot ke dalam sepuluh tiub eppendorf 1.5 mL dan 0.2 mL klorofom ditambah bagi setiap 1 mL reagen TRIzol®. Tiub-tiub digoncang sebelum dieram pada suhu bilik selama 2-15 minit diikuti emparan pada 12 000 x g pada 4°C selama 15 minit. Campuran terpisah kepada fasa fenol-klorofom, interfasa dan fasa akues. RNA yang kekal di dalam fasa akues dipindahkan ke dalam tiub eppendorf 1.5 mL yang baru sebelum dimendakkan dengan 0.5 mL isopropanol selama 5-10 minit. Selepas itu, emparan pada 12 000 x g pada 4°C selama 8 minit dilakukan. Pelet yang terbentuk dicuci sebanyak dua kali dengan 1 mL etanol 75% sebelum diempar selama 5 minit. Pelet kemudiannya dikeringkan dan dilarut di dalam 20 µL air DEPC yang steril sebelum dieram pada 60°C selama 10 minit.

3.6.4 Penulenan RNA jumlah

Sebelum sintesis bebenang pertama cDNA dilakukan, RNA jumlah yang telah diekstrak perlu ditulenkan daripada sebarang kontaminitasi terutamanya DNA sebelum digunakan dalam tindak balas transkripsi berbalik RT-PCR. Penulenan RNA jumlah dilakukan dengan kit Clean Up RNeasy dan RNase-free DNase (Qiagen, USA). Air bebas-RNAse ditambah kepada sampel RNA untuk menjadikan isipadunya 100 µL. Setelah itu, 350 µL penimbal RLT yang dibekalkan oleh kit ditambah kepada 3.5 µL ß-merkaptoetanol 1%. Campuran tersebut ditambahkan pula kepada sampel RNA dan dicampur dengan sekata. Seterusnya, sebanyak 250 µL etanol 100% ditambah untuk mencairkan RNA. Campuran dicampur sekata sebelum dipindahkan ke dalam kolum dan diempar pada 14 549 x g selama 30 saat. Bahan yang melepasi kolum dibuang. Sebanyak 350 µL penimbal RW1 yang dibekalkan bersama kit ditambah ke dalam kolum dan diempar sekali lagi. Kemudian, sebanyak 10 µL stok DNAase (2.7 U/µL) ditambah kepada 70 µL penimbal RDD yang juga dibekalkan oleh kit. Setelah dicampur sekata, 80 µL campuran tersebut dipindahkan ke bahagian tengah kolum dan dieram pada suhu bilik selama 15 minit. Setelah itu, 350 µL penimbal RW1 ditambah ke dalam kolum sebelum diempar pada 14 549 x g selama 30 saat. Bahan yang melepasi kolum dibuang dan 500 µL penimbal RPE yang mengandungi etanol 100% ditambah ke dalam kolum dan diempar pada 14 549 x g selama 30 saat. Langkah di atas diulang sekali lagi sebelum kolum dipindahkan ke dalam tiub mikropengempar 1.5 mL dan 30 µL air bebas-RNAse ditambah ke

bahagian tengah kolum. Kolum diempar pada 14 549 x g selama 1 minit. RNA yang telah tulen seterusnya akan digunakan untuk tindak balas transkripsi berbalik.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.6.5 Pengekstrakan plasmid

Pemencilan plasmid dilakukan dengan kit Wizard® Plus SV Minitipreps DNA Purification System. Satu koloni tunggal *E. coli* diinolukat di dalam 10 mL medium LB yang mengandungi antibiotik ampisilin (Lampiran A) dan dieram semalaman dengan goncangan 250 rpm pada suhu 37°C. Kultur tersebut diempar pada 3077 x g selama 10 minit sebelum pelet yang terhasil diampai di dalam 250 µL larutan pengampai sel. Sebanyak 250 µL penimbal lisis sel ditambah dan campuran diterbalikkan sebanyak empat kali secara perlahan-lahan. Seterusnya, 10 µL larutan protease beralkali ditambah dan campuran diterbalikkan sebanyak empat kali sebelum dieram pada suhu bilik selama 5 minit. Fungsi protease beralkali ialah untuk menyahaktifkan endonuklease yang terbebas daripada sel-sel bakteria yang telah pecah dan mencuraikan protein secara tidak spesifik, seterusnya mengurangkan kontaminitasi protein di dalam sampel (http://www.promega.com). Kemudian, penimbal neutralisasi sebanyak 350 µL ditambah dan campuran diterbalikkan sebanyak empat kali sebelum diempar pada kelajuan 15 000 x g selama 10 minit pada suhu bilik. Supernatan kemudiannya dipindahkan ke dalam kolum pengempar yang telah dimasukkan ke dalam tiub pengumpul dan diempar pada kelajuan 15 000 x g selama 1 minit. Bahan yang melepasi kolum pengempar dibuang dan 750 µL penimbal pencuci yang mengandungi etanol 95% ditambah ke dalam kolum sebelum diempar pada kelajuan 15 000 x g selama 1 minit. Langkah ini diulangi sekali lagi dengan 250 µL penimbal pencuci. Seterusnya, kolum pengempar diempar sekali lagi bagi memastikan tiada penimbal berlebihan tertinggal. Kolum dipindahkan ke dalam tiub mikropengempar 1.5 mL yang baru dan DNA plasmid dielut dengan menambahkan 25 µL air bebas-nuklease ke bahagian tengah kolum Kolum diempar pada 15 000 x g selama 1 minit. Plasmid yang telah dipencilkan boleh terus digunakan atau disimpan pada -20°C.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.6.6 Penentuan kepekatan DNA atau RNA

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Terdapat dua kaedah penentuan kepekatan DNA atau RNA yang digunakan. Kaedah pertama adalah dengan mengambil bacaan spektrofotometer (Eppendorf, USA). Nisbah bacaan OD $A_{260/280}$ di antara 1.6 hingga 2.0 menunjukkan ketulenan DNA atau RNA yang baik dan sampel bebas daripada kontaminitasi protein. Manakala nisbah bagi bacaan OD $A_{260/230}$ melebihi 2.0 menunjukkan sampel bebas daripada kontaminitasi karbohidrat. Kaedah kedua adalah melalui perbandingan terus kecerahan jalur DNA yang diminati dengan jalur penanda jisim yang diketahui kepekatannya selepas kedua-dua sampel dan penanda difraksikan dalam gel yang sama.

3.6.7 Elektroforesis gel agarosa bagi sampel DNA dan RNA

DNA difraksikan menggunakan gel agarosa 0.8 hingga 1.0% (j/i) yang dilarutkan di dalam 1X TAE (Lampiran B) dan 1 µL etidium bromida 10 mg/mL. Sampel DNA, produk PCR atau hasil pencernaan DNA dicampurkan dengan penimbal muatan (Lampiran B) sebelum dimuatkan ke dalam telaga-telaga gel. Penanda DNA yang digunakan adalah berdasarkan analisis, keperluan dan saiz hasil yang dijangkakan. Antara yang biasa digunakan adalah λ *Hin*dIII, penanda DNA 1 kb dan 100 bp (Promega, USA) serta penanda jisim (Fermentas, Jerman). Elektroforesis dijalankan pada 50 hingga 100 V sehingga pemisahan yang baik diperoleh. Gel ini kemudiannya dicerap di bawah cahaya UV dan gambar direkod menggunakan sistem AlphaImager ^{TM} 2200 (Alpha Innotech, USA).

Sampel RNA pula difraksikan menggunakan gel agarosa 1.0 hingga 1.2% (j/i) yang dilarutkan di dalam 10X MOPS (Lampiran B) dan air suling DEPC terawat melalui pemanasan dengan ketuhar gelombang mikro. Apabila gel telah menyejuk ke suhu 50°C, formaldehid 37% (i/i) dan 1 µL etidium bromida 10 mg/mL ditambah sebelum dituang ke dalam acuan. Sampel RNA dicampurkan dengan penimbal muatan RNA 5X (Lampiran B) sebelum dimuatkan ke dalam telaga gel. Elektroforesis dijalankan pada 50-100 V menggunakan penimbal 1X MOPS (Lampiran B) sehingga pemisahan yang baik diperoleh. Gel ini kemudiannya dicerap

di bawah cahaya UV dan gambar direkod menggunakan sistem AlphaImager ^{TM} 2200 (Alpha Innotech, USA).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.6.8 Pengekstrakan dan penulenan DNA daripada gel agarosa

DNA yang telah difraksikan melalui gel agarosa boleh ditulenkan menggunakan kit komersil MEGA-spin^{TM} Agarose Gel Extraction (Intron Biotechnology, Korea). Jalur DNA yang dikehendaki dipotong menggunakan pisau steril dan dimasukkan ke dalam tiub mikropengempar 1.5 mL serta ditimbang. Penimbal lisis ditambahkan sebanyak tiga kali isipadu gel. Contohnya, 300 µL penimbal lisis ditambahkan sekiranya berat gel yang dipotong adalah 100 mg. Campuran dipanaskan pada suhu 50°C selama 10 minit dan diselang seli dengan vorteks setiap 2-3 minit bagi membantu gel cair keseluruhannya. Seterusnya, campuran dipindahkan ke dalam kolum bersama tiub pengumpul sebelum diempar pada 14 549 x g selama 1 minit. DNA akan mengikat pada membran gel silika kolum dengan kehadiran garam yang tinggi manakala bahan kontaminitan akan keluar melepasi kolum. Kemudian 700 µL penimbal pencuci ditambah ke dalam kolum dan diempar pada 14 549 x g selama 1 minit. Penimbal pencuci yang melepasi kolum di buang sebelum kolum diempar sekali lagi 14 549 x g selama 1 minit. Kemudian, kolum yang padanya masih terikat DNA, dipindahkan ke tiub mikropengempar 1.5 mL yang baru sebelum 20 µL air suling steril ditambah. Kolum bersama tiub mikropengempar diempar pada 14 549 x g selama 1 minit bagi mengeluarkan DNA daripada membran gel silika kolum. DNA yang terkumpul dalam tiub eppendorf akhirnya disimpan pada -20°C.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.6.9 Pencernaan DNA dengan enzim penyekatan

Pencernaan DNA dilakukan menggunakan enzim penyekatan yang bersesuaian. Bagi pencernaan skala kecil pada isipadu 20 µL, 1 µg DNA dicampurkan dengan 1U enzim, 1/10 isipadu penimbal 10X yang bersesuaian dengan enzim dan BSA 10 mg/mL. Air suling steril ditambahkan sehingga jumlah isipadu menjadi 20 µL. Campuran di dalam tiub dieram pada suhu 37°C selama 3 jam. Pencernaan skala besar dilakukan dengan meningkatkan isipadu bahan-bahan campuran pencernaan dan menambah masa eraman sehingga semalaman. Bagi pencernaan berganda,

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

penimbal dipilih berdasarkan penimbal yang dapat mencerna dengan baik sehingga 75% bagi kedua-dua enzim.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.7 PENYEDIAAN DAN TRANSFORMASI SEL KOMPETEN

3.7.1 Penyediaan sel kompeten

Satu koloni tunggal *E. coli* diinolukat di dalam 5 mL medium LB (Lampiran A) dan dieram semalaman dengan goncangan 250 rpm pada suhu 37°C. Sebanyak 50 mL medium A (Lampiran A) diinokulat dengan 0.5 mL kultur *E. coli* semalaman dan dieram pada 37°C dengan goncangan 250 rpm sehingga OD_{600} kultur mencapai 0.4 iaitu kira-kira selama 2 jam masa yang diambil. Setelah itu, ampaian bakteria diletakkan di dalam ais selama 10 minit sebelum diempar pada 4248 x g selama 10 minit pada 4°C. Supernatan dibuang manakala pelet diampaikan dalam 0.5 mL medium A sejuk-ais. Kemudian, 2.5 mL medium B (Lampiran A) di tambahkan ke dalam ampaian bakteria sebelum 100 µL ampaian tersebut dialikuot kepada tiub-tiub mikroempar 1.5 mL yang telah disejukkan di dalam ais dan disimpan di dalam -80°C.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.7.2 Transformasi sel kompeten

Bagi proses transformasi, tindak balas ligasi dicampurkan dengan 100 µL sel kompeten *E. coli* strain DH5α dan dieram selama 30 minit di dalam ais. Seterusnya, campuran dilakukan kejut haba pada suhu 42°C selama 1 minit dan tiub diletakkan semula ke dalam ais serta merta. Sebanyak 900 mL kaldu LB bersuhu 37°C ditambah ke dalam tiub sebelum sel dieram selama 1.5 jam dengan goncangan pada 350 rpm. Sebanyak ~100 µL campuran tersebut disebarkan ke atas piring agar LB berampisilin/ X-gal/ IPTG dan dieram selama 16-24 jam pada suhu 37°C.

3.8 TINDAK BALAS BERANTAI POLIMERASE (PCR)

Secara umumnya, protokol PCR asas digunakan sebagai langkah permulaan untuk amplifikasi PCR dan ianya bergantung kepada keadaan tindak balas, saiz produk dan jenis enzim polimerase yang digunakan. Kit *Taq* DNA Polimerase daripada

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Invitrogen, USA biasanya digunakan dalam prosedur penyaringan manakala Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) pula digunakan untuk mendapatkan amplifikasi tepat pada DNA spesifik serta aktiviti 'proofreading' yang tinggi. Kesemua DNA polimerase ini digunakan mengikut arahan pengeluar. Komponen-komponen PCR seperti yang disenaraikan pada Jadual 3.2 dicampurkan bersama di dalam tiub PCR 0.2 mL.

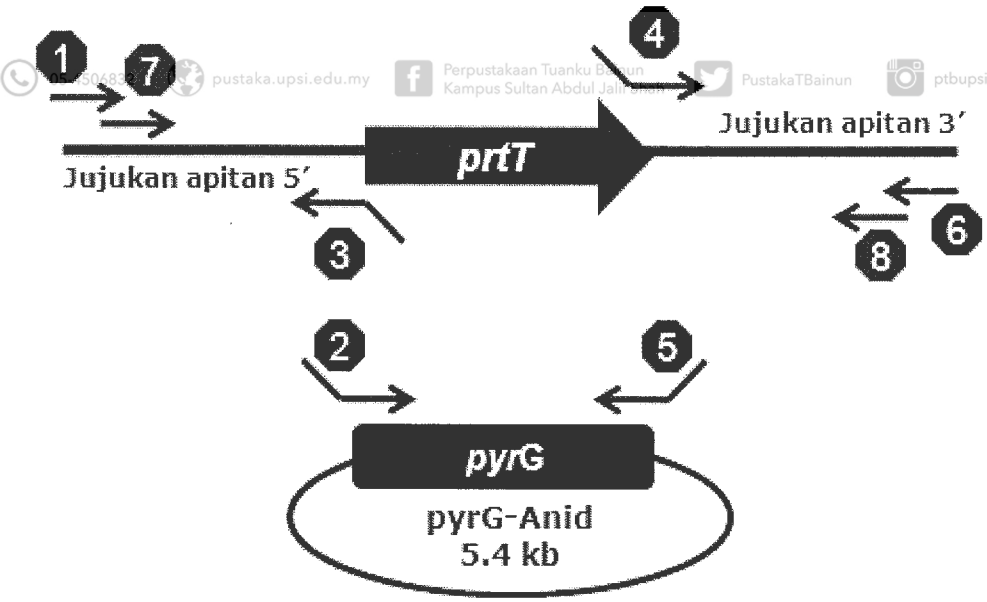
Program PCR asas yang digunakan adalah seperti berikut: penyahaslian awal pada 94°C selama 2 minit (1 kitaran); diikuti 94°C selama 1 minit (penyahaslian), 55°C selama 30 saat (penyepuhan pencetus) dan 72°C selama 1 minit/kb produk PCR (pemanjangan) (30 kitaran); pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 minit (1 kitaran). Produk yang diamplifikasi seterusnya dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% seperti di Bahagian 3.6.7 dan ditulenkan seperti di Bahagian 3.6.8.

Jadual 3.2 Komposisi campuran untuk PCR

Komponen	Kepekatan akhir	Isipadu (µL)
Templat (DNA genom 100 ng/µL atau DNA plasmid 10 ng/µL)		1
penimbal PCR (10X)	1X	2
$MgCl_2$ (50 mM)	1 .5 mM	0.6
dNTP (10 mM)	0.5 mM	1
Pencetus kehadapan (20 µM)	1 µM	1
Pencetus berbalik (20 µM)	1 µM	1
Taq DNA Polimerase (5 U/µL)	0.125 U	0.5
dH_2O		12.9
Jumlah (µL)		20

3.9 PEMBINAAN KASET GANGGUAN GEN *prtT*

Kaset gangguan gen *prt*T dijana menggunakan strategi berasaskan tindak balas berantai polimerase (PCR) di mana kaedah PCR cantuman digunakan (Rajah 3.2). Strategi ini melibatkan dua peringkat PCR. Peringkat pertama melibatkan amplifikasi jujukan apitan 5' dan 3' gen *prt*T serta gen penanda *pyrG* daripada plasmid pyrG-



Rajah 3.2 Strategi pembinaan kaset gangguan gen *prt*T
Kaset gangguan gen *prt*T dihasilkan melalui PCR cantuman yang melibatkan dua pusingan PCR. Pada pusingan pertama, pencetus 1 dan 3 digunakan untuk amplifikasi jujukan apitan 5' gen *prt*T; pencetus 4 dan 6 untuk amplifikasi jujukan apitan 3'; dan pencetus 2 dan 5 untuk amplifikasi gen penanda, *pyr*G daripada plasmid pyrG-Anid. Jujukan komplementari yang dijana pada hujung 3' jujukan apitan 5' dan hujung 5' jujukan *pyr*G serta hujung 5' jujukan 3' dan hujung 3' jujukan *pyr*G membolehkan produk-produk PCR ini bercantum semasa pusingan kedua PCR. Pencetus 7 dan 8 digunakan untuk amplifikasi kaset gangguan gen yang lengkap.

Anid (Lampiran E) manakala peringkat kedua melibatkan amplifikasi keseluruhan kaset dengan mencantumkan ketiga-tiga produk PCR yang diperoleh di peringkat pertama (Noble & Johnson 2005).

3.9.1 Pembinaan pencetus oligonukleotida

Pencetus-pencetus untuk amplifikasi jujukan apitan 5' dan 3' gen *prt*T direka berdasarkan jujukan DNA *A. niger* daripada JGI (http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.htmL). Hujung 5' bagi jujukan pencetus 2 dan 3 ditambah dengan jujukan penyambung sepanjang 45 mer yang berkomplementari antara satu sama lain untuk membolehkan jujukan apitan 5' gen *prt*T disambung

kepada jujukan penanda *pyrG*. Demikian pada hujung 5' jujukan pencetus 4 dan 5 yang juga ditambah dengan jujukan penyambung sebanyak 45 mer bagi menyambung jujukan gen penanda *pyrG* dengan jujukan apitan 3' gen *prt*T. Manakala pencetus-pencetus bagi amplifikasi gen penanda *pyrG* dibina berdasarkan jujukan gen *pyrG* daripada *A. nidulans*. Gen penanda *pyrG* diapit oleh 34 bp jujukan *lox*P yang berfungsi untuk kitar semula gen penanda tersebut. Kesemua jujukan pencetus disenaraikan dalam Jadual 3.1.

3.9.2 Amplifikasi jujukan apitan 5' dan 3' gen *prtT* serta jujukan penanda *pyr*G

Jujukan apitan 5' dan 3' gen *prtT* serta jujukan penanda *pyrG* diamplifiaksi menggunakan pasangan pencetus seperti yang disenaraikan pada Jadual 3.1. Amplifikasi jujukan apitan 5' dan 3' gen *prtT* menggunakan DNA genom *A. niger* PY11 sebagai templat manakala amplifikasi jujukan penanda *pyrG* daripada menggunakan plasmid pyrG-Anid (Lampiran E) sebagai templat. Amplifikasi fragmen-fragmen sasaran menggunakan Phusion® DNA Polimerase yang terkandung di dalam Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes, Finland). Campuran kompenen PCR disediakan dalam tiub PCR 0.2 mL dengan isipadu akhir 20 µL seperti yang disenaraikan pada Jadual 3.3. Tindak balas PCR dilakukan menggunakan Tpersonal Thermal Cycler (Biometra, German). Program PCR yang digunakan adalah seperti berikut: penyahaslian awal pada 94°C selama 2 minit (1 kitaran); diikuti 94°C selama 1 minit, 55°C selama 30 saat dan 72°C selama 15 saat/kb produk PCR (30 kitaran); pemanjangan akhir pada 72°C selama 1 minit (1 kitaran). Seterusnya, produk PCR difraksikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% sebelum ditulenkan daripada gel agarosa seperti yang diperincikan pada Bahagian 3.6.7 dan 3.6.8.

3.9.3 PCR cantuman

Peringkat kedua PCR pula melibatkan cantuman ketiga-tiga produk PCR yang diperoleh di peringkat pertama (Bahagian 3.9.2) bersama pencetus 7 dan 8. Amplifikasi kaset gangguan yang lengkap ini juga menggunakan Phusion® DNA Polimerase yang dibekalkan di dalam Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master

Mix (Finnzymes, Finland). Semasa PCR cantuman, jujukan apitan 5' dan 3' dicantum dengan jujukan gen penanda *pyrG* melalui pertindihan kawasan yang berkomplementari di antara satu sama lain. Bagi setiap produk PCR yang telah ditulenkan, sebanyak 1 µL digunakan sebagai templat di mana ketiga-tiganya dicampurkan di dalam satu tiub mikropengempar 0.2 mL bersama komponen PCR yang lain seperti di Jadual 3.3. Program PCR yang digunakan adalah seperti berikut: penyahaslian DNA pada suhu 94°C selama 2 minit sebanyak satu kitaran; penyahaslian DNA pada 94°C selama 1 minit, penyepuhan pada 61°C selama 30 saat dan pemanjangan pada 72°C selama 2 minit (15 saat / 1 kb) sebanyak 29 kitaran; pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 minit sebanyak satu kitaran. Kaset gangguan gen *prt*T yang telah lengkap, seterusnya difraksikan melalui elektroforesis sebelum ditulenkan daripada gel agarosa. Kepekatan kaset gangguan tersebut ditentukan melalui perbandingan terus kecerahan jalur DNA yang diminati dengan jalur penanda jisim seperti Bahagian 3.6.6.

Jadual 3.3 Komposisi campuran untuk amplifikasi jujukan 5' dan 3' gen *prtT*, gen penanda *pyrG* serta PCR cantuman

Komponen	**Kepekatan akhir**	**Isipadu (µL)**
Templat (DNA genom 100 ng/µL atau DNA plasmid 10 ng/µL)	-	1
Phusion® Master Mix (2X)	1X	10
Pencetus kehadapan (20 µM)	0.5 µM	0.5
Pencetus berbalik (20 µM)	0.5 µM	0.5
dH_2O		8
Jumlah (µL)		20

3.10 TRANSFORMASI *A. niger* PY11

3.10.1 Penyediaan sferoplas

Sferoplas dijana berdasarkan kaedah yang dihuraikan oleh Lahjouji et al. (2007) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 2 x 10^6 spora/mL *A. niger* PY11 diinokulasikan ke dalam 200 mL kaldu medium lengkap (Lampiran A). Kultur

dieram semalaman pada 30°C dengan goncangan pada kelajuan 250 rpm. Kemudian kultur ditapis menggunakan kain kasa bagi mengasingkan miselium daripada medium lengkap. Miselium yang diperoleh dibilas dengan 100 mL $MgSO_4$ 0.6 M (Lampiran B) sebelum ditimbang bagi tujuan penghasilan sferoplas. Sebanyak 10 mL larutan osmotik (LO) (Lampiran B) dan enzim lisis dinding 0.1 mg/mL *T. harzianum* (Sigma Aldrich, USA) ditambah bagi setiap 2 g miselium. Kemudian, sampel ini dieram pada suhu 30°C selama 3 jam pada kelajuan 100 rpm.

Setelah itu, ampaian sferoplas dipindahkan ke dalam tiub falcon. Larutan TB (sejuk) (Lampiran B) ditambahkan ke dalam tiub falcon tersebut dengan isipadu yang sama dengan ampaian sferoplas sebelum diempar pada kelajuan 3556 x g, 4°C, selama 20 minit bagi memisahkan sel sferoplas daripada LO. Setelah diempar, sel sferoplas akan berada di antara larutan LO dan larutan TB. Sferoplas yang terhasil ini dipindahkan ke tiub falcon yang baru dan sebanyak 45 mL larutan S/C (Lampiran B) (sejuk) ditambah ke dalam sampel sebelum sampel diempar pada kelajuan 3556 x g, 4°C, selama 5 minit. Langkah ini diulang sebanyak tiga kali bagi menyingkirkan semua larutan LO dan TB. Sel sferoplas yang membentuk pelet berwarna putih dilarutkan dengan larutan S/C pada kepekatan 1 x 10^8 /mL dan disimpan sejuk. Pengiraan sferoplas dilakukan menggunakan hemasitometer seperti di Lampiran H.

3.10.2 Transformasi *A. niger* PY11 dengan kaset gangguan gen *prtT*

Sferoplas *A. niger* PY11 ditransformasikan dengan 1.1 µg kaset gangguan gen *prtT* yang telah ditulenkan menggunakan kaedah yang diperincikan oleh Storms et al. (2005). Sferoplas yang diperoleh pada langkah 3.10.1 dicairkan kepada 1 x 10^7 / mL dengan larutan S/C yang telah disejukkan. Sebanyak 200 µL ampaian sferoplas, 20 µL aluminon 0.4 M, 10 µL DNA (1-5 µg dalam ddH_2O) dan 100 µL larutan PEG 20% dicampurkan dalam tiub falcon. Tiub falcon tersebut diputarkan secara perlahan-lahan untuk mencampurkan semua bahan yang dimasukkan tadi sebelum dieram pada suhu bilik selama 10 minit. Campuran untuk kawalan positif dan negatif juga turut disediakan. Seterusnya, 1.5 mL larutan PEG 60% dicampurkan dengan memutarkan tiub falcon tersebut secara perlahan-lahan. Campuran dieram pada suhu bilik selama 20 minit. Kemudian, 5 mL larutan sorbitol 1.2 M ditambah dan dicampurkan

menggunakan pipet sebelum diempar pada kelajuan 1731 x g selama 10 minit. Pelet yang terbentuk diampai dengan 1 mL sorbitol 1.2 M. Sebanyak 500 µL ampaian pelet dicampurkan dengan agar lembut yang mengandungi medium minimum dan potassium klorida (MM-KCl) (Lampiran A) sebelum dituang ke atas piring MM-KCl. Piring kemudiannya dieram pada suhu 30°C selama 4 hingga 6 hari.

3.10.3 Pemencilan transforman

Transforman yang hidup di atas agar MM-KCL yang diperoleh di Bahagian 3.10.2, disubkultur di atas agar medium minimum (MM) (Lampiran A) yang baru dan dieram pada 30°C selama 5 hingga 7 hari untuk mendapatkan spora.

3.10.4 Pemencilan spora tunggal

Spora bagi transforman yang dipencilkan di Bahagian 3.10.3 dituai mengikut langkah-langkah yang telah diperincikan di Bahagian 3.3 untuk mendapatkan ampaian spora. Kemudian, beberapa siri pencairan dilakukan ke atas ampaian spora tersebut sebelum dipiringkan di atas agar MM dan dieram pada 30°C semalaman. Selepas itu, dengan bantuan mikroskop, spora tunggal dikenal pasti dan agar yang mengandungi spora tunggal dipotong kepada bentuk kiub dan dikultur di atas agar MM yang baru.

3.10.5 Penyaringan transforman yang menghasilkan fenotip mutan

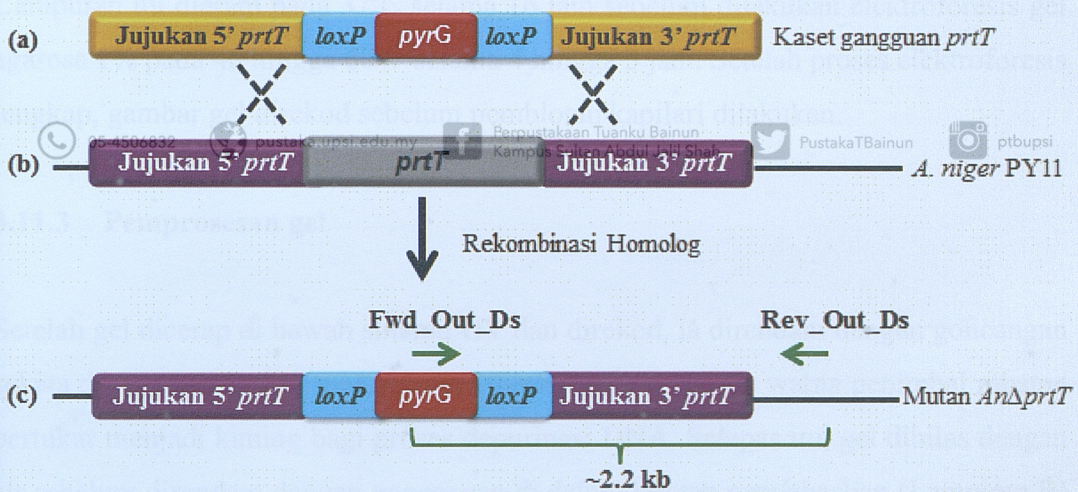
Penyaringan transforman yang menghasilkan fenotip mutan dijalankan dengan melakukan inokulasi titik sebanyak $1x10^5$ spora di atas agar MM yang mengandungi 1% (j/i) kasein dan 1% (j/i) gelatin (Lampiran A). Koloni kulat dibiarkan hidup selama 7 hari pada suhu 30°C dan selepas itu pembentukan zon 'halo' disekeliling koloni diperhatikan. Fenotip mutan dikenal pasti berdasarkan pengurangan diameter zon 'halo' di sekeliling kaloni transforman berbanding koloni *A. niger* PY11 (kawalan).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.10.6 Penyaringan transforman melalui PCR

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Transforman yang menunjukkan fenotip mutan (Bahagian 3.10.5) disaring lagi melalui analisis PCR bagi mengesahkan integrasi kaset gangguan berlaku pada lokus yang betul pada transforman. Pencetus kehadapan (Fwd_Out_Ds) dibina untuk berkomplementari dengan jujukan *pyrG* pada kaset manakala pencetus berbalik (Rev_Out_Ds) dibina untuk berkomplementari dengan kawasan di luar jujukan 3' gen *prt*T yang diamplifikasi (Rajah 3.3). Pengekstrakan DNA bagi transforman putatif dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.6.1 manakala amplifikasi fragmen ini dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.8. DNA genom *A. niger* PY11 digunakan sebagai kawalan negatif.



Rajah 3.3 Skema penyahaktifan gen *prtT* dan kedudukan pasangan pencetus yang direka untuk mengesahkan integrasi kaset gangguan gen *prtT* berlaku pada lokus yang betul pada transforman
(a) Kaset gangguan gen *prtT*. (b) Lokus *prtT* dalam genom *A. niger* PY11. Garisan putus-putus antara (a) dan (b) mewakili pindah silang yang berlaku antara dua kawasan homolog semasa penyahaktifan *prtT*. (c) Lokus pada alel *prtT* ternyahaktif setelah digantikan dengan gen penanda *pyrG* serta kedudukan pencetus kehadapan (Fwd_Out_Ds) dan pencetus berbalik (Rev_Out_Ds) pada genom mutan *AnΔprtT*.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.11 PEMBLOTAN SOUTHERN

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.11.1 Pengekstrakkan DNA genom

Kaedah pengekstrakan DNA genom *A. niger* daripada miselium adalah mengikut kaedah Oh et al. (2009) yang dimodifikasi. Kaedah ini diperincikan seperti pada Bahagian 3.6.1.

3.11.2 Pencernaan DNA genom

Sebanyak 30 µg DNA genom dicernakan dengan 3 µL enzim penyekatan *Bam*H1 dan *Eco*RV di dalam tiub yang berbeza bersama 2 µL penimbal 10X, 0.5 µL BSA 10 µg/µL dan ditambah dengan air suling steril sehingga isipadu mencapai 20 µL. Campuran ini dieram pada 37°C selama 16 jam sebelum dilakukan elektroforesis gel agarosa 1% pada 40 hingga 60 V selama 4 hingga 5 jam. Setelah proses elektroforesis lengkap, gambar gel direkod sebelum pemblotan kapilari dilakukan.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.11.3 Pemprosesan gel

Setelah gel dicerap di bawah sinaran UV dan direkod, ia direndam dengan goncangan sekata di dalam HCl 250 mM selama 10 minit atau sehingga warna penimbal muatan bertukar menjadi kuning bagi proses depurinasi DNA. Selepas itu, gel dibilas dengan air sebelum direndam dengan goncangan di dalam larutan penyahaslian (Lampiran B) selama 25 minit atau selepas warna penimbal muatan bertukar kepada biru. Gel dibilas semula sebelum dimasukkan ke dalam larutan peneutralan (Lampiran B) dengan goncangan selama 30 minit.

3.11.4 Pemblotan kapilari

Kaedah pemblotan kapilari untuk memindahkan DNA pada gel agarosa kepada membran nilon Hybond-N^+ adalah berdasarkan kaedah Southern (1975). Larutan SSC 20X (Lampiran B) dimasukkan ke dalam suatu bekas yang bersih. Pelantar penyokong yang dilapisi tiga keping kertas Whatman 3MM yang telah dibasahi

3.11 PEMBLOTAN SOUTHERN

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.11.1 Pengekstrakkan DNA genom

Kaedah pengekstrakan DNA genom *A. niger* daripada miselium adalah mengikut kaedah Oh et al. (2009) yang dimodifikasi. Kaedah ini diperincikan seperti pada Bahagian 3.6.1.

3.11.2 Pencernaan DNA genom

Sebanyak 30 µg DNA genom dicernakan dengan 3 µL enzim penyekatan *Bam*H1 dan *Eco*RV di dalam tiub yang berbeza bersama 2 µL penimbal 10X, 0.5 µL BSA 10 µg/µL dan ditambah dengan air suling steril sehingga isipadu mencapai 20 µL. Campuran ini dieram pada 37°C selama 16 jam sebelum dilakukan elektroforesis gel agarosa 1% pada 40 hingga 60 V selama 4 hingga 5 jam. Setelah proses elektroforesis lengkap, gambar gel direkod sebelum pemblotan kapilari dilakukan.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.11.3 Pemprosesan gel

Setelah gel dicerap di bawah sinaran UV dan direkod, ia direndam dengan goncangan sekata di dalam HCl 250 mM selama 10 minit atau sehingga warna penimbal muatan bertukar menjadi kuning bagi proses depurinasi DNA. Selepas itu, gel dibilas dengan air sebelum direndam dengan goncangan di dalam larutan penyahaslian (Lampiran B) selama 25 minit atau selepas warna penimbal muatan bertukar kepada biru. Gel dibilas semula sebelum dimasukkan ke dalam larutan peneutralan (Lampiran B) dengan goncangan selama 30 minit.

3.11.4 Pemblotan kapilari

Kaedah pemblotan kapilari untuk memindahkan DNA pada gel agarosa kepada membran nilon Hybond-N^+ adalah berdasarkan kaedah Southern (1975). Larutan SSC 20X (Lampiran B) dimasukkan ke dalam suatu bekas yang bersih. Pelantar penyokong yang dilapisi tiga keping kertas Whatman 3MM yang telah dibasahi

dengan larutan SSC 20X diletakkan di dalam bekas tersebut. Membran Hybond-N^+ dan tiga keping kertas Whatman 3MM dipotong mengikut saiz gel. Gel daripada Bahagian 3.11.3 diletakkan di atas pelantar tadi dengan berhati-hati untuk mengelakkan gelembong udara terperangkap. Gel kemudiannya dikelilingi dengan SaranWrap untuk mengelakkan larutan SSC 20X diserap terus oleh kertas tisu. Seterusnya, membran diletakkan di atas gel diikuti dengan tiga keping kertas Whatman 3MM yang telah dibasahkan dengan SSC 10X (Lampiran B). Kemudian, kertas tisu setinggi 5-7 cm tinggi diletakkan di atas kertas Whatman 3MM tersebut sebelum satu plat kaca dan pemberat (~750 g) diletakkan di atasnya selama 16-24 jam (seperti rajah dalam Lampiran I).

3.11.5 Pemprosesan membran

Selepas pemblotan, membran Hybond-N^+ direndam dalam larutan SSC 6X (Lampiran B) selama 1 minit dengan penggoncangan yang perlahan. Membran kemudiannya diletakkan di atas kertas Whatman 3MM untuk dikeringkan seketika sebelum dipegunkan dengan cahaya UV menggunakan transiluminator.

3.11.6 Penghibridan

Proses penghibridan, penyediaan prob dan pengesanan isyarat menggunakan kit Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems (GE Healthcare, USA). Penimbal penghibridan disedia dengan mencampurkan larutan penghibridan (disediakan oleh pengeluar kit) dengan NaCl 0.5 M dan agen penghalang 5% (j/i) (dibekalkan oleh kit). Campuran dikacau selama 1 jam pada suhu bilik sebelum dipanaskan pada suhu 42°C selama 30 minit. Membran nilon yang diperoleh daripada 3.11.5 diletakkan di dalam tiub penghibridan dan 10 mL penimbal penghibridan ditambah. Tiub penghibridan diletakkan di dalam ketuhar penghibridan Shel Lab (Oregon, USA) bersuhu 42°C untuk pra-penghibridan selama 1 jam. Selepas prob berlabel ditambahkan, penghibridan diteruskan semalaman pada suhu yang sama.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.11.7 Penyediaan prob berlabel

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Semasa pra-penghibridan dijalankan, prob DNA iaitu jujukan 5' gen *prt*T di label mengikut protokol kit. Kit ini mengandungi semua komponen yang diperlukan untuk perlabelan kecuali templat DNA. Sebanyak 10 µL fragmen DNA berkepekatan 10 ng/µL dinyahasli melalui pemanasan pada 100°C selama 5 minit. Campuran di sejukkan di dalam ais dengan segera selama 5 minit sebelum diempar bagi mengumpulkan campuran di bahagian bawah tiub. Seterusnya, 10 µL reagen perlabelan DNA (yang mengandungi enzim peroksidase horseradish) ditambah ke dalam campuran diikuti dengan penambahan 10 µL larutan glutaraldehid. Prob DNA akan dilabel dengan enzim peroksidase horseradish dan penambahan glutaraldehid akan menyebabkan pembentukan ikatan kovalen di antara prob dan enzim peroksidase horseradish. Campuran diempar sekali lagi untuk mengumpulkannya di bahagian bawah tiub dan dieram pada 37°C selama 30 minit. Prob berlabel kemudiannya ditambah ke dalam tiub penghibridan.

3.11.8 Pencucian membran

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Selepas penimbal penghibridan dikeluarkan daripada tiub penghibridan, membran dibilas dengan larutan SSC 5X (Lampiran B) selama 5 minit. Langkah pencucian dilakukan beberapa kali dengan penimbal SSC untuk mengeluarkan prob berlabel yang tidak mengikat pada membran. Sebelum pencucian dilakukan, penimbal pencuci primer (urea 6M, SDS 0.4% dan SSC 0.5X) dipanaskan pada suhu 42°C terlebih dahulu. Membran dicuci dengan 20 mL penimbal pencuci primer selama 20 minit pada suhu 42°C. Langkah ini diulangi sebanyak dua kali. Sekiranya perlu, kekuatan (stringency) cucian boleh ditingkatkan dengan mengurangkan kepekatan garam (SSC 0.5X kepada SSC 0.1X) dalam penimbal pencuci primer. Kemudian, membran dikeluarkan daripada tiub penghibridan dan diletakkan dalam bekas yang bersih. Pencucian membran diteruskan dengan penimbal pencuci sekunder (SSC 2X) (Lampiran B) pada suhu bilik selama 5 minit sebanyak dua kali.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.11.9 Penjanaan dan pengesanan isyarat

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Bagi proses penjanaan isyarat, reagen pengesanan 1 dan reagen pegesanan 2 (disediakan oleh kit) dicampurkan dengan nisbah isipadu 1:1. Membran yang telah dicuci pada langkah 3.10.8 diletakkan di dalam bekas yang bersih dengan bahagian yang mengandungi DNA disebelah atas. Bahagian yang mengandungi DNA pada membran dibasahkan dengan campuran reagen 1 dan 2 hingga rata dan dieram pada suhu bilik selama 1 minit. Kemudian, membran disimpan dalam beg plastik dan didedahkan kepada filem sinaran-X di dalam kaset (Amersham Biosciences, UK) selama 20 minit. Reagen pengesanan 1 mengandungi hidrogen peroksida iaitu substrat kepada enzim peroksidase. Tindak balas penurunan hidrogen peroksida oleh enzim peroksidase berpasangan dengan tindak balas pengoksidaan luminol yang terkandung dalam reagen pengesanan 2. Pengoksidaan luminitol yang menghasilkan cahaya yang boleh dikesan pada filem sinaran-X sebagai isyarat. Proses pengesanan isyarat pada filem sinaran-X dilakukan dalam bilik gelap. Filem sinaran-X dicuci dengan larutan 'developer' selama 30 saat, air 30 saat dan larutan 'fixer' 30 saat sebelum dibilas sekali lagi dengan air. Isyarat dikesan sekiranya jalur hitam terdapat pada membran selepas filem sinaran-X dicuci.

3.12 ANALISIS PENGEKSPRESAN GEN MELALUI PCR TRANSKRIPSI BERBALIK (RT-PCR)

3.12.1 Pembinaan pencetus oligonukleotida

Pengekspresan bagi beberapa gen protease ekstra sel dalam sampel RNA daripada *A. niger* PY11 dan mutan *An*Δ*prtT* diukur melalui RT-PCR. Pencetus-pencetus oligonukleotida telah dibina berdasarkan jujukan spesifik gen-gen tersebut yang diperoleh daripada JGI (http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.htmL); faktor transkripsi spesifik protease, *prt*T (57330), aspergillopepsin A, *pepA* (201655), aspergillopepsin B, *pepB* (52082), protease serina, *pepD* (203039) dan karboksipeptidase serina, *pepF* (56161). Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase, *gpd* digunakan sebagai kawalan templat cDNA. Jujukan pencetus yang dibina dinyatakan dalam Jadual 3.1.

3.12.2 Pengkulturan dan Pengekstrakan RNA jumlah

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

A. niger PY11 dan mutan *AnΔprtT* dikultur di dalam kaldu medium lengkap (ML) semalaman pada 30°C dengan goncangan pada 200 rpm. Kultur ditapis dengan kain kasa dan miselium yang terhasil dibilas sebanyak tiga kali dengan air suling steril. Setelah ditimbang, miselium dipindahkan ke dalam medium minimum (MM) yang mengandungi BSA 0.5% (j/i) dan gelatin 0.5% (j/i) (medium aruhan) atau dekstrosa (medium tanpa aruhan) dan dikultur lagi selama 8 jam sebelum dituai semula. Pengekstrakan RNA jumlah *A. niger* (miselium) dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol® berdasarkan langkah-langkah yang telah diperincikan pada Bahagian 3.6.3 manakala penulenan RNA menggunakan kit Clean Up RNeasy dan RNase-free DNase mengikut kaedah pada Bahagian 3.6.4.

3.12.3 Transkripsi berbalik RT-PCR

Amplifikasi cDNA dilakukan dengan menggunakan kit SuperScript™ III First Strand (Invitrogen, USA) yang melibatkan sintesis bebenang tunggal cDNA dan amplifikasi DNA dalam dua langkah. Sistem ini menggunakan enzim transkriptase berbalik daripada virus leukemia Murin Moloney (MMVL-RT) untuk mensintesiskan bebenang tunggal cDNA. Sintesis rantai tunggal cDNA dilakukan pada langkah pertama dengan menggunakan RNA jumlah sebagai templat dan oligo(dT) sebagai pencetus. Amplifikasi transkrip *prt*T, *gpd, pep*A, *pep*B, *pep*D *dan pep*F dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.8 dengan menggunakan pencetus-pencetus spesifik sebagaimana yang disenaraikan dalam Jadual 3.1. Kaedah yang digunakan untuk mensintesis cDNA adalah berdasarkan kaedah yang dibekalkan oleh pembekal (Invitrogen, USA).

3.13 PENCIRIAN MUTAN *AnΔprtT*

3.13.1 Asai aktiviti perembesan protein ekstra sel

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Bagi mengetahui kesan gangguan gen *prtT* terhadap aktiviti perembesan protein ekstra sel *A. niger*, aktiviti perembesan protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan

3.12.2 Pengkulturan dan Pengekstrakan RNA jumlah

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

A. niger PY11 dan mutan *AnΔprtT* dikultur di dalam kaldu medium lengkap (ML) semalaman pada 30°C dengan goncangan pada 200 rpm. Kultur ditapis dengan kain kasa dan miselium yang terhasil dibilas sebanyak tiga kali dengan air suling steril. Setelah ditimbang, miselium dipindahkan ke dalam medium minimum (MM) yang mengandungi BSA 0.5% (j/i) dan gelatin 0.5% (j/i) (medium aruhan) atau dekstrosa (medium tanpa aruhan) dan dikultur lagi selama 8 jam sebelum dituai semula. Pengekstrakan RNA jumlah *A. niger* (miselium) dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol® berdasarkan langkah-langkah yang telah diperincikan pada Bahagian 3.6.3 manakala penulenan RNA menggunakan kit Clean Up RNeasy dan RNase-free DNase mengikut kaedah pada Bahagian 3.6.4.

3.12.3 Transkripsi berbalik RT-PCR

Amplifikasi cDNA dilakukan dengan menggunakan kit SuperScript™ III First Strand (Invitrogen, USA) yang melibatkan sintesis bebenang tunggal cDNA dan amplifikasi DNA dalam dua langkah. Sistem ini menggunakan enzim transkriptase berbalik daripada virus leukemia Murin Moloney (MMVL-RT) untuk mensintesiskan bebenang tunggal cDNA. Sintesis rantai tunggal cDNA dilakukan pada langkah pertama dengan menggunakan RNA jumlah sebagai templat dan oligo(dT) sebagai pencetus. Amplifikasi transkrip *prt*T, *gpd, pep*A, *pep*B, *pep*D *dan pep*F dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.8 dengan menggunakan pencetus-pencetus spesifik sebagaimana yang disenaraikan dalam Jadual 3.1. Kaedah yang digunakan untuk mensintesis cDNA adalah berdasarkan kaedah yang dibekalkan oleh pembekal (Invitrogen, USA).

3.13 PENCIRIAN MUTAN *AnΔprtT*

3.13.1 Asai aktiviti perembesan protein ekstra sel

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Bagi mengetahui kesan gangguan gen *prtT* terhadap aktiviti perembesan protein ekstra sel *A. niger*, aktiviti perembesan protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan

AnΔprtT dibandingkan secara kualitatif dengan melakukan inokulasi titik sebanyak $1x10^5$ spora di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kanji 1% (j/i). Koloni kulat dibiarkan hidup selama 7 hari dan pertumbuhannya dipantau dengan mengukur jejari koloni tersebut pada setiap hari. Pada hari ke 7, diameter zon 'halo' di sekeliling koloni kulat diukur bagi menentukan aktiviti perembesan protein ekstra sel.

3.13.2 Asai aktiviti proteolitik ekstra sel

Bagi mengetahui kesan gangguan gen *prtT* terhadap aktiviti proteolitik ekstra sel *A. niger*, pengasaian aktiviti proteolitik ekstra sel strain PY11 dan mutan *AnΔprtT* ditentukan secara kualitatif di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kasein 1% (j/i) dan gelatin 1% (j/i) (Lampiran A) sebagaimana langkah 3.13.1.

3.13.3 Asai aktiviti proteolitik ekstra sel secara kuantitatif

Aktiviti proteolitik *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* juga ditentukan secara kuantitatif dengan mengkultur kedua-dua strain ($1x10^5$ spora/mL) secara berasingan di dalam medium minimum (MM) yang mengandungi bran gandum 3% (j/i). Kultur tersebut dieram pada 30°C dengan goncangan pada 200 rpm selama 6 hari. Pada setiap 24 jam, protein ekstrak kasar bagi setiap kultur yang dituai dilakukan asai aktiviti protease ekstra sel sebagaimana yang telah diperincikan oleh van den Hombergh et al. (1995) dengan sedikit modifikasi.

Sebanyak 250 µL protein ekstrak kasar dicampur dengan 67 µL BSA 3% (j/i) sebagai substrat dan penimbal sodium acetat 0.1 M (pH 4). Campuran dieram pada 30°C selama 30 minit. Tindak balas dihentikan dengan menambah 500 µL TCA 10% (j/i) sebelum dieram pada 0°C selama 30 minit untuk memendakkan protein tidak terhidrolisis. Protein yang termendak disingkirkan melalui emparan pada 10 000 x g selama 5 minit manakala peptida-peptida yang terhasil daripada hidrolisis BSA oleh enzim protease akan terkumpul di bahagian supernatan. Sebanyak 250 µL supernatan dipindahkan ke tiub mikropengempar yang baru untuk dilakukan pengesanan aktiviti protease. Seterusnya, 625 µL sodium karbonat 0.5 M dan 125 µL reagen Folin dan

Ciocalteu (F-C) ditambah ke dalam supernatan sebelum dieram pada 37°C selama 30 minit untuk pembentukan warna. Peptida-peptida yang mengandungi residu tirosina dan triptofan akan bertindak balas dengan reagen F-C dan menghasilkan perubahan warna pada campuran asai daripada tidak berwarna kepada warna biru. Perubahan warna ini boleh diukur secara kalorimetrik menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 655 nm. Lengkok piawai dijana dengan menggunakan 0 hingga 0.055 µmol tirosina (Lampiran J).

Semua asai yang dilakukan disertakan dengan kawalan negatif yang terdiri daripada campuran penimbal dengan substrat dan campuran penimbal dengan enzim bagi mengurangkan ralat penentuan aktiviti protease. Satu unit enzim ditakrifkan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk hidrolisis BSA bagi menghasilkan warna yang bersamaan dengan 1.0 µmol tirosina per minit di bawah keadaan yang spesifik. Aktiviti protease ekstra sel diekspreskan dalam unit per mL.

3.13.4 Analisis lengkuk pertumbuhan

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Sebanyak $1x10^5$ spora/mL *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* dikultur secara berasingan di dalam medium minimum (MM). Kultur tersebut dieram pada 30°C dengan goncangan pada 200 rpm selama 6 hari. Pada setiap 24 jam, kultur ditapis dengan kain kasa dan biojisim yang terhasil dibilas sebanyak tiga kali dengan air suling sebelum dikeringkan selama 3 hari di dalam ketuhar pada suhu 65°C. Lengkuk pertumbuhan kedua-dua strain dijana berdasarkan berat biojisim kultur yang dituai setiap hari.

3.14 PENCIRIAN PROTEASE EKSTRA SEL *A. niger* PY11 DAN MUTAN *AnΔprtT* MELALUI KAEDAH KROMATOGRAFI CECAIR BERPRESTASI ULTRA-PENGIONAN ELEKTROSEMBURAN NANO ALIRAN-SPEKTROMETRI JISIM SELARI (*Ultra Performance Liquid Chromatography-nano Electrospray Ionasation-Tandem MS/MS*- (UPLC-nanoESI-MS/MS))

3.14.1 Penghasilan protein ekstra sel

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Sebanyak 2 x 10^6 spora/mL *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* dikultur di dalam 25

mL medium minimum yang mengandungi maltosa 15% (j/i) (MMJ) (Lampiran A). Pengkulturan dilakukan di dalam piring petri berdiameter 90 mm dan dieram secara statik pada 30°C selama 10 hari. Kultur dituai setiap hari sehingga hari ke-10. Bagi memastikan tiada perbezaan dari segi pertumbuhan semasa protein ekstrak kasar dituai, profil pertumbuhan *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* ditentukan berdasarkan berat biojisim kultur sebagaimana yang diterangkan pada Bahagian 3.13.4. Dalam kajian ini, protein ekstrak kasar daripada hari ke-5 hingga ke-9 disimpan pada -20°C untuk langkah seterusnya.

3.14.2 Penyediaan sampel protein

Protein ekstrak kasar daripada hari ke-5 hingga 9 yang dituai pada langkah 3.14.1 dilakukan penurasan ultra dengan menggunakan kolum pengempar Vivaspin 10 kDa MWCO Vivascience (Sartorius, USA). Penurasan dijalankan bagi memekat sampel protein, menukar sistem penimbal sampel dan menyingkirkan protein kontaminan yang bersaiz kurang daripada 10 kDa. Sampel dimasukkan ke dalam kolum pengempar dan diempar pada kelajuan 3077 x g pada 4°C selama 30 minit. Langkah ini diulang sehingga semua sampel protein diempar. Kemudian, kepekatan sampel protein diukur menggunakan kaedah yang telah dihuraikan pada Bahagian 3.14.3.

3.14.3 Penentuan kepekatan protein

Kepekatan protein ditentukan dengan menggunakan kaedah Bradford (1976) yang menggunakan BSA sebagai protein piawai. Sebanyak 500 µL reagen Bradford (BioRad, USA) ditambah dengan 49 µL natrium klorida 0.15 M dan 1 µL sampel protein dicampurkan dan dimasukkan ke dalam kuvet dan dibiarkan selama 2 minit pada suhu bilik. Kepekatan protein ditentukan dengan bacaan penyerapan pada jarak gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer. Pengosong terdiri daripada 500 µL reagen Bradford dan 50 µL natrium klorida 0.15 M.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.14.4 Pencernaan protein

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Pencernaan protein untuk analisis UPLC-nanoESI-MS/MS dilakukan mengikut kaedah Braaksma et al. (2010) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 100 µg sampel protein yang diperoleh pada Bahagian 3.14.2 dinyahasli melalui pemanasan pada suhu 80°C selama 15 minit. Seterusnya, sebanyak 20 µL ditiotreitol (DTT) 50 mM (dilarutkan dalam ammonium bikarbonat 50 mM) ditambah dan campuran dieram pada 60°C selama 15 minit. DTT merupakan agen penurunan yang berfungsi untuk menurunkan ikatan disulfida pada protein. Proses penurunan ini menghasilkan residu sistina yang mempunyai kumpulan sulfhidril (-SH) bebas. Bagi menghalang pembentukan semula ikatan disulfida dan renaturasi protein, residu sistina dialkilasi (alkylated) dengan menambah 55 µL iodoasetamida (IAA) 100 mM (dilarutkan dalam ammonium bikarbonat 50 mM) sebelum dieram pada suhu bilik dalam keadaan gelap selama 30 minit. Kemudian, sampel protein dicerna dengan tripsin emas, gred spektrometri jisim (Promega, USA) pada nisbah kepekatan 1:50 (Tripsin:Protein) (j/j) untuk menghasilkan peptida dan dieram semalaman pada suhu 37°C. Akhir sekali, 2 µL asid trifloroasetik (TFA) ditambah untuk menghentikan aktiviti enzim tripsin dan campuran dieram pada 37°C selama 30 minit. Campuran diempar pada 14 549 x g selama 2 minit dan supernatan yang mengandungi peptida tercerna dipindahkan ke tiub mikropengempar 1.5 mL yang baru sebelum disimpan pada -80°C.

3.14.5 Kromatografi cecair berprestasi ultra-pengionan elektrosemburan nano aliran-spektrometri jisim selari (UPLC-nanoESI-MS/MS)

Peptida tercerna dianalisis menggunakan kromatografi cecair berprestasi ultra-pengionan elektrosemburan nano aliran-spektrometri jisim selari (UPLC-nanoESI-MS/MS) yang terdapat di Institut Genom Malaysia, Malaysia. Analisis dilakukan sebagaimana protokol yang telah diperincikan oleh Waters Corporation (Milford, MA, USA). Analisis tersebut menggunakan sistem pengasingan Nano-ACQUITY™ UPLC® yang digabungkan dengan spektrometri jisim selari SYNAPT™ G2 HDMS ™ dengan dikawal oleh perisian MassLynx™ 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Fasa akues bergerak (Fasa A bergerak) adalah campuran air dengan asid formik 0.1%, manakala fasa organik bergerak (Fasa B bergerak) mengandungi

campuran asetonitril dengan asid formik 0.1%. Pengasingan peptida dijalankan dengan kecerunan asetonitril dalam asid formik 0.1% (1-50% dalam 120 minit). Sebanyak 500 ng peptida tercerna (separa gelung, suntikan 1 µL) dimuatkan ke dalam turus perangkap nanoACQUITY^{TM} UPLC® Symmetry® C_{18}, bersaiz 180 x 20 mm pada 15 µL/minit dan pengasingan selanjutnya oleh LC-nanoESI dengan turus fasa berbalik nanoACQUITY^{TM} UPLC® BEH 130 C_{18}, bersaiz 75 x 200 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA) dengan fasa bergerak B pada 0.25 µL/minit. Peptida dielut daripada turus dengan kecerunan fasa gerakan B, 1-50% selama 90 minit pada 0.25 µL/minit dan diikuti dengan pembilasan selama 10 minit oleh fasa bergerak B, 85%. Turus diseimbangkan dengan serta merta pada keadaan awal (fasa bergerak B) selama 20 minit.

a. Analisis spektrum spektrometri jisim selari (MS/MS) dan pengenal pastian protein

Data diperoleh dalam mod spektrum jisim (MS) yang berdefinisi tinggi dan diproses dengan perisian Identity^{E} daripada ProteinLynx Global Server (PLGS versi 2.4) daripada Waters Corporation (Milford, MA USA) untuk membina semula spektrum jisim selari (MS/MS) dengan menggabungkan semua jisim dengan masa penahanan yang sepadan. Kemudian, data MS/MS dipadankan dengan jujukan genom *A. niger* daripada JGI (http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html) menggunakan algoritma PLGS untuk mengenal pasti identiti protein yang hadir dalam sampel protein yang dianalisis. Setiap pencarian menggunakan parameter seperti berikut: toleransi ion prekursor pada 0.2 Da; toleransi ion fragmen pada 0.3 Da; minimum padanan ion fragmen per peptida adalah 3; minimum padanan ion fragmen per protein adalah 7; minimum padanan peptida per protein adalah 2; bilangan pemotongan triptik yang terlepas dibenarkan adalah 1; kadar positif palsu yang maksimum adalah 4%. Padanan semua peptida yang diperoleh di bawah kadar positif palsu maksimum yang ditetapkan (4%) akan dikira sebagai benar. Modifikasi tetap ditetapkan bagi karbamidometilasi residu sistina (C). Manakala pengoksidaan metionina (M), deaminasi glutamina (Q) dan asparagina (N) serta fosforilasi STY (serina, treonina, tirosina) pula ditetapkan sebagai modifikasi berubah.

Sebanyak tiga sampel biologi yang berbeza dianalisis bagi setiap strain. Setiap sampel biologi tersebut dianalisis sebanyak tiga kali (triplikat). Fosforilase B tercerna (125 fmol) digunakan sebagai kawalan rujukan (internal standard). Pengenalpastian dianggap positif apabila sekurang-kurangnya dua peptida berbeza dipadankan dengan sesuatu model protein (Tsang et al. 2009). Perisian SignalP (v 4.1) (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), Phobius (www.phobius.sbc.su.se/) dan TMMHMM (v .2.0) (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) digunakan untuk meramalkan kehadiran isyarat peptida pada protein. Anotasi protein dilakukan menggunakan perisian Blast2GO® (https://www.blast2go.com/).

b. Analisis kuantifikasi relatif protein ekstra sel

Perubahan pada kelimpahan (*abundance*) protein dianalisis menggunakan perisian Expression^{E} yang merupakan sebahagian daripada pakej PLGS. Analisis ini menggunakan masa penahanan jisim yang tepat (*exact mass retention time-EMRT*) untuk mengkelompokkan ion-ion peptida yang diperoleh dalam setiap keadaan bagi sesuatu sampel. Kemudian, intensiti ion peptida dibandingkan di antara sampel untuk menentukan kelimpahan relatif (*relative abundance*) sesuatu protein. Pencarian dihadkan kepada fragmen proteolisis tripsin disamping prekursor peptida dan toleransi jisim ion produk ditetapkan masing-masing pada 20 hingga 40 ppm.

3.15 KITAR SEMULA GEN PENANDA *pyrG* DALAM MUTAN *AnΔprtT*

Dalam Bahagian 3.10.2, mutan *AnΔprtT* telah dijana melalui transformasi *A. niger* PY11 dengan kaset gangguan gen *prtT*. Kaset gangguan gen *prtT* yang dibina di Bahagian 3.9, terdiri daripada gen penanda *pyrG* yang diapit dengan jujukan *loxP* yang berfungsi untuk kitar semula gen penanda *pyrG* tersebut. Kitar semula gen penanda *pyrG* membolehkan gen *pyrG* tersebut diguna semula sebagai penanda dalam transformasi *AnΔprtT* dengan kaset gangguan atau plasmid yang lain pada strain yang sama. Gen penanda *pyrG* boleh dikeluarkan daripada genom mutan *AnΔprtT* melalui rekombinasi di antara dua jujukan berulangan langsung, *loxP*. Bagi memangkinkan proses rekombinasi di antara jujukan *loxP* pada kaset gangguan, vektor yang membawa gen *Cre* rekombinase mesti dimasukkan ke dalam sel *AnΔprtT*

terlebih dahulu (Rajah 3.4). Oleh itu, *AnΔprtT* ditransformasikan dengan plasmid ANEp-Cre-ptrA (Lampiran F) yang diperoleh daripada Concordia University, Montreal, Kanada (Storms et al. 2005). ANEp-Cre-ptrA merupakan plasmid episomal yang membawa gen Cre rekombinase yang diletakkan di bawah kawalan promoter gen xilanase A, *xlnA* daripada *A. nidulans*. Pengekspresan *Cre* rekombinase diaruh oleh xilosa dan direncat oleh glukosa. ANEp-Cre-ptrA juga membawa gen kerintangan terhadap antibiotik piritiamin.

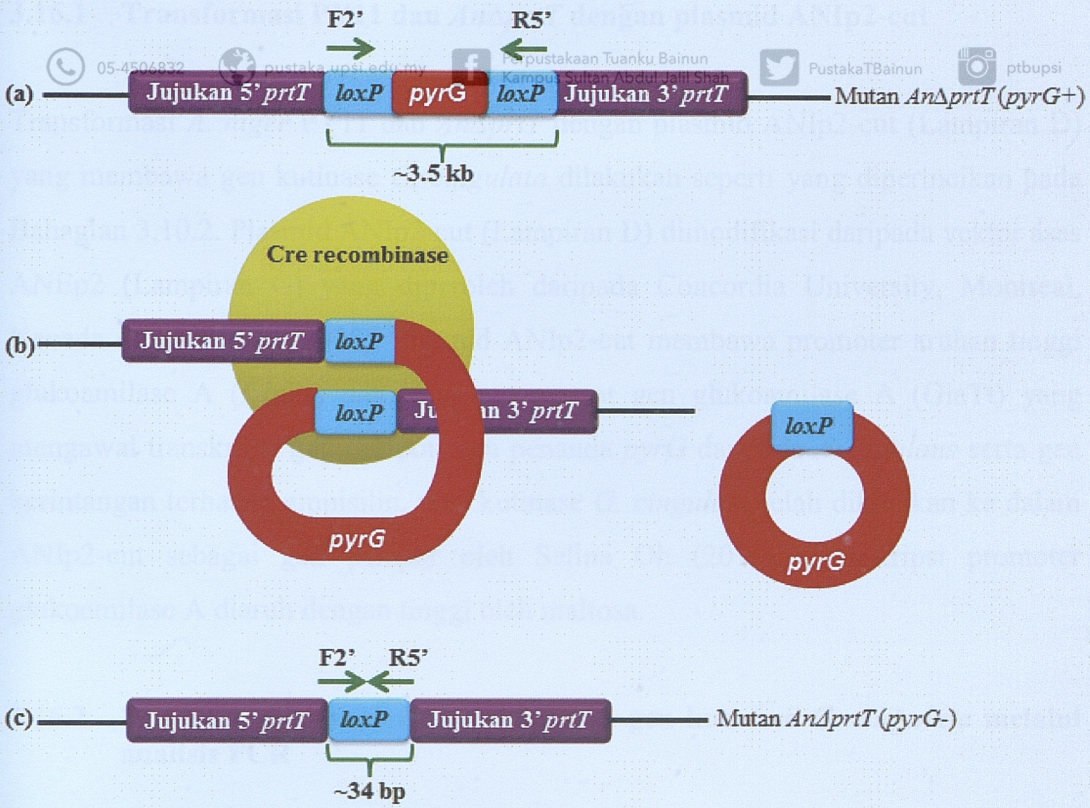
3.15.1 Transformasi mutan *AnΔprtT* dengan plasmid ANEp-Cre-ptrA dan penyaringan transforman putatif

Sferoplas *AnΔprtT* disediakan mengikut kaedah yang diperincikan oleh Storms et al. (2005) seperti Bahagian 3.10.1. Transformasi mutan *AnΔprtT* dengan plasmid ANEp-Cre-ptrA dilakukan sebagaimana yang diperincikan pada Bahagian 3.10.2. Penyaringan transforman dilakukan di atas piring MM yang mengandungi xilosa 1% (j/i) dan antibiotik piritiamin 0.1 mg/L. Selepas pemencilan spora tunggal, spora transforman putatif dituai dan dipiringkan sebanyak dua kali di atas agar MM yang mengandungi xilosa 1% (j/i), antibiotik piritiamin 0.1 mg/L dan asid 5'-fluoroorotik (5-FOA) 2 mg/mL. Transforman yang kehilangan penanda *pyrG* sahaja yang boleh hidup di atas piring yang mengandungi 5-FOA.

3.15.2 Pengesahan mutan *AnΔprtT* yang telah kehilangan gen penanda *pyrG* melalui analisis PCR

Kehilangan penanda *pyrG* daripada mutan *AnΔprtT* disahkan melalui analisis PCR dengan menggunakan pencetus F2' dan R5' (Rajah 3.4) untuk mengamplifikasi fragmen *loxP-pyrG-loxP*. Sebelum itu, pengekstrakan DNA transforman putatif yang telah kehilangan penanda *pyrG* dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.6.1 manakala amplifikasi fragmen ini dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.8. DNA genom mutan *AnΔprtT* yang tidak ditransformasi dengan ANEp-Cre-ptrA ($pyrG^{+}$) digunakan sebagai kawalan negatif.

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

Rajah 3.4 Skema kitar semula gen penanda *pyrG* dan kedudukan pasangan pencetus yang direka untuk mengesahkan kehilangan gen penanda *pyrG* daripada mutan *AnΔprtT*
(a) Lokus pada alel *prtT* ternyahaktif setelah digantikan dengan gen penanda *pyrG* serta kedudukan pencetus kehadapan (F2') dan pencetus berbalik (R5') pada genom mutan *AnΔprtT* (*pyrG*$^{+}$). (b) Proses rekombinasi di antara jujukan *loxP* pada kaset gangguan dan pemotongan keluar gen penanda *pyrG* yang dimangkinkan oleh Cre rekombinase. (c) Lokus pada alel *prtT* ternyahaktif setelah kehilangan gen penanda *pyrG* serta kedudukan pencetus kehadapan (F2') dan pencetus berbalik (R5') pada genom mutan *AnΔprtT* (*pyrG*$^{-}$).

3.16 PENGHASILAN PROTEIN HETEROLOG OLEH *A. niger* PY11 DAN MUTAN *AnΔprtT*

Bagi menguji keefisienan *AnΔprtT* dan *A. niger* PY11 sebagai hos untuk penghasilan protein heterolog, gen kutinase *G. cingulata* yang berperanan sebagai gen pelapor perlu diintegrasikan ke dalam kedua-dua strain terlebih dahulu. Oleh itu, *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* ditransformasi dengan plasmid ANIp2-cut yang membawa gen kutinase *G. cingulata*.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

3.16.1 Transformasi PY11 dan *AnΔprtT* dengan plasmid ANIp2-cut

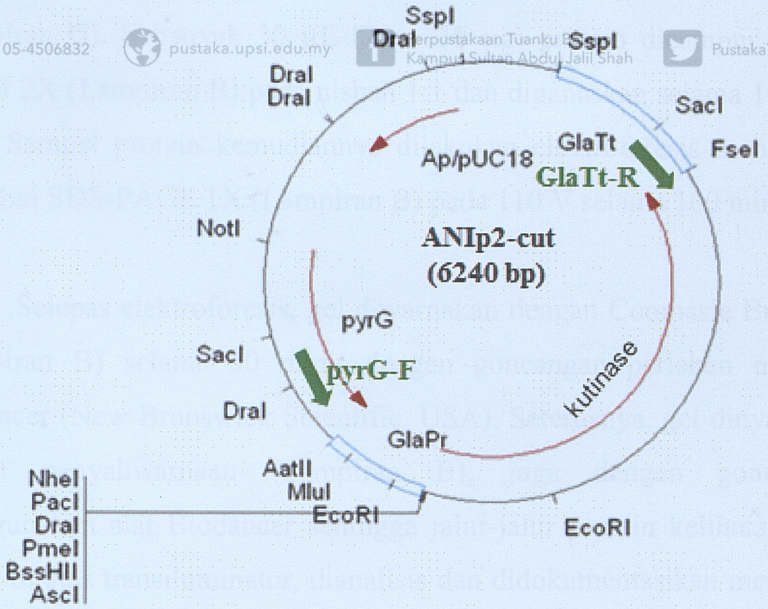
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Transformasi *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* dengan plasmid ANIp2-cut (Lampiran D) yang membawa gen kutinase *G. cingulata* dilakukan seperti yang diperincikan pada Bahagian 3.10.2. Plasmid ANIp2-cut (Lampiran D) dimodifikasi daripada vektor asas ANEp2 (Lampiran G) yang diperoleh daripada Concordia University, Montreal, Kanada (Storms et al. 2005). Plasmid ANIp2-cut membawa promoter aruhan tinggi glukoamilase A (*Gla*Pr) dan jujukan penamat gen glukoamilase A (GlaTt) yang mengawal transkripsi gen pelapor, gen penanda *pyrG* daripada *A. nidulans* serta gen kerintangan terhadap ampisilin. Gen kutinase *G. cingulata* telah diklonkan ke dalam ANIp2-cut sebagai gen pelapor oleh Selina Oh (2013). Transkripsi promoter glukoamilase A diaruh dengan tinggi oleh maltosa.

3.16.2 Penyaringan transforman membawa gen kutinase *G. cingulata* melalui analisis PCR

Pengesahan integrasi vektor pengekspresan ANIp2-cut dalam genom transforman dilakukan melalui analisis PCR. Pencetus kehadapan (pyrG-F) dibina untuk berkomplementari dengan jujukan *pyrG* pada ANIp2-cut manakala pencetus berbalik (GlaTt-R) dibina untuk berkomplementari dengan jujukan penamat gen glukoamilase pada ANIp2-cut (Rajah 3.5). Pengekstrakan DNA transforman putatif dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.6.1 manakala amplifikasi fragmen ini dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.8. DNA genom *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* yang tidak ditransformasi dengan ANIp2-cut digunakan sebagai kawalan negatif.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 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
Pencetus kehadapan (pyrG-F) dan pencetus berbalik (GlaTt-R) ditunjukkan dengan anak panah berwarna hijau.

3.16.3 Pengekspresan kutinase heterolog

Sebanyak 2 x 10^6 spora/mL *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* dikultur di dalam 50 mL medium minimum yang mengandungi 15% (j/i) maltosa (MMJ) (Lampiran A). Kepekatan maltosa sebanyak 15% (j/i) digunakan untuk mengaruh pengekspresan kutinase heterolog yang diklonkan dibawah kawalan promoter aruhan tinggi gen glukoamilase A (*Gla*Pr, berdasarkan komunikasi peribadi dengan R. Storms, Concordia University, Kanada). Pengkulturan dilakukan di dalam piring petri berdiameter 150 mm dan dieram secara statik pada 30°C selama 4 hari. Protein ekstrak kasar bagi kultur yang dituai diukur kepekatannya menggunakan kaedah yang telah dihuraikan pada Bahagian 3.14.3.

3.16.4 Elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE)

SDS-PAGE disediakan seperti kaedah yang dihuraikan oleh Laemmli (1970)

dengan menggunakan gel pemisah 12% dan gel pemampat berkepekatan 5% (Lampiran C). Sebanyak 30 µL (20 – 30 µg) protein dicampur dengan penimbal sampel 2X (Lampiran B) pada nisbah 1:1 dan dipanaskan selama 10 minit pada suhu 95°C. Sampel protein kemudiannya dilakukan elektroforesis menggunakan larutan penimbal SDS-PAGE 1X (Lampiran B) pada 110 V selama 100 minit.

Selepas elektroforesis, gel diwarnakan dengan Coomasie Brilliant Blue R250 (Lampiran B) selama 30 minit dengan goncangan perlahan menggunakan alat Biodancer (New Brunswick Scientific, USA). Seterusnya, gel dinyahwarna di dalam larutan penyahwarnaan (Lampiran B), juga dengan goncangan perlahan menggunakan alat Biodancer sehingga jalur-jalur protein kelihatan. Kemudian, gel dilihat di atas transiluminator, dianalisis dan didokumentasikan menggunakan sistem Alpha Imager ™ 2200 (Alpha Innotech, USA).

3.16.5 Pemblotan Western

Pemblotan Western dilakukan berdasarkan kaedah yang dihuraikan oleh Towbin et al. (1979). Protein yang telah difraksikan melalui SDS-PAGE diblotkan ke atas membran nitroselulosa menggunakan kaedah elektroforesis arus tetap 200 mA selama 2 jam. Penimbal Towbin yang digunakan disediakan seperti Lampiran B. Selepas pemblotan, membran dieram dalam susu skim 4% (j/i) selama 1 jam pada suhu bilik dengan goncangan sederhana. Susu skim yang digunakan berfungsi untuk menghalang pengikatan tidak spesifik oleh antibodi primer dan sekunder pada membran nitroselulosa.

Seterusnya, membran dibasuh sebanyak tiga kali dengan penimbal PBST (*'Phosphate Buffered Saline'* dengan Tween 20 0.2% (i/i)) (Lampiran B), dengan setiap kali basuhan goncangan pada 150 rpm selama 5 minit pada suhu bilik. Membran kemudiannya dieram dalam susu skim 4% (j/i) dalam penimbal PBS 1X (Lampiran B) yang telah ditambah antibodi monoklon anti-kutinase selama 1 jam pada suhu bilik dan digoncang pada 50 rpm. Seterusnya, membran dibasuh dengan menggunakan penimbal PBST sebanyak enam kali dengan setiap basuhan dilakukan goncangan pada 150 rpm selama 5 minit. Selepas itu, membran kemudian dieram

dengan susu skim 4% (j/i) dalam penimbal PBS 1X yang mengandungi antibodi sekunder iaitu antibodi IgG arnab berkonjugat HRP selama 1 jam pada suhu bilik dan digoncang pada 50 rpm. Akhir sekali, membran dibasuh dengan menggunakan penimbal PBST sebanyak enam kali dengan setiap kali basuhan gocangan pada 150 rpm selama 5 minit sebelum pengesanan isyarat protein dilakukan.

Penjanaan isyarat protein dilakukan dengan menggunakan reagen SuperSignal® West Pico Chemiluminitescent Substrate. Reagen 1 dan reagen 2 yang dibekalkan oleh pengeluar dicampurkan pada nisbah 1:1 sebelum digunakan untuk mengeram membran selama 5 minit pada suhu bilik. Membran seterusnya didedahkan kepada filem sinaran-X (Kodak, USA) dalam keadaan gelap selama 3 hingga 5 minit pada suhu bilik. Proses pengesanan isyarat dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.11.9.

3.16.6 Pengasaian aktiviti kutinase heterolog

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Aktiviti kutinase diukur melalui kaedah kalorimetrik menggunakan *para*-nitrofenol laurat (pNPL) sebagai substrat (Kumar et al. 2005). Asai dilakukan dengan mencampurkan sebanyak 2.5 µL pNPL 20 µM kepada 96.5 µL penimbal Tris-HCL 0.5M (pH 8). Kemudian, 1 µL protein ekstrak kasar ditambahkan ke dalam campuran sebelum dieram pada suhu bilik selama 10 minit. Tindak balas dihentikan dengan mengeram campuran pada suhu -20°C selama 8 minit. Produk *p*-nitrofenol yang terhasil dalam tindak balas tersebut diukur melalui bacaan penyerapan pada jarak gelombang 405 nm. Lengkok piawai dilakukan dengan menggunakan 0.03 hingga 0.3 µmol pNP (Lampiran K).

Semua sampel diasai dalam tiga replikat dan disertakan dengan kawalan negatif yang terdiri daripada campuran penimbal dengan substrat dan campuran penimbal dengan enzim bagi mengurangkan ralat penentuan aktiviti kutinase. Satu unit enzim ditakrifkan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan satu µmol pNP per minit di bawah keadaan yang spesifik.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun PustakaTBainun ptbupsi

3.17 UJIAN KESTABILAN KUTINASE HETEROLOG DALAM PROTEIN EKSTRAK KASAR *A. niger* PY11 DAN MUTAN *AnΔprtT*

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Pengekspresan kutinase heterolog dilakukan seperti yang diterangkan pada 3.16.3. Protein ekstrak kasar dituai pada hari ke-4 dan dituras menggunakan membran penuras 0.22 μm (Sartorius, USA). Aktiviti kutinase dalam protein ekstrak kasar diasai bagi merekod aktiviti sebelum ujian kestabilan dimulakan. Selepas itu, protein ekstrak kasar tersebut dialikuot sebanyak 20 μL ke dalam tiub-tiub mikropengempar 0.2 mL sebelum dieram pada suhu 4°C dan 25°C. Bagi suhu 4°C, protein dieram selama 6 minggu dan aktiviti kutinase residual diasai pada setiap 7 hari. Bagi suhu 25°C, protein dieram selama 14 hari dan aktiviti kutinase residual diasai pada setiap 2 hari. Pengasaian dilakukan seperti yang diterangkan pada Bahagian 3.16.6. Aktiviti relatif dalam peratusan ditentukan berbanding aktiviti sebelum eraman dimulakan.

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

BAB IV

PEMBANGUNAN MUTAN *prtT* DARIPADA *Aspergillus niger*

4.1 PENGENALAN

Kulat berfilamen *Aspergillus niger* digunakan secara meluas dalam industri fermentasi untuk penghasilan pelbagai enzim dan asid organik. Penggunaan *A. niger* sebagai bio kilang untuk penghasilan protein homolog dan heterolog adalah berdasarkan kepada keupayaan kulat ini untuk merembeskan pelbagai enzim hidrolitik dalam kuantiti yang banyak ke medium pertumbuhan. Walau bagaimanapun, protease natif yang dihasilkan oleh hos sendiri sering menyebabkan degradasi protein, sama ada semasa perembesan ataupun penyimpanan (Sharma et al. 2009). Degradasi proteolitik oleh protease natif ekstra sel menjadi salah satu faktor utama yang menghalang penggunaan kulat berfilamen untuk menghasilkan protein (Braaksma et al. 2009).

Beberapa kajian telah membuktikan bahawa masalah degradasi protein heterolog oleh protease boleh diatasi dengan melakukan penyahaktifan gen-gen protease. Wang et al. (2008) telah menyahaktifkan tiga gen protease aspartik iaitu *pepAa*, *pepAb* dan *pepAd* daripada *A. niger* dengan tujuan untuk melihat kesan penurunan aktiviti protease terhadap kestabilan protein heterolog. Tahap perembesan lakase heterolog daripada mutan-mutan tersebut didapati meningkat masing-masing sebanyak 21%, 42% dan 30% berbanding strain kawalan.

Selain itu, gen peptidase tripeptidil, *AosedD* daripada *Aspergillus oryzae* telah dinyahaktif oleh Zhu et al. (2012). Aktiviti protease ekstra sel dan aktiviti peptidase tripeptidil dalam medium pengkulturan mutan *AosedD* didapati menurun berbanding

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

BAB IV

PEMBANGUNAN MUTAN *prtT* DARIPADA *Aspergillus niger*

4.1 PENGENALAN

Kulat berfilamen *Aspergillus niger* digunakan secara meluas dalam industri fermentasi untuk penghasilan pelbagai enzim dan asid organik. Penggunaan *A. niger* sebagai bio kilang untuk penghasilan protein homolog dan heterolog adalah berdasarkan kepada keupayaan kulat ini untuk merembeskan pelbagai enzim hidrolitik dalam kuantiti yang banyak ke medium pertumbuhan. Walau bagaimanapun, protease natif yang dihasilkan oleh hos sendiri sering menyebabkan degradasi protein, sama ada semasa perembesan ataupun penyimpanan (Sharma et al. 2009). Degradasi proteolitik oleh protease natif ekstra sel menjadi salah satu faktor utama yang menghalang penggunaan kulat berfilamen untuk menghasilkan protein (Braaksma et al. 2009).

Beberapa kajian telah membuktikan bahawa masalah degradasi protein heterolog oleh protease boleh diatasi dengan melakukan penyahaktifan gen-gen protease. Wang et al. (2008) telah menyahaktifkan tiga gen protease aspartik iaitu *pepAa*, *pepAb* dan *pepAd* daripada *A. niger* dengan tujuan untuk melihat kesan penurunan aktiviti protease terhadap kestabilan protein heterolog. Tahap perembesan lakase heterolog daripada mutan-mutan tersebut didapati meningkat masing-masing sebanyak 21%, 42% dan 30% berbanding strain kawalan.

Selain itu, gen peptidase tripeptidil, *AosedD* daripada *Aspergillus oryzae* telah dinyahaktif oleh Zhu et al. (2012). Aktiviti protease ekstra sel dan aktiviti peptidase tripeptidil dalam medium pengkulturan mutan *AosedD* didapati menurun berbanding

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

BAB IV

PEMBANGUNAN MUTAN *prtT* DARIPADA *Aspergillus niger*

4.1 PENGENALAN

Kulat berfilamen *Aspergillus niger* digunakan secara meluas dalam industri fermentasi untuk penghasilan pelbagai enzim dan asid organik. Penggunaan *A. niger* sebagai bio kilang untuk penghasilan protein homolog dan heterolog adalah berdasarkan kepada keupayaan kulat ini untuk merembeskan pelbagai enzim hidrolitik dalam kuantiti yang banyak ke medium pertumbuhan. Walau bagaimanapun, protease natif yang dihasilkan oleh hos sendiri sering menyebabkan degradasi protein, sama ada semasa perembesan ataupun penyimpanan (Sharma et al. 2009). Degradasi proteolitik oleh protease natif ekstra sel menjadi salah satu faktor utama yang menghalang penggunaan kulat berfilamen untuk menghasilkan protein (Braaksma et al. 2009).

Beberapa kajian telah membuktikan bahawa masalah degradasi protein heterolog oleh protease boleh diatasi dengan melakukan penyahaktifan gen-gen protease. Wang et al. (2008) telah menyahaktifkan tiga gen protease aspartik iaitu *pepAa*, *pepAb* dan *pepAd* daripada *A. niger* dengan tujuan untuk melihat kesan penurunan aktiviti protease terhadap kestabilan protein heterolog. Tahap perembesan lakase heterolog daripada mutan-mutan tersebut didapati meningkat masing-masing sebanyak 21%, 42% dan 30% berbanding strain kawalan.

Selain itu, gen peptidase tripeptidil, *AosedD* daripada *Aspergillus oryzae* telah dinyahaktif oleh Zhu et al. (2012). Aktiviti protease ekstra sel dan aktiviti peptidase tripeptidil dalam medium pengkulturan mutan *AosedD* didapati menurun berbanding

strain kawalan. Hasil maksimum protein rekombinan kimosin bovin (CHY) dan lisozim manusia (HLY) yang dihasilkan oleh mutan *AosedD* menunjukkan peningkatan masing-masing sebanyak 2.9 dan 1.7 kali ganda berbanding strain kawalan. Hasil ini membuktikan bahawa, AosedD merupakan salah satu protease utama yang terlibat dalam degradasi proteolitik protein rekombinan dalam *A. oryzae*.

Faktor transkripsi spesifik-protease, *prtT* daripada *A. niger* telah diklon dan dicirikan oleh Punt et al. (2008). *PrtT* mengawal atur pengekspresan beberapa gen yang mengekod protease di dalam *A. niger*. Penyahaktifan *prtT* dalam *A. niger* strain AB4.1 oleh Punt et al. (2008) menyebabkan penurunan pengekspresan empat protease iaitu *pepA, pepB, pepD* and *pepF*. Protease serina alkali (*AlpA*) dan metaloprotease neutral M36 (*Np1*) diekspreskan pada tahap yang rendah dalam mutan *prtT A. oryzae* berbanding jenis liar (Punt et al. 2008). Penyahaktifan *prtT Aspergillus fumigatus* turut menyebabkan pengurangan aktiviti protease ekstra sel dan penurunan tahap transkripsi enam gen protease ekstra sel (Bergmann et al. 2009; Sharon et al. 2009).

Jumlah protease yang besar serta kemungkinan pengawalaturan yang kompleks dalam *A. niger* menyebabkan penyahaktifan gen protease individu secara berturutan bukan sahaja melibatkan banyak kerja makmal dan memakan masa yang lama, tetapi mungkin dapat menyelesaikan sebahagian masalah sahaja. Justeru, dengan menyahaktifkan faktor transkripsi yang dipercayai mengawal atur pengekspresan gen protease yang utama, diharap dapat mengurangkan masalah protease sekaligus dapat meningkatkan penghasilan protein heterolog. Maka, dalam kajian ini, faktor transkripsi *prtT* telah dinyahaktifkan dalam *A. niger* PY11 dan mutan *prtT* yang terhasil telah dicirikan.

A. niger PY11 (*cspA1*$^{-}$, *pyrG6*$^{-}$, *ΔglaA::HISG, ΔbglA::HISG)* yang digunakan dalam kajian ini mempunyai genotip yang berbeza dengan strain yang digunakan oleh Punt et al. (2008). Mutan *prtT* daripada *A. niger* yang dihasilkan oleh Punt et al. (2008) berasal daripada strain AB4.1 (*pyrG*$^{-}$). Strain AB4.1 pula berasal daripada strain N402 (Bos et al. 1988). Berbanding Strain AB4.1, *A. niger* PY11 telah direka

bentuk secara khusus untuk berfungsi sebagai hos pengekspresan bagi penghasilan protein heterolog yang tinggi. Justeru, fokus keseluruhan kajian ini adalah untuk menambah baik kualiti strain yang sedia ada pada *A. niger* PY11 dengan cara mengurangkan penghasilan protease yang dihasilkan oleh hos, agar penghasilan protein heterolog dapat dipertingkatkan. Dalam bab ini, penjanaan mutan *prtT* bagi *A. niger* PY11 serta pencirian mutan tersebut akan dibincangkan.

4.2 PENYAHAKTIFAN GEN *prtT A. niger* PY11

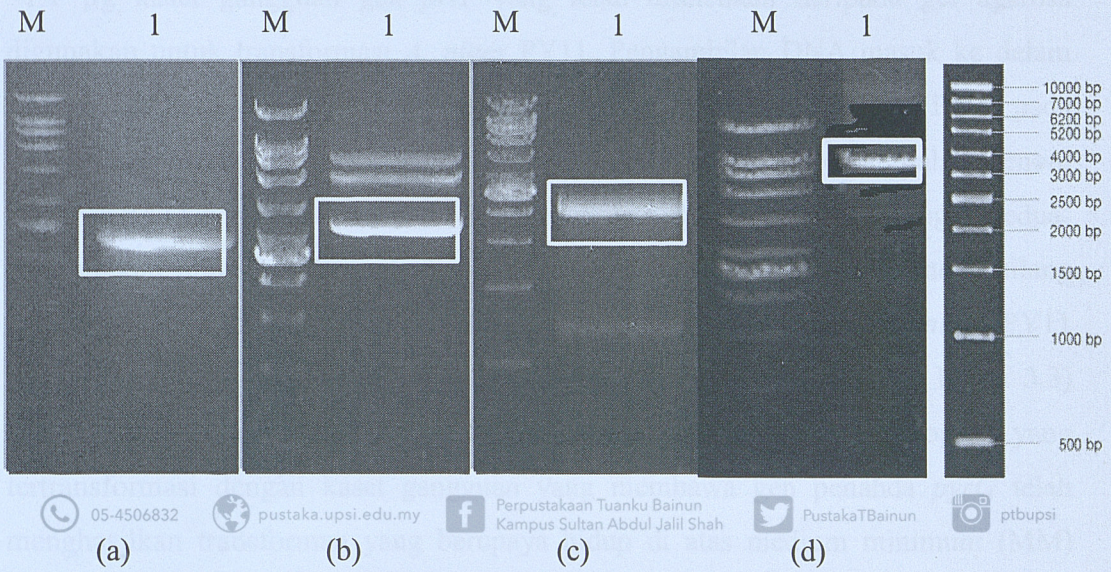
4.2.1 Pengekstrakan DNA genom *A. niger* PY11

DNA genom *A. niger* PY11 dipencilkan daripada miselium mengikut kaedah yang dibangunkan oleh Oh et al. (2009). Kaedah ini adalah gabungan kaedah Dellaporta et al. (1983) dan John (1992) yang menggabungkan pembentukan kompleks polifenol oleh polivinilpirolidon (PVP) dan diikuti oleh lisis sel dan pemendakan selektif serta pengemparan untuk menyingkirkan kompleks PVP. Kaedah ini dapat memberikan hasil dan ketulenan yang baik di mana kepekatan DNA yang diperoleh adalah 2680 μg/μL dengan nisbah $A_{260/280}$ dan $A_{260/230}$ masing-masing adalah 1.79 dan 1.75. DNA genom yang diperoleh digunakan sebagai templat dalam tindak balas PCR bagi mengamplifikasikan jujukan apitan 5' dan 3' gen *prt*T.

4.2.2 Pembinaan kaset gangguan gen *prt*T

Gangguan gen *prt*T dilakukan untuk mengkaji fungsi dan kesan penyahaktifan gen tersebut dalam *A. niger* PY11. Kaset gangguan dibina menggunakan strategi yang berasaskan PCR (Noble & Johnson 2005). Pada peringkat pertama, tiga produk PCR iaitu gen penanda *pyrG* serta jujukan apitan 5' dan 3' gen *prt*T telah berjaya diamplifikasi secara berasingan. Amplifikasi jujukan apitan 5' dengan kombinasi pencetus 1 dan 3 menghasilkan produk PCR bersaiz ~2.3 kb manakala amplifikasi jujukan apitan 3' dengan pencetus 4 dan 6 menghasilkan produk PCR bersaiz ~2.0 kb. Kedua-dua jujukan apitan 5' dan 3' diamplifikasikan menggunakan DNA *A. niger* PY11 sebagai templat (Rajah 4.1a & c) Seterusnya, jujukan gen penanda *pyrG* bersaiz ~3.5 kb diamplifikasi daripada plasmid pyrG-Anid sebagai templat dengan

pencetus 2 dan 5 (Rajah 4.1b). Pada peringkat kedua, ketiga-tiga produk PCR tersebut digabungkan melalui PCR cantuman untuk menghasilkan kaset gangguan yang lengkap bersaiz ~7.8 kb (Rajah 4.1d). Jujukan apitan 5' dan 3' gen *prt*T dicantumkan dengan jujukan gen penanda *pyrG* melalui pertindihan kawasan penyambung yang berkomplementari di antara satu sama lain.



05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Rajah 4.1 Profil elektroforesis gel agarosa (1%) bagi produk PCR mengekod jujukan apitan 5' gen *prtT*, jujukan gen penanda *pyrG*, jujukan apitan 3' gen *prtT* dan jujukan lengkap kaset gangguan gen *prtT*
(a) Hasil PCR jujukan apitan 5' *prtT*. Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: Amplikon mengekod jujukan apitan 5' gen *prtT* (~2.3 kb).
(b) Hasil PCR jujukan gen penanda, *pyrG*. Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: Amplikon mengekod gen penanda *pyrG* (~3.5 kb).
(c) Hasil PCR jujukan apitan 3' *prtT*. Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: Amplikon mengekod jujukan apitan 3' gen *prtT* (~2.0 kb).
(d) Hasil PCR jujukan lengkap kaset gangguan gen *prtT*. Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: Amplikon mengekod jujukan lengkap kaset gangguan gen *prtT* (~7.8 kb).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

4.2.3 Transformasi *A. niger* PY11 dengan kaset gangguan gen *prt*T

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kaedah transformasi berperantarakan sferoplas digunakan untuk transformasi *A. niger* PY11. Sferoplas diperoleh setelah dinding sel miselium kulat dicerna selama 2.5 jam di dalam larutan osmotik (LO) oleh enzim lisis daripada *Trichoderma harzianum*. Kepekatan sferoplas yang diperoleh adalah 1.04 X 10^7 mL^{-1}. Sebanyak ~1.1 µg kaset gangguan gen *prtT* yang telah ditulenkan daripada gel agarosa digunakan untuk transformasi *A. niger* PY11. Pengambilan DNA masuk ke dalam sferoplas berlaku dengan kehadiran ion kalsium dan polietilena glikol (PEG) pada kepekatan yang tinggi (Hynes 1996). Integrasi kaset gangguan gen ke dalam genom *A. niger* PY11 berlaku melalui rekombinasi homolog pada lokus *prtT* dengan kedua-dua jujukan apitan *prtT* yang mengapit gen penanda *pyrG*. Proses pindah silang ganda dua yang berlaku telah menyebabkan gen *prtT* pada genom *A. niger* PY11 digantikan dengan gen penanda *pyrG* daripada kaset gangguan (rujuk Rajah 3.3) Memandangkan *A. niger* PY11 merupakan auksotrof uridina, sferoplas yang tertransformasi dengan kaset gangguan yang membawa gen penanda *pyrG* telah menghasilkan transforman yang berupaya hidup di atas medium minimum (MM) yang mengandungi potasium klorida tanpa urasil dan uridina (prototrof uridina).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Selepas 3 hari eraman, sebanyak 296 transforman prototrof uridina berjaya hidup di atas agar MM tanpa urasil dan uridina. Sebanyak 10 transforman prototrof dipilih secara rawak dan disubkultur di atas agar MM tanpa urasil dan uridina yang baru bagi mendapatkan stok konidium. Selepas dilakukan pemencilan spora tunggal, transforman putatif disaring melalui analisis pengasaian aktiviti proteolitik ekstra sel yang dilakukan secara kualitatif di atas agar MM yang mengandungi kasein dan gelatin. Sejumlah lima daripada 10 transforman putatif yang disaring menunjukkan fenotip mutan berdasarkan kawasan hidrolisis di sekeliling koloni yang lebih kecil berbanding kawasan hidrolisis pada koloni *A. niger* PY11 (kawalan).

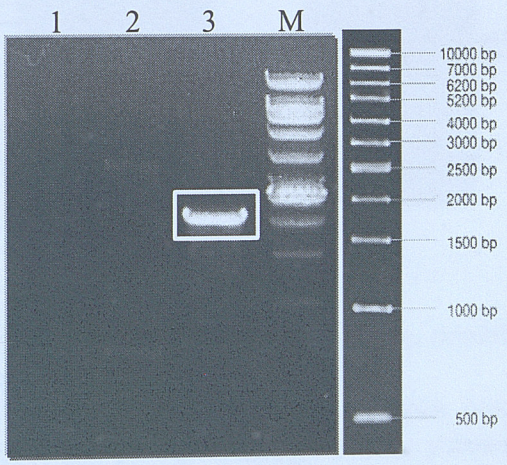
4.2.4 Pengesahan integrasi kaset gangguan gen pada lokus *prt*T

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Bagi mengesahkan integrasi kaset gangguan gen berlaku pada lokus *prt*T dalam genom *A. niger* PY11, transforman putatif disaring melalui analisis PCR dan

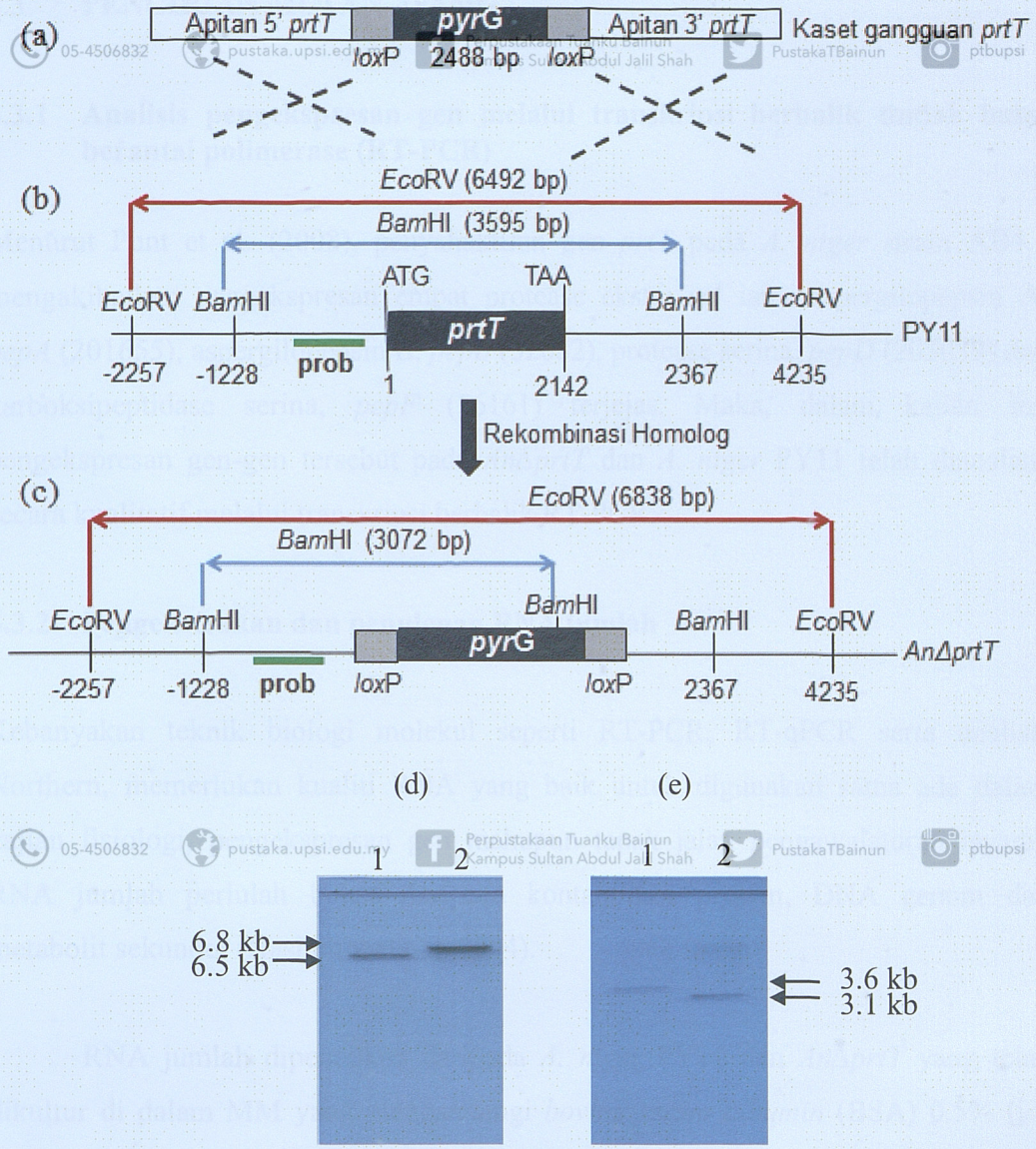
seterusnya disahkan melalui analisis Southern. PCR dilakukan menggunakan pencetus ke hadapan (Fwd_Out_Ds) yang dibina untuk berkomplementari dengan jujukan *pyrG* pada kaset manakala pencetus berbalik (Rev_Out_Ds) dibina untuk berkomplementari dengan kawasan di luar jujukan 3' gen *prtT* (rujuk Rajah 3.3). Hanya satu transforman iaitu *A. niger ΔprtT* yang selepas ini dikenali sebagai *AnΔprtT* yang menunjukkan integrasi kaset gangguan pada lokus yang betul di dalam genom apabila produk PCR sasaran bersaiz 2.2 kb diperoleh (Rajah 4.2). Rajah 4.3a hingga c menunjukkan skema penyahaktifan gen *prtT*. Pemblotan Southern dilakukan dengan mencernakan DNA genom *A. niger* PY11 dan transforman *AnΔprtT* masing-masing dengan *Bam*HI dan *Eco*RV. Kedua-dua blot diprobkan dengan fragmen 5' gen *prt*T bersaiz 1.1 kb. Bagi DNA yang tercerna dengan *Eco*RV, penghibridan dengan prob menghasilkan isyarat positif bersaiz ~6.8 kb pada transforman *AnΔprtT* dan ~6.5 kb pada *A. niger* PY11. Peningkatan saiz fragmen sebanyak ~0.3 kb pada transforman *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11 mengesahkan integrasi kaset gangguan pada lokus *prt*T. Bagi DNA yang tercerna dengan *Bam*HI pula, isyarat positif bersaiz ~3.1 kb terhasil pada transforman *AnΔprtT* dan ~3.6 kb pada *A. niger* PY11 (Rajah 4.3d hingga e).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 4.2 Profil elektroforesis gel agarosa (1%) analisis PCR transforman putatif untuk mengesahkan integrasi kaset gangguan gen *prtT* dalam genom *A. niger* PY11
Lajur 1: Kawalan negatif (campuran komponen PCR tanpa DNA genom); Lajur 2: Kawalan negatif (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom *A. niger* PY11); Lajur 3: Amplikon bersaiz 2.2 kb (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom transforman *AnΔprtT*; Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb DNA (Vivantis, Malaysia).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 4.3 Skema penyahaktifan gen *prtT* dan analisis pemblotan Southern untuk pengesahan mutan
(a) Kaset gangguan gen *prtT* (b) Peta tapak penyekatan enzim pada lokus *prtT* dalam *A. niger* PY11. Garisan putus-putus antara (a) dan (b) mewakili pindah silang yang berlaku antara dua kawasan homolog semasa penyahaktifan *prtT*. (c) Peta tapak penyekatan enzim pada alel *prtT* ternyahaktif. (d) Blot Southern menggunakan DNA genom yang tercerna dengan *Eco*RV. (e) Blot Southern menggunakan DNA genom yang tercerna dengan *Bam*HI. Kedua-dua (d) dan (e) diprobkan dengan fragmen 5' *prtT* bersaiz 1.1 kb. Lajur 1: *A. niger* PY11; Lajur 2: *AnΔprtT*. Bagi *A. niger* PY11, fragmen DNA bersaiz 6.5 kb dan 3.6 kb terhasil pada DNA genom yang tercerna dengan *Eco*RV dan *Bam*HI. Manakala, pada *AnΔprtT,* jalur bersaiz 6.8 kb dan 3.1 kb dikesan pada kedua-dua blot.

4.3 PENCIRIAN MUTAN *AnΔprtT*

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

4.3.1 Analisis pengekspresan gen melalui transkripsi berbalik tindak balas berantai polimerase (RT-PCR)

Menurut Punt et al. (2008), penyahaktifan gen *prt*T pada *A. niger* strain AB4.1 mengakibatkan pengekspresan empat protease ekstra sel iaitu aspergilopepsin A, *pepA* (201655), aspergilopepsin B, *pepB* (52082), protease serina, *pepD* (203039) dan karboksipeptidase serina, *pepF* (56161) terjejas. Maka, dalam kajian ini, pengekspresan gen-gen tersebut pada *AnΔprtT* dan *A. niger* PY11 telah dianalisis secara kualitatif melalui transkripsi berbalik RT-PCR.

4.3.2 Pengekstrakan dan penulenan RNA jumlah

Kebanyakan teknik biologi molekul seperti RT-PCR, RT-qPCR serta analisis Northern, memerlukan kualiti RNA yang baik untuk digunakan sama ada dalam kajian fisiologi, pengekspresan gen mahupun tapak jalan pengawalaturan isyarat. RNA jumlah perlulah bebas daripada kontaminasi protein, DNA genom dan metabolit sekunder (Hashimoto et al. 2004).

RNA jumlah dipencilkan daripada *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* yang telah dikultur di dalam MM yang mengandungi *bovine serum albumin* (BSA) 0.5% (j/i) dan gelatin 0.5% (j/i) untuk mengaruh pengekspresan gen-gen protease. Kedua-dua strain juga dikultur di dalam MM yang mengandungi dekstrosa 0.5% (j/i) sebagai kawalan. Selepas pengekstrakan RNA daripada miselium menggunakan reagen TRIzol®, penulenan RNA dilakukan menggunakan kit Clean Up RNeasy dan RNase-free DNase untuk memastikan sampel bebas daripada kontaminasi DNA. Jadual 4.1 menunjukkan kepekatan dan ketulenan RNA jumlah yang diperoleh dan diukur dengan spektrofotometer.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Jadual 4.1 Kepekatan dan ketulenan RNA jumlah yang dipencilkan daripada *A. niger* strain PY11 dan mutan *AnΔprtT*

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Strain	(μg / μL)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
A. niger PY11 (diaruh)	1.52	1.84	1.90
A. niger PY11 (tidak diaruh)	3.25	1.76	2.50
AnΔprtT (diaruh)	2.05	1.76	2.14
AnΔprtT (tidak diaruh)	1.22	1.65	2.44

4.3.3 Analisis pengekspresan gen protease terpilih melalui RT-PCR

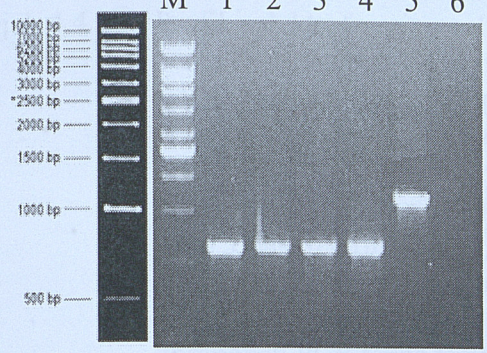
RT-PCR adalah kaedah yang sensitif untuk mengesan kehadiran mRNA gen tertentu. Berbanding dengan teknik yang lebih konvensional seperti pemedapan Northern yang memerlukan kuantiti RNA jumlah yang besar, RT-PCR dapat menentukan kehadiran transkrip dan mampu menganggarkan tahap pengekspresan mRNA daripada kuantiti sampel yang sangat kecil (Hashimoto et al. 2004).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

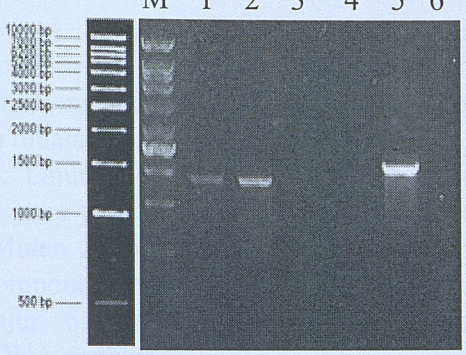
Amplifikasi transkrip *pepA*, *pepB*, *pepD* dan *pepF* dilakukan seperti kaedah yang diterangkan pada Bahagian 3.7 dengan menggunakan pencetus-pencetus spesifik seperti yang disenaraikan dalam Jadual 3.1. cDNA bagi gen gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase (*gpd*) bersaiz ~1.1 kb diamplifikasikan bagi tujuan kawalan positif terhadap cDNA yang disintesis (Rajah 4.4a). Ini kerana, *gpd* merupakan gen penyelenggara dan diekspreskan secara konstitutif di dalam *A. niger* (Punt et al. 1991). Selain itu, intensiti jalur transkrip *gpd* juga dijadikan sebagai kawalan bagi jumlah templat cDNA yang digunakan untuk setiap sampel.

Bagi mengesahkan penyahaktifan gen *prt*T berlaku sepenuhnya, kehadiran transkrip *prtT* dianalisis daripada sampel cDNA *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*. Transkrip *prt*T bersaiz ~1.8 kb dikesan pada kedua-dua sampel *A. niger* PY11 yang diaruh dan tidak diaruh (Rajah 4.4b). Ketiadaan transkrip *prtT* pada sampel *AnΔprtT* membuktikan bahawa gen *prtT* telah dinyahaktifkan sepenuhnya di dalam mutan *AnΔprtT* (Rajah 4.4b). Tahap pengekspresan *pepA*, *pepB* dan *pepF* dalam mutan

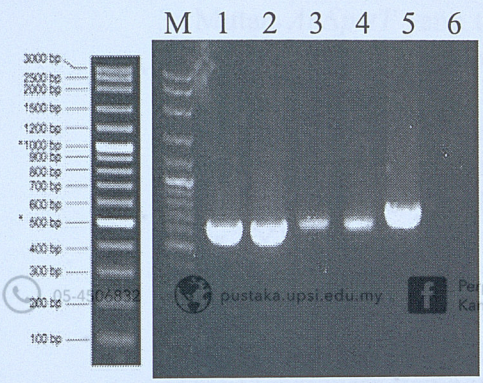
(a)



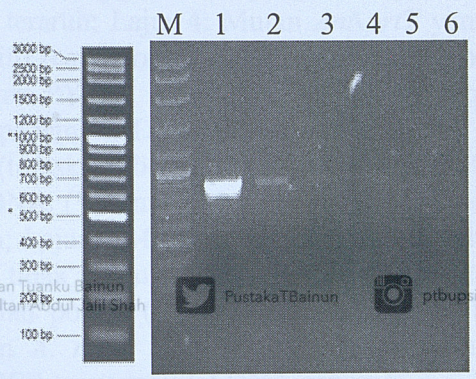
(b)



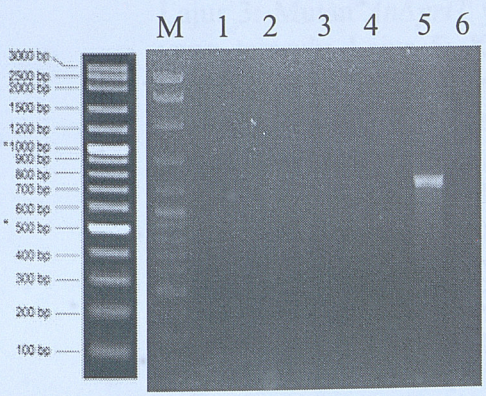
(c)



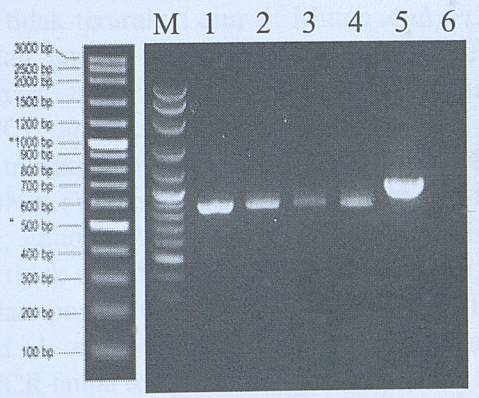
(d)



(e)



(f)



05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

bersambung…

...sambungan

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Rajah 4.4 Profil elektroforesis gel agarosa (1%) analisis RT-PCR bagi pengekspresan gen-gen protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*
(a) Pengekspresan gen penyelenggara *gpd A. niger* (amplikon bersaiz 1.3 kb) sebagai kawalan muatan. Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: *A. niger* PY11 yang tidak teraruh; Lajur 2: *A. niger* PY11 yang teraruh; Lajur 3: Mutan *AnΔprtT* yang tidak teraruh; Lajur 4: Mutan *AnΔprtT* yang teraruh; Lajur 5: Kawalan positif (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom *A. niger* PY11); Lajur 6: Kawalan negatif (campuran komponen PCR tanpa templat DNA genom).
(b) Pengekspresan *prtT* (transkrip bersaiz 1.8 kb). Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: *A. niger* PY11 yang tidak teraruh; Lajur 2: *A. niger* PY11 yang teraruh; Lajur 3: Mutan *AnΔprtT* yang tidak teraruh; Lajur 4: Mutan *AnΔprtT* yang teraruh; Lajur 5: Kawalan positif (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom *A. niger* PY11); Lajur 6: Kawalan negatif (campuran komponen PCR tanpa templat DNA genom).
(c) Pengekspresan *pepA* (transkrip bersaiz 642 bp). Lajur M: Penanda DNA VC 100 bp DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: *A. niger* PY11 yang tidak teraruh; Lajur 2: *A. niger* PY11 yang teraruh; Lajur 3: Mutan *AnΔprtT* yang tidak teraruh; Lajur 4: Mutan *AnΔprtT* yang teraruh; Lajur 5: Kawalan positif (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom *A. niger* PY11); Lajur 6: Kawalan negatif (campuran komponen PCR tanpa templat DNA genom).
(d) Pengekspresan *pepB* (transkrip bersaiz 900 bp). Lajur M: Penanda DNA VC 100 bp DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: *A. niger* PY11 yang tidak teraruh; Lajur 2: *A. niger* PY11 yang teraruh; Lajur 3: Mutan *AnΔprtT* yang tidak teraruh; Lajur 4: Mutan *AnΔprtT* yang teraruh; Lajur 5: Kawalan positif (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom *A. niger* PY11); Lajur 6: Kawalan negatif (campuran komponen PCR tanpa templat DNA genom).
(e) Pengekspresan *pepD* (transkrip bersaiz 1117 bp). Lajur M: Penanda DNA VC 100 bp DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: *A. niger* PY11 yang tidak teraruh; Lajur 2: *A. niger* PY11 yang teraruh; Lajur 3: Mutan *AnΔprtT* yang tidak teraruh; Lajur 4: Mutan *AnΔprtT* yang teraruh; Lajur 5: Kawalan positif (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom *A. niger* PY11); Lajur 6: Kawalan negatif (campuran komponen PCR tanpa templat DNA genom).
(f) Pengekspresan *pepF* (transkrip bersaiz 856 bp). Lajur M: Penanda DNA VC 100 bp DNA (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: *A. niger* PY11 yang tidak teraruh; Lajur 2: *A. niger* PY11 yang teraruh; Lajur 3: Mutan *AnΔprtT* yang tidak teraruh; Lajur 4: Mutan *AnΔprtT* yang teraruh; Lajur 5: Kawalan positif (campuran komponen PCR bersama templat DNA genom *A. niger* PY11); Lajur 6: Kawalan negatif (campuran komponen PCR tanpa templat DNA genom).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

*An*Δ*prtT* didapati berkurangan berbanding *A. niger* PY11 sama ada dalam keadaan yang teraruh atau tidak teraruh (Rajah 4.4c, d dan f). Walau bagaimanapun, gen *pepD* didapati tidak teraruh kerana transkrip *pepD* tidak dikesan pada kedua-dua strain dan juga pada kedua-dua keadaan (Rajah 4.4e). Hasil keputusan RT-PCR ini jelas menunjukkan bahawa pengekspresan *pepA*, *pepB* dan *pepF* dikawal atur pada peringkat transkripsi oleh faktor transkripsi *prt*T.

4.3.4 Pengasaian aktiviti enzim secara kualitatif dan kuantitatif

Aktiviti perembesan protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* ditentukan secara kualitatif di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kanji 1% (j/i). Berdasarkan ukuran jejari koloni yang diukur setiap hari, pertumbuhan *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* didapati setara (Rajah 4.5a). Setelah hari ketujuh, diameter zon 'halo' yang terbentuk di sekeliling koloni bagi kedua-dua strain juga didapati hampir sama (Rajah 4.5b). Ini menunjukkan bahawa pengekspresan enzim-enzim yang terlibat dalam hidrolisis kanji seperti amilase dan α-glukosidase oleh *An*Δ*prtT* tidak terjejas akibat penyahaktifan gen *prtT*.

Selain itu, asai aktiviti proteolitik protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* turut dilakukan. Walaupun kadar pertumbuhan koloni *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kasein 1% (j/i) dan gelatin 1% (j/i) adalah setara (Rajah 4.5c), namun, *An*Δ*prtT* jelas mempamerkan fenotip mutan berdasarkan pengurangan diameter zon 'halo' di sekeliling koloninya berbanding *A. niger* PY11 (Rajah 4.5d). Rajah 4.6 menunjukkan saiz zon 'halo' di sekeliling koloni *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* pada hari ke-7. Hasil ini mencadangkan bahawa fenotip yang ditunjukkan oleh *An*Δ*prtT* adalah disebabkan oleh gangguan yang telah berlaku pada gen *prtT*.

Bagi mengesahkan hasil yang diperoleh daripada pengasaian aktiviti proteolitik ekstra sel secara kualitatif ini, pengasaian secara kuantitatif pula dilakukan. *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* dikultur secara berasingan selama 6 hari dalam kaldu medium minimum (MM) yang mengandungi bran gandum 3% (j/i)

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

*An*Δ*prtT* didapati berkurangan berbanding *A. niger* PY11 sama ada dalam keadaan yang teraruh atau tidak teraruh (Rajah 4.4c, d dan f). Walau bagaimanapun, gen *pepD* didapati tidak teraruh kerana transkrip *pepD* tidak dikesan pada kedua-dua strain dan juga pada kedua-dua keadaan (Rajah 4.4e). Hasil keputusan RT-PCR ini jelas menunjukkan bahawa pengekspresan *pepA*, *pepB* dan *pepF* dikawal atur pada peringkat transkripsi oleh faktor transkripsi *prt*T.

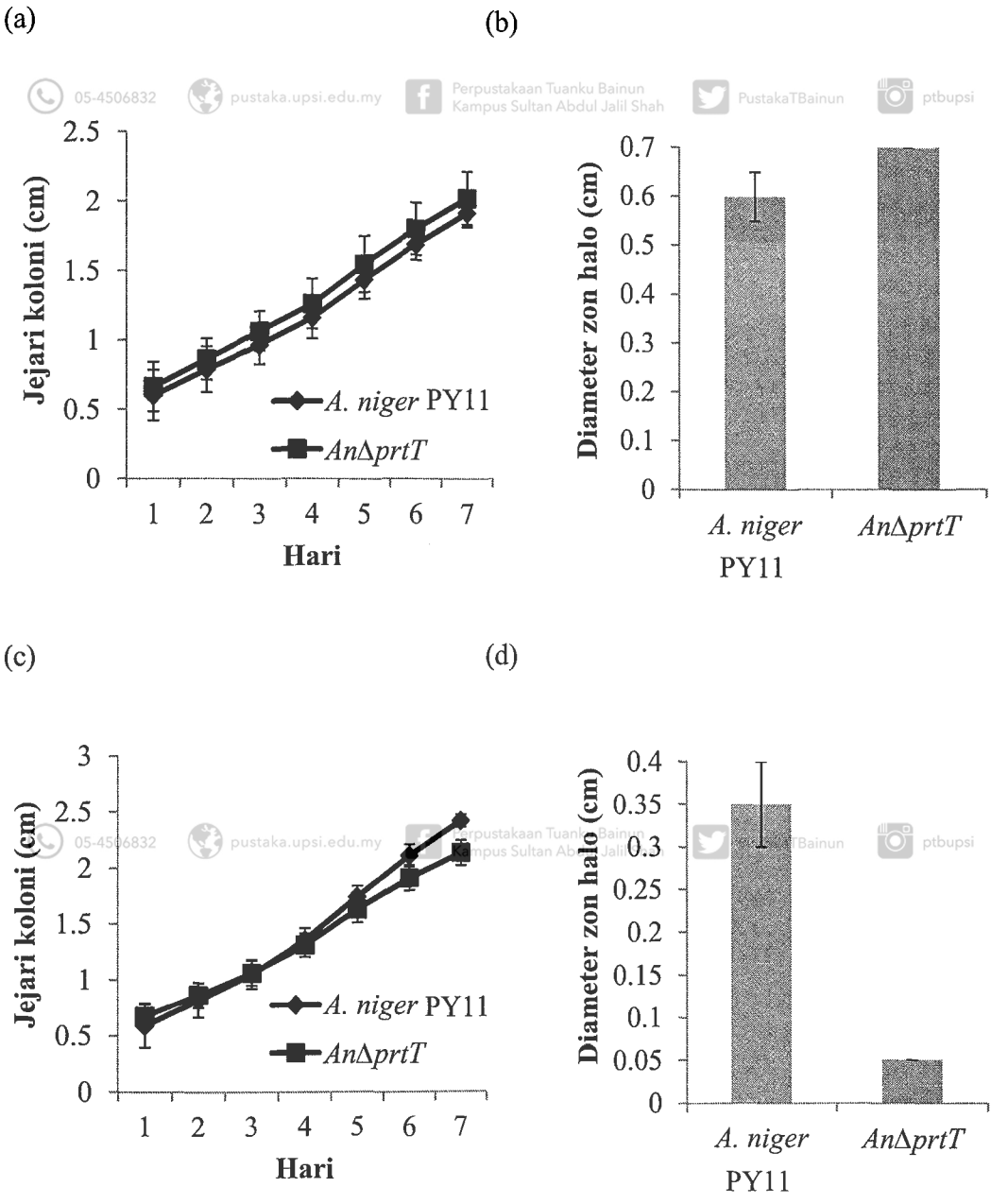
4.3.4 Pengasaian aktiviti enzim secara kualitatif dan kuantitatif

Aktiviti perembesan protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* ditentukan secara kualitatif di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kanji 1% (j/i). Berdasarkan ukuran jejari koloni yang diukur setiap hari, pertumbuhan *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* didapati setara (Rajah 4.5a). Setelah hari ketujuh, diameter zon 'halo' yang terbentuk di sekeliling koloni bagi kedua-dua strain juga didapati hampir sama (Rajah 4.5b). Ini menunjukkan bahawa pengekspresan enzim-enzim yang terlibat dalam hidrolisis kanji seperti amilase dan α-glukosidase oleh *An*Δ*prtT* tidak terjejas akibat penyahaktifan gen *prtT*.

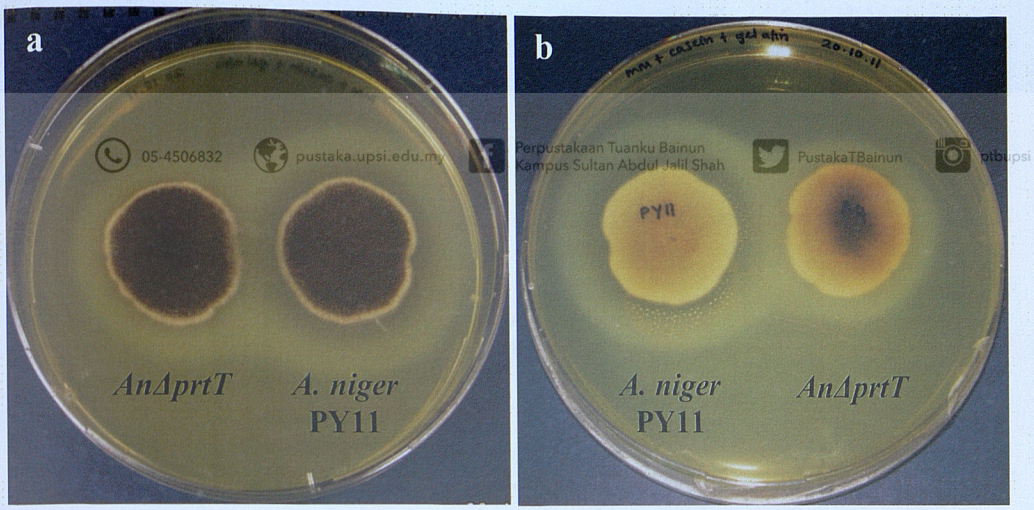
Selain itu, asai aktiviti proteolitik protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* turut dilakukan. Walaupun kadar pertumbuhan koloni *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kasein 1% (j/i) dan gelatin 1% (j/i) adalah setara (Rajah 4.5c), namun, *An*Δ*prtT* jelas mempamerkan fenotip mutan berdasarkan pengurangan diameter zon 'halo' di sekeliling koloninya berbanding *A. niger* PY11 (Rajah 4.5d). Rajah 4.6 menunjukkan saiz zon 'halo' di sekeliling koloni *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* pada hari ke-7. Hasil ini mencadangkan bahawa fenotip yang ditunjukkan oleh *An*Δ*prtT* adalah disebabkan oleh gangguan yang telah berlaku pada gen *prtT*.

Bagi mengesahkan hasil yang diperoleh daripada pengasaian aktiviti proteolitik ekstra sel secara kualitatif ini, pengasaian secara kuantitatif pula dilakukan. *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* dikultur secara berasingan selama 6 hari dalam kaldu medium minimum (MM) yang mengandungi bran gandum 3% (j/i)

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 4.5 Pencuraian kanji dan aktiviti proteolitik *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* (a) Pertumbuhan koloni *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* di atas agar MM yang mengandungi kanji 1% (j/i). (b) Diameter zon 'halo' yang terbentuk pada hari ke-7 untuk penentuan pencuraian kanji apabila *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* dihidupkan di atas agar MM yang mengandungi kanji 1% (j/i). (c) Pertumbuhan koloni *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* di atas agar MM yang mengandungi kasein 1% (j/i) dan gelatin 1% (j/i). (d) Diameter zon 'halo' yang terbentuk pada hari ke-7 untuk penentuan aktiviti proteolitik apabila *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* dihidupkan di atas agar MM yang mengandungi kasein 1% (j/i) dan gelatin 1% (j/i). Data eksperimen ditunjukkan dalam min ± sisihan piawai.



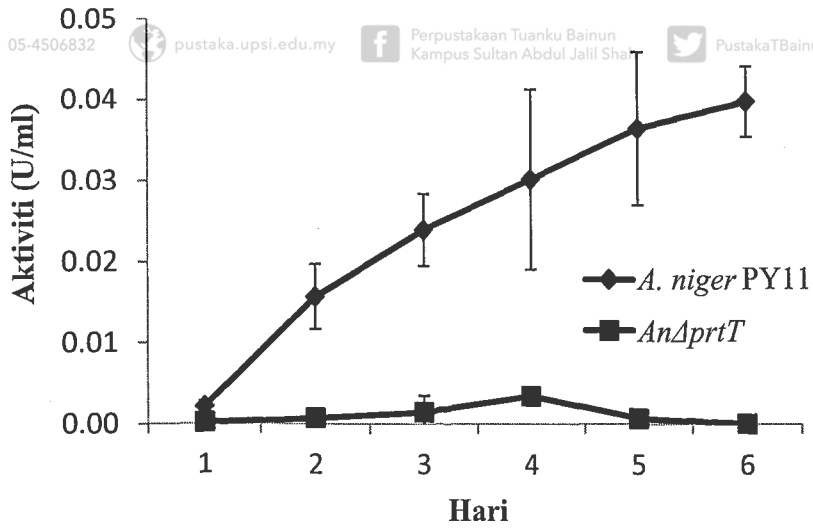
Rajah 4.6 Aktiviti proteolitik ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* di atas agar medium minimum (MM) yang mengandungi kasein 1% (j/i) dan gelatin 1% (j/i) ditunjukkan melalui pembentukan zon 'halo' disekeliling koloni kulat
(a) Pandangan daripada atas piring (b) Pandangan daripada bawah piring. Gambar diambil pada hari ke-7 pengkulturan.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

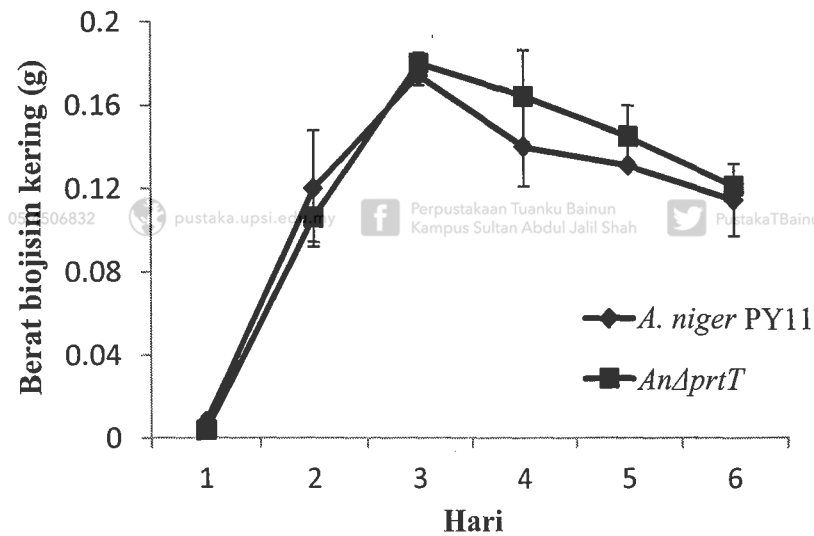
untuk mengaruh penghasilan protease. Protein ekstrak kasar bagi setiap kultur dituai pada setiap 24 jam dan pengasaian aktiviti protease ekstra sel dilakukan sejurus penuaian dilakukan mengikut kaedah van den Hombergh et al. (1995) dengan sedikit modifikasi. Aktiviti protease ditentukan berdasarkan hidrolisis BSA yang digunakan sebagai substrat. Aktiviti protease ekstra sel bagi *A. niger* PY11 menunjukkan peningkatan secara linear sepanjang 6 hari pengkulturan dengan mencecah 0.04 U/mL pada hari ke-6. Berbanding *A. niger* PY11, aktiviti protease ekstra sel *AnΔprtT* kekal pada tahap yang rendah (Rajah 4.7a).

Seterusnya, analisis profil pertumbuhan *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* dilakukan. Kedua-dua strain dikultur secara berasingan dalam kaldu medium minimum (MM) selama 6 hari. Lengkung pertumbuhan kedua-dua strain dijana berdasarkan berat biojisim kering kultur yang dituai setiap hari. Pertumbuhan *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* didapati setara dan ini membuktikan penyahaktifan gen *prtT* tidak memberi kesan terhadap pertumbuhan *A. niger* (Rajah 4.7b).

(a)



(b)



Rajah 4.7 Lengkung pertumbuhan dan aktiviti proteolitik protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*
(a) Aktiviti proteolitik protein ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*. Strain dikultur dalam MM yang mengandungi glukosa 1% (j/i) dan bran gandum 3% (j/i) dengan goncangan selama 6 hari pada suhu 30°C. Supernatan dieram bersama BSA dan peptida terlarut yang terbebas dipantau melalui kaedah pengesanan kolorimetrik (pada panjang gelombang 655 nm) menggunakan reagen Folin dan Ciocalteu. Graf yang ditunjukkan mewakili dua eksperimen yang dilakukan secara berasingan dan data eksperimen ditunjukkan dalam min ± sisihan piawai. (b) Pertumbuhan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11. Strain dikultur dalam MM yang mengandungi glukosa 1% (j/i) dengan goncangan selama 6 hari pada suhu 30°C. Biojisim kulat ditapis, dibilas, dikeringkan dan ditimbang.

4.4 PERBINCANGAN

A. niger PY11 yang digunakan dalam kajian ini memiliki kualiti yang baik sebagai hos pengekspresan bagi protein heterolog. Ini kerana protein ekstra sel utama seperti glukoamilase A (*glaA*) dan β-glukosidase A (*bglA*) telah dinyahaktifkan dalam strain ini (Reginald Storms, komunikasi peribadi). Penyahaktifan glukoamilase A (*glaA*) dan β-glukosidase A (*bglA*) ternyata mengurangkan kesesakan perembesan (*secretion trafficking*) dalam *A. niger*, dan ini telah meningkatkan tahap penghasilan protein heterolog. Namun begitu, walaupun dapat dirembes dengan baik, protein heterolog *A. niger* PY11 masih mengalami masalah degradasi yang disebabkan oleh protease homolog (Reginald Storms, komunikasi peribadi). Maka, strategi yang dipilih untuk mengatasi masalah protease ini adalah dengan menyahaktifkan faktor transkripsi yang mengawal atur pengekspresan protease ekstra sel utama dalam *A. niger*. Justeru dalam kajian ini, gen *prtT* yang mengekod faktor transkripsi famili Zn(II)2Cys6 kulat telah dinyahaktif dalam *A. niger* PY11. Seterusnya, mutan *An*Δ*prtT* yang terhasil telah dicirikan. Walaupun penyahaktifan gen *prtT* dalam *A. niger* telah dilakukan oleh Punt et al. (2008), tetapi *A. niger* PY11 mempunyai latar belakang strain yang berbeza dengan strain AB4.1 yang digunakan dalam kajian tersebut. Pemahaman berkenaan pengawalaturan pengekspresan protease ekstra sel ini amat penting bagi menambah baik keupayaan *A. niger* PY11 sebagai sistem pengekspresan hos yang efisien.

Dalam kajian ini, jujukan apitan 5' (~2.3 kb) dan 3' (~2.0 kb) gen *prtT* serta gen penanda *pyrG* (~3.5 kb) telah berjaya diamplifikasi secara berasingan. Ketiga-tiga produk PCR tersebut dicantumkan melalui pertindihan kawasan penyambung yang berkomplementari di antara satu sama lain untuk menghasilkan kaset gangguan yang lengkap bersaiz ~7.8 kb. PCR cantuman atau pertindihan adalah kaedah pantas untuk menjana kaset gangguan gen dengan jujukan apitan homolog yang bersaiz besar (Weld et al. 2006). Kaedah pembinaan kaset gangguan berasaskan PCR ini menjimatkan masa kerana tidak memerlukan langkah pengklonan dan produk PCR cantuman boleh terus digunakan untuk proses transformasi (Wendland 2003).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Terdapat empat kaedah utama yang biasa digunakan untuk transformasi genetik kulat berfilamen iaitu transformasi berperantarakan sferoplas, elektroporasi, biolistik dan transformasi berperantarakan *Agrobacterium* (Prabha & Punekar 2004). Transformasi *A. niger* PY11 dengan kaset gangguan *prtT* adalah berperantarakan sferoplas dan pengambilan masuk DNA menggunakan rawatan $CaCl_2$/PEG. Sferoplas disediakan daripada miselium yang muda melalui pencernaan dinding sel oleh enzim lisis. *A. niger* PY11 merupakan mutan *pyrG* (auksotrof uridina) yang memerlukan tambahan urasil dan uridina dalam medium pengkulturannya. Gen *pyrG* mengekod enzim ornitin dekarboksilase yang penting untuk biosintesis urasil dan seterusnya diperlukan untuk pembentukan uridina serta RNA (Melin et al. 2008). Pemilihan sferoplas tertransformasi dengan kaset gangguan adalah berdasarkan keupayaan transforman hidup di atas medium minimum (MM) yang mengandungi potassium klorida tanpa urasil dan uridina (prototrof uridina).

Secara umumnya, terdapat dua mekanisme yang membenarkan DNA yang diperkenalkan kepada genom kulat untuk mengintegrasi serta mereplikasi secara stabil iaitu: (i) rekombinasi homolog dan (ii) penyambungan hujung tanpa homolog. Proses penggantian gen memerlukan rekombinasi homolog berlaku pada lokus sasaran. Keefisienan rekombinasi homolog bergantung kepada saiz jujukan homologus yang hadir pada kaset gangguan (Prabha & Punekar 2004; Wendland 2003). Ini menyebabkan keefisienan proses integrasi jujukan sasaran ke dalam genom lebih rendah, memakan masa serta menjadikan manipulasi genom lebih sukar (Krappmann 2007). Berbanding dengan yis seperti *Saccharomyces cerevisiae*, kulat berfilamen didapati lebih banyak menggunakan mekanisme penyambungan hujung tanpa homolog berbanding rekombinasi homolog. Bagi *S. cerevisiae*, penyahaktifan gen berjaya dilakukan dengan hanya 35 bp jujukan apitan yang berhomolog dengan jujukan sasaran, berbanding kulat berfilamen yang memerlukan jujukan apitan bersaiz sekurang-kurangnya 1 kb untuk membolehkan rekombinasi homolog yang diharapkan berlaku (Hynes 1996; Wach et al. 1994). Dalam kajian ini, jujukan apitan 5' (2.3 kb) dan 3' (2.0 kb) gen *prtT* yang bersaiz melebihi 1 kb digunakan untuk meningkatkan keefisienan berlakunya proses rekombinasi homolog dalam *A. niger* PY11.

Sebahagian daripada gaya hidup saprofitisme boleh dicirikan melalui mod penyerapan nutrien yang melibatkan degradasi ekstra sel substrat polimer yang berada disekeliling serta pengambilan masuk produk pencernaan oligomerik ke dalam sel. Bagi degradasi ekstra sel substrat polimer, pelbagai enzim hidrolisis diekspres dan dirembes ke persekitaran (Bergmann et al. 2009). Antaranya enzim yang memainkan peranan utama adalah protease. Ini boleh ditunjukkan melalui bilangan gen protease yang dikodkan oleh genom *A. niger* iaitu hampir 200 gen (Pel et al. 2007). Penyahaktifan *prtT* menyebabkan penurunan aktiviti protease ekstra sel yang signifikan berdasarkan pengurangan diameter zon 'halo' disekeliling koloni mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11 yang dihidupkan di atas agar MM yang mengandungi kasein dan gelatin. Pengasaian secara kuantitatif melalui degradasi BSA juga menunjukkan penurunan aktiviti protease ekstra sel yang ketara pada mutan *AnΔprtT* walaupun setelah diaruh dengan bran gandum 3% (j/i). Jelas, penyahaktifan *prtT* telah mengurangkan keupayaan *AnΔprtT* untuk mendegradasi BSA. Hasil ini selari dengan fenotip mutan *prtT A. oryzae* dan *A. fumigatus* (Punt et al. 2008; Sharon et al. 2009). Ini menunjukkan bahawa *prtT* merupakan pengaktif utama bagi pengekspresan protease ekstra sel dalam *A. niger*, *A. oryzae* dan *A. fumigatus*. Penghasilan protease diaruh oleh kehadiran substrat protein dalam medium pertumbuhan. Namun menurut Monod et al. (2009), aktiviti protease ekstra sel juga bergantung kepada pH medium pertumbuhan, kewujudan karbon, nitrogen dan sulfur serta kehadiran protein-protein ekstra sel. Sebagai contoh, pengekspresan protease aspartik dalam *A. niger* ditindas dengan kehadiran ammonia, glukosa dan pH beralkali (Jarai & Buxton 1994).

Tahap pengekspresan empat protease ekstra sel iaitu *pepA*, *pepB*, *pepD* dan *pepF* telah dianalisis dalam *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*. Keempat-empat protease ini diramal sebagai protein ekstra sel berdasarkan analisis *in silico* yang telah mengenal pasti jujukan isyarat peptida pada jujukan asid amino masing-masing. Pengekspresan *pepA*, *pepB* dan *pepF* didapati menurun dalam *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11. Menurut van den Hombergh et al. (1997a), protease asid PEPA dan PEPB masing-masing membentuk 84% dan 6% aktiviti proteolitik ekstra sel *A. niger*. Ini membuktikan peranan *prtT* sebagai faktor transkripsi yang utama. Penyahaktifan *pepA* menunjukkan penurunan degradasi prokimosin bovin serta peningkatan

pengekspresan taumatin daripada *Aspergillus awamori* (Berka et al. 1990; Moralejo et al. 2000). Gangguan terhadap kedua-dua gen *pepA* dan *pepB* pula menghasilkan peningkatan sebanyak 100% taumatin, iaitu sejenis protein yang digunakan sebagai pemanis dalam makanan (Moralejo et al. 2002). *Cpds* iaitu karboksipeptidase serina ekstra sel yang dipencilkan daripada *Aspergillus saitoi* dan *A. fumigatus* adalah homolog kepada *pepF A. niger*. Sebagaimana *A. niger*, tahap pengekspresan *pepF* juga menurun dalam mutan *prtT A. fumigatus* (Chiba et al. 1995; Sharon et al. 2009). *pepD* mengekod protease alkali serina yang berhomolog dengan *ALP1 A. fumigatus* dan *Alp1 A. oryzae* (Punt et al. 2008; Sharon et al. 2009) yang mana kedua-duanya dikawal atur oleh *prtT*. Namun dalam kajian ini, transkrip *pepD* tidak dapat dikesan dalam strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* sama ada dalam keadaan teraruh mahupun tidak teraruh. Hasil ini berbeza dengan hasil yang diperoleh oleh Punt et al. (2008) yang melaporkan bahawa sebagaimana *pepA*, *pepB* dan *pepF*, tahap pengekspresan *pepD* juga didapati menurun dalam mutan *prtT* berbanding strain induknya.

Pengawalaturan pengekspresan protease-bergantung *prtT* adalah berbeza-beza di kalangan *Aspergilli*. Contohnya dalam *A. niger*, tiga daripada empat protease yang dikawal atur oleh *prtT* (*pepA*, *pepB* dan *pepF*) mempunyai pH optimum berasid (van den Hombergh et al. 1997b). Namun, dalam *A. oryzae* penyahaktifan *prtT* menyebabkan penurunan pengekspresan *AlpA* (protease alkali) dan *Np1* (metaloprotease) yang masing-masing berhomologus dengan *Alp1* dan *mep* dalam *A. fumigatus* (Bergmann et al. 2009; Punt et al. 2008; Sharon et al. 2009). Kedua-dua ALP dan MEP bertanggungjawab bagi kebanyakan aktiviti proteolitik beralkali dalam beberapa spesies *Aspergillus* seperti *A. oryzae*, *A. nidulans* dan *A. fumigatus* (Jaton-Ogay et al. 1994; Lehmbeck 2001; VanKuyk et al. 2000). Walaupun didapati aruhan pengekspresan beberapa protease ekstra sel yang utama dikawal atur pada tahap transkripsi oleh *prtT*, namun pengawalaturan ini secara keseluruhannya tidak menyeluruh. Ini kerana terdapat juga gen-gen protease yang tidak dikawal atur oleh *prtT* seperti sedolisin, *sedB* dan dipeptidil-peptidase, *dppV A. fumigatus* (Bergmann et al. 2009).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

4.5 KESIMPULAN

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kaset gangguan yang mengandungi gen penanda *pyrG* dengan diapit oleh jujukan 5' dan 3' gen *prtT* telah berjaya dibina menggunakan strategi yang berasaskan PCR. *A. niger* PY11 telah berjaya ditransformasi dengan kaset gangguan gen *prtT* dan integrasi kaset gangguan tersebut di dalam genom transforman disahkan melalui analisis PCR dan pemblotan Southern. Analisis transkripsi berbalik menunjukkan bahawa tahap pengekspresan *pepA*, *pepB* dan *pepF* dalam mutan *AnΔprtT* didapati berkurangan berbanding *A. niger* PY11 sama ada dalam keadaan yang teraruh atau tidak teraruh. Walau bagaimanapun, gen *pepD* didapati tidak teraruh dalam kedua-dua keadaan. *AnΔprtT* juga menunjukkan fenotip mutan apabila aktiviti protease ekstra selnya 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.

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

BAB V

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

5.1 PENGENALAN

Proteomik merupakan komponen penting dalam pendekatan sistem biologi yang mana matlamatnya adalah untuk mencirikan kelakuan sesuatu sistem berbanding kelakuan sesuatu komponen sahaja. Pengukuran tahap mRNA seperti melalui kaedah mikroatur DNA, tidak dapat memberi tahu tentang tahap pengekspresan sesuatu protein dalam sel serta kelakuan pengawalaturannya. Ini kerana tahap pengekspresan protein tidak selalu berkait langsung dengan tahap mRNA disebabkan pelbagai faktor seperti modifikasi pos-translasi dan modifikasi lain yang disebabkan oleh agen persekitaran. Protein bertanggungjawab untuk penghasilan tenaga, sebagai struktur, terlibat dalam komunikasi, pergerakan serta pembahagian sel. Maka sebab itu, kajian proteomik penting untuk mendapatkan pemahaman yang komprehensif bagi sistem biologi (Karpievitch et al. 2010; Zhang et al. 2010).

Proteomik berasaskan kromatografi cecair-spektrometri jisim yang menggunakan pendekatan bawah ke atas (*bottom up*) melibatkan campuran kompleks protein dicernakan dengan enzim untuk menghasilkan peptida terlebih dahulu sebelum dianalisis menggunakan spektrometri jisim. Maklumat protein seperti pengenalpastian dan kuantifikasi disimpulkan daripada peptida yang dikesan. Pendekatan alternatif bagi bawah ke atas (*bottom up*) adalah pendekatan atas ke bawah (*top down*) di mana ion molekul protein yang masih utuh diperkenalkan kepada spektrometri jisim dan diikuti dengan fragmentasi fasa-gas (Zhang et al.

2010). Walau apa pun pendekatan yang digunakan, cabaran asas dalam analisis data proteomik yang berasaskan spektrometri jisim adalah pengenalpstian protein yang ada dalam sampel dan kuantifikasi tahap kelimpahan (*abundance*) protein tersebut (Karpievitch et al. 2010).

Langkah pertama dalam pengenalpastian protein adalah pengenalpastian komponen peptida. Ini dilakukan dengan membandingkan ciri-ciri yang diperoleh daripada komponen peptida dengan pangkalan data yang mengandungi peptida yang diketahui secara teori atau telah dikenal pasti sebelumnya. Dalam spektrometri jisim selari, ion prekursor yang berkemungkinan sepadan kepada peptida dipilih pada MS^1 untuk fragmentasi selanjutnya dalam MS^2. Spektrum terfragmenatasi akan dibandingkan dengan spektrum yang telah difragmentasi secara *in silico* dalam pangkalan data menggunakan perisian seperti SEQUEST atau Mascot (Eng et al. 1994; Perkins et al. 1999). Alternatifnya, alat spektrometri jisim yang beresolusi tinggi boleh digunakan untuk mendapatkan pengukuran jisim yang sangat tepat dan dibandingkan dengan pengukuran jisim dalam pangkalan data peptida dengan tahap keyakinan yang tinggi melalui MS/MS menggunakan perisian yang sama seperti di atas (Pasa-Tolic et al. 2004). Matlamat proses pengenalpastian secara umumnya adalah untuk mengenal pasti sebanyak mungkin protein di samping mengawal bilangan jumlah pengenalpastian yang salah pada tahap yang boleh diterima (Karpievitch et al. 2010).

Pendekatan kuantifikasi protein relatif tanpa-label merupakan salah satu kaedah yang popular kerana disokong oleh reka bentuk penyelidikan yang baik serta pengesahan statistik yang boleh diaplikasi untuk menganggarkan tahap kelimpahan (*abundance*) protein sama ada secara relatif atau mutlak (Lundgren et al. 2010; Nesvizhskii et al. 2007). Pendekatan untuk mendapatkan data kuantifikasi protein relatif melibatkan penggunanan piawai dalaman (*internal standard*) yang diketahui kepekatannya dan dimasukkan ke dalam sampel peptida (Gerber et al. 2003; Yates et al. 2009). Dua kaedah pengukuran yang utama bagi kuantifikasi protein relatif tanpa-label adalah melalui pengiraan spektrum dan pengukuran intensiti (atau bahagian puncak) ion M/S (Xie et al. 2011). Kuantifikasi tanpa-label berasaskan intensiti ion M/S menggunakan kromatografi cecair-spektrometri jisim (LC-M/S) yang

mempunyai resolusi yang tinggi dan ketepatan jisim yang tinggi untuk menganalisis setiap sampel individu. Peptida dikenal pasti dengan memadankan jisim yang tepat dan ciri masa elusi yang dinormalisasi, kepada pangkalan data rujukan peptida. Melalui penjajaran tepat ciri LC-M/S yang dikesan (seperti masa penahanan dan nilai m/z) pada seluruh analisis yang berbeza, profil elusi kromatografi sesuatu peptida yang dikenal pasti boleh dibandingkan di antara sampel-sampel yang berbeza untuk kuantifikasi relatif (Xie et al. 2011).

Kulat diketahui boleh menghasilkan protease asid, neutral, alkali dan metalo (Nirmal et al. 2011). Protease kulat aktif dalam julat pH yang luas (pH 4 hingga 11) dan juga mempamerkan kespesifikan substrat yang luas (Rao et al. 1998). Komposisi protein ekstra sel menunjukkan perbezaan yang ketara kerana bergantung kepada substrat karbon yang digunakan, berbanding komposisi protein intra sel yang tidak banyak dipengaruhi oleh substrat karbon (Lu et al. 2010). Protease ekstra sel berperanan untuk degradasi protein kepada peptida yang lebih kecil atau asid amino bagi membekalkan nutrien kepada sel apabila tiada sumber karbon atau nitrogen pilihan (Braaksma et al. 2009). Menurut Nirmal et al. (2011), protease dikelaskan berdasarkan: (1) asid amino kritikal yang diperlukan untuk fungsi katalitik (contohnya: protease serina); (2) pH optimum untuk aktiviti (contohnya: asid, alkali atau neutral); (3) tapak pemotongan (contohnya: aminopeptidase yang bertindak pada terminal N bebas rantai polipeptida atau karboksipeptidase yang bertindak pada terminal C rantai polipeptida).

Hasil kajian dalam Bab IV telah menunjukkan bahawa penyahaktifan gen yang mengekod faktor transkripsi *prtT* telah mengurangkan aktiviti protease ekstra sel dan menyebabkan penurunan tahap transkripsi beberapa protease ekstra sel. Bagi memahami proses ini pada tahap proteomik, pencirian protein ekstra sel daripada *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* dilakukan dalam bab ini.

5.2 PENYEDIAAN PROTEIN EKSTRA SEL *A. niger* PY11 DAN MUTAN *AnΔprtT*

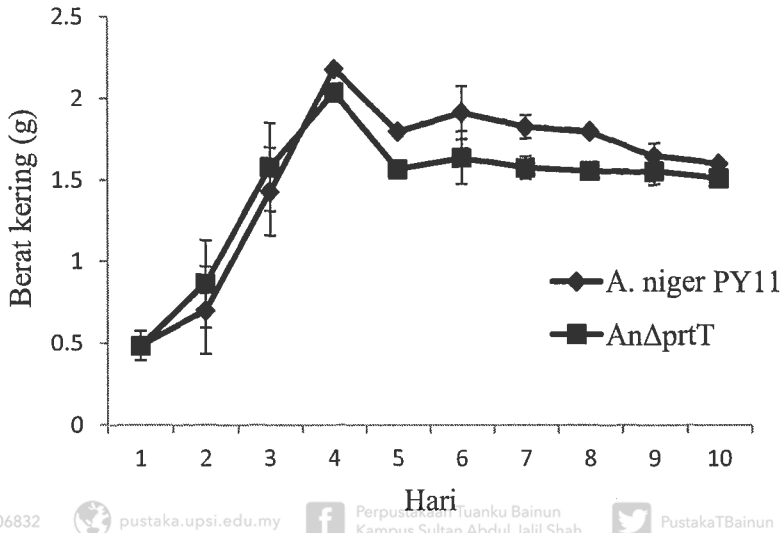
Miselium *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* telah dikultur dalam medium minimum yang mengandungi maltosa 15% (j/i) (MMJ) pada 30°C secara statik selama 10 hari.

Maltosa dipilih sebagai sumber karbon kerana selepas ini, kedua-dua strain akan digunakan sebagai hos pengekspresan untuk menghasilkan protein heterolog yang akan diletakkan di bawah kawalan promoter gen glukoamilase A (*Gla*Pr) (Bab VI). Promoter gen glukoamilase A (*Gla*Pr) diaruh dengan tinggi oleh maltosa. Kandungan maltosa sebanyak 15% (j/i) ditetapkan untuk penghasilan protein heterolog yang optimum (Reginald Storms, komunikasi peribadi). Pengkulturan strain dilakukan di dalam piring petri bersaiz 90 mm menggunakan sistem kultur cecair permukaan statik kerana sistem ini dapat menghasilkan biojisim yang lebih tinggi dan merembeskan protein yang lebih banyak berbanding kultur goncangan (Imanaka et al. 2010; Noh et al. 2012). Sistem ini juga menjimatkan tenaga dan kos kerana penggoncang tidak diperlukan.

Profil pertumbuhan *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* ditentukan berdasarkan berat kering biojisim kultur yang dituai setiap hari bagi memastikan tiada perbezaan dari segi pertumbuhan semasa protein ekstrak kasar dituai. Rajah 5.1 menunjukkan profil pertumbuhan yang setara di antara *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT*. Protein ekstrak kasar diambil daripada hari ke-5 hingga ke-9. Analisis sekretom dilakukan ke atas protein ekstrak kasar bagi lima hari berturut-turut kerana protease yang berbeza mungkin dirembes pada masa yang berbeza. Sekiranya analisis dilakukan untuk satu hari sahaja, berkemungkinan terdapat protease tertentu yang dirembeskan lebih lambat daripada protease lain tidak dapat dikenal pasti. Protein ekstrak kasar dipekatkan melalui penurasan ultra menggunakan kolum pengempar Vivaspin 10 kDa. Penurasan ultra juga bertujuan untuk menukar sistem penimbal sampel dan menyingkirkan protein kontaminan yang bersaiz kurang daripada 10 kDa.

Seterusnya, sebanyak 100 μg potein jumlah dicerna dengan tripsin emas, gred spektrometri jisim (Promega, USA) pada nisbah kepekatan 1:50 (tripsin:protein) (j/j) untuk menghasilkan peptida. Tripsin adalah protease serina yang memotong secara spesifik pada residu-residu lisina dan arginina pada bahagian karboksilik. Pengagihan residu lisina dan arginina dalam jujukan protein membolehkan pencernaan tripsin untuk menghasilkan peptida yang mempunyai jisim molekul yang dapat dianalisis oleh spektrometri jisim (www.promega.com/). Peptida tercerna diasingkan dengan kromatografi cecair berprestasi ultra-pengionan elektrosemburan nano aliran-

spektrometri jisim selari (UPLC-nanoESI-MS/MS). Kuantiti peptida tercerna yang sama (500 ng) di gunakan dalam analisis UPLC-nanoESI-MS/MS bagi kedua-dua strain. Sebanyak tiga sampel biologi yang berbeza dianalisis bagi setiap strain. Setiap sampel biologi tersebut dianalisis sebanyak tiga kali (triplikat). Fosforilase B tercerna (125 fmol) digunakan sebagai piawai dalaman (*internal standard*).



05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Rajah 5.1 Profil pertumbuhan *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* yang dikultur dalam medium MMJ pada 30°C secara statik selama 10 hari

5.3 PERBANDINGAN SEKRETOM ANTARA *A. niger* PY11 DENGAN MUTAN *AnΔprtT* MELALUI ANALISIS KROMATOGRAFI CECAIR BERPRESTASI ULTRA-PENGIONAN ELEKTROSEMBURAN NANO ALIRAN- SPEKTROMETRI JISIM SELARI (UPLC-nanoESI-MS/MS)

Data spektrometri jisim selari (MS/MS) dipadankan dengan jujukan genom *A. niger* daripada JGI (http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html) untuk mengenal pasti identiti protein yang hadir dalam sampel protein yang dianalisis. Pemprosesan data tersebut dilakukan menggunakan perisian Identity^{E} daripada ProteinLynx Global Server (PLGS versi 2.4). Analisis protein ekstra sel daripada ampaian kultur *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* berjaya mengenal pasti masing-masing antara 71 hingga 89 dan 39 hingga 64 protein bagi kelima-lima hari (Jadual 5.1). Oleh kerana analisis ini melibatkan protein ekstra sel, kehadiran isyarat peptida pada setiap protein yang diperoleh diramal menggunakan tiga perisian yang berbeza iaitu SignalP (v 4.1)

(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), Phobius (www.phobius.sbc.su.se/) dan TMMHMM (v .2.0) (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/). Jadual 5.1 juga menunjukkan bilangan protein yang diramalkan mempunyai isyarat peptida daripada *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* bagi sampel hari ke-5 hingga 9. Protein dianggap mempunyai isyarat peptida sekiranya diramalkan oleh sekurang-kurangnya dua daripada tiga perisian yang digunakan. Protein yang tidak dapat dikesan jujukan isyaratnya peptidanya, dianggap sebagai protein intra sel. Oleh kerana kajian ini tidak menganalisis protein intra sel, maka mungkin protein-protein tersebut terbebas disebabkan oleh lisis sel. Protein yang diramalkan tidak mempunyai isyarat peptida, tetapi hadir secara konsisten dalam sampel-sampel yang berbeza juga diambil kira di dalam analisis ini.

Jadual 5.1 Ramalan kehadiran isyarat peptida pada protein yang dikenal pasti daripada *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9

Sampel	Strain	Jumlah protein yang dikenal pasti	Bilangan protein yang diramal mempunyai isyarat peptida	Bilangan protein yang diramal tanpa isyarat peptida
Hari ke-5	PY11	85	81	4
	AnΔprtT	63	61	2
Hari ke-6	PY11	84	83	1
	AnΔprtT	58	54	4
Hari ke-7	PY11	86	82	4
	AnΔprtT	64	57	7
Hari ke-8	PY11	71	69	2
	AnΔprtT	39	39	0
Hari ke-9	PY11	89	81	8
	AnΔprtT	50	49	1

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

5.3.1 Perbandingan Sekretom Antara Mutan *AnΔprtT* Dengan *A.niger* PY11 Pada Hari Ke-5

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

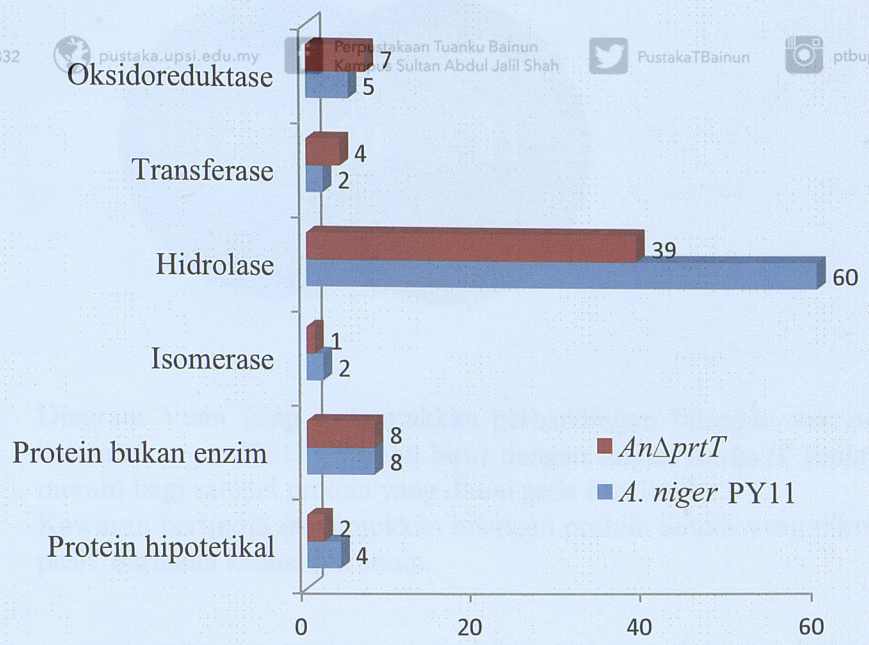
Analisis UPLC-nanoESI-MS/MS ke atas sampel hari ke-5 *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* telah berjaya mengenal pasti masing-masing sebanyak 85 dan 63 protein. Daripada jumlah tersebut, 81 dan 61 protein masing-masing bagi *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* diramalkan mempunyai isyarat peptida (Jadual 5.1). Anotasi protein dilakukan menggunakan perisian Blast2GO® (https://www.blast2go.com/). Protein ekstra sel kemudiannya dikelaskan mengikut kelas enzim. Berdasarkan taburan kelas enzim bagi protein yang dikesan pada hari ke-5, hidrolase merupakan kuantiti terbesar yang mewakili 74% bagi *A. niger* PY11 dan 64% bagi *AnΔprtT* berbanding kelas enzim lain seperti oksidoreduktase dan transferase (Rajah 5.2). Apabila diperincikan lagi enzim-enzim yang terdapat dalam kelas hidrolase, didapati perbezaan yang ketara adalah pada enzim yang bertindak pada ikatan peptida (E.C 3.4) di mana sebanyak 15 protease dikesan pada *A. niger* PY11 berbanding hanya 1 protease pada *AnΔprtT* (Rajah 5.3).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Rajah 5.4 menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara *A. niger* PY11 dengan mutan *AnΔprtT* bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-5. Perbandingan sekretom antara *A. niger* PY11 dengan mutan *AnΔprtT* mendapati sebanyak 50 protein merupakan protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain (Lampiran L, Jadual 1). Sebanyak 31 protein ditemui hanya pada *A. niger* PY11 dan daripada jumlah tersebut, sebanyak 14 protein merupakan protease (Lampiran M). Terdapat protease yang ditemui dalam kedua-dua strain, tetapi tiada protease unik yang hanya ditemui pada sampel mutan *AnΔprtT.*

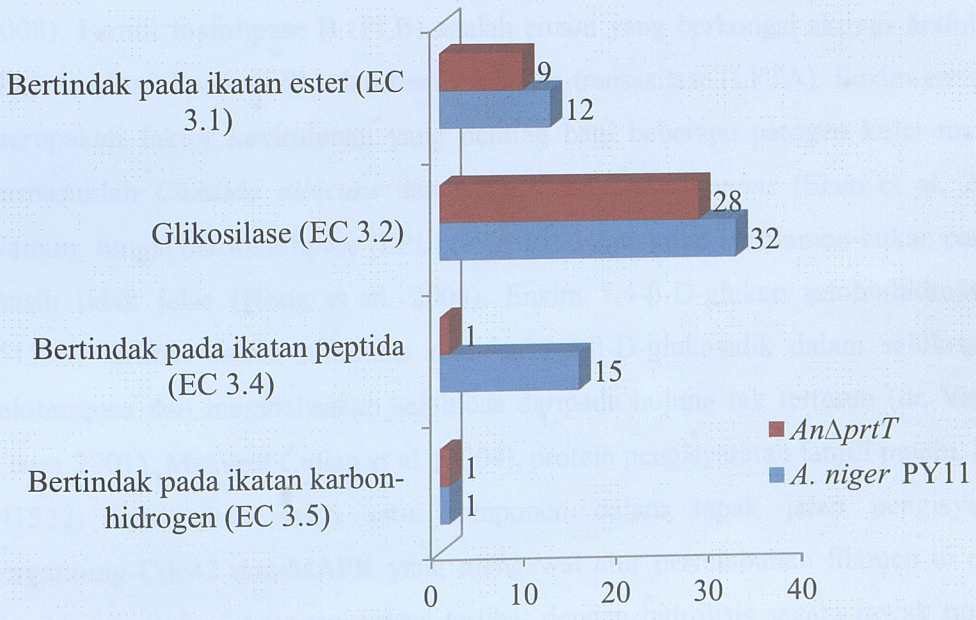
Selain itu, terdapat 11 protein ditemui hanya pada mutan *AnΔprtT* (Lampiran N). Protein-protein tersebut adalah peroksidase (198099), lisofosfolipase 1 (197915), 1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B (51773), protein pengisyaratan famili mucin, Msb2 (41522), manan endo-1,4-β-manosidase F (50378), 1,3-β-glukanosiltransferase, gel 1 (204301), glikosil hidrolase famili 43 (122978), protein famili α-1,2-manosidase (41807), lipase (53361), β-glukosidase M (210981) dan superoksida dismutase Cu/Zn sitosolik (38388). Peroksidase (198099) adalah kumpulan enzim

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.2 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-5 bagi *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

Rajah 5.3 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-5 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*



Rajah 5.4 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-5
Kawasan bertindih menunjukkan bilangan protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain.

oksidoreduktase yang memperantarakan pemindahan elektron daripada hidrogen peroksida (H_2O_2) dan peroksida organik kepada pelbagai penerima elektron (Choi et al. 2014). Biodegradasi lignin adalah proses oksidatif di mana pelbagai enzim oksidase dan peroksidase memainkan peranan yang penting (Adav et al. 2010). Lignin peroksidase (LiP) dan manganese peroksidase (MnP) adalah enzim yang efektif untuk kitar semula sumber karbon yang ada pada lignin (Hammel & Cullen 2008). Famili fosfolipase B (PLB) adalah enzim yang berkongsi aktiviti fosfolipase (PL), lisofosfolipase (LPL) dan lisofosfolipase-transasilase (LPTA). Enzim-enzim ini merupakan faktor kevirulenan yang penting bagi beberapa patogen kulat manusia termasuklah *Candida albicans* dan *Cryptococcus neoformans* (Shen et al. 2004). Namun, fungsi lisofosfolipase (LPL) (197915) dalam kulat berfilamen-bukan patogen masih tidak jelas (Hong et al. 2008). Enzim 1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B (51773) terlibat dalam hidrolisis rantaian 1,4-β-D-glukosidik dalam selulosa dan selotetraosa dan membebaskan selobiosa daripada hujung tak terturun (de Vries & Visser 2001). Menurut Cullen et al. (2004), protein pengisyaratan famili mucin, Msb2 (41522) merupakan salah satu komponen dalam tapak jalan pengisyaratan bergantung-Cdc42 dan-MAPK yang mengawal atur pertumbuhan filamen di dalam yis. Manan endo-1,4-β-manosidase terlibat dengan hidrolisis secara rawak rantaian 1,4-β-D-manosidik dalam manan, galaktomanan dan glukomanan (Adav et al. 2010). Menurut Braaksma et al. (2010), 1,3-β-glukanosiltransferase memainkan peranan yang penting dalam biosintesis dinding sel kulat. Zhou et al. (2009) telah mencirikan

α-1,2-manosidase ekstra sel daripada *Magnaporthe oryzae* dan mendapati polipeptida protein tersebut adalah glikoprotein yang mampu untuk menghidrolisis rantaian α-1,2 manobiosa. Gen yang mengekod α-1,2-manosidase diekspreskan semasa pertumbuhan *in vitro* dan semasa kolonisasi pada tanaman padi. Namun, penyahaktifan gen tersebut tidak memberi kesan terhadap kepatogenan *M. oryzae* (Zhou et al. 2009).

Seterusnya, analisis kuantifikasi dilakukan ke atas protein umum yang ditemui pada kedua-dua strain dengan melihat kepada nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* ke atas *A. niger* PY11 (*AnΔprtT* : PY11) (Lampiran L, Jadual 1). Pendekatan kuantifikasi protein relatif tanpa-label digunakan dalam kajian ini dan intensiti ion M/S (atau bahagian puncak) digunakan sebagai kaedah pengukuran. Analisis ini dilakukan dengan perisian Expression^{E} daripada ProteinLynx Global Server (PLGS versi 2.4). Set data diproses menggunakan algoritma tertentu untuk menentukan jisim yang tepat, intensiti, masa penahanan dan menganggarkan ketepatan masa bagi setiap spesies peptida yang dielusi daripada set data LC-MS. Hasilnya, signatur masa penahanan jisim yang tepat (*exact mass retention time-EMRT*) dijana bagi setiap spesies peptida yang dikesan. Bahagian puncak ion peptida dinormalisasi dengan kawalan rujukan iaitu fosforilase B tercerna (125 fmol). Kemudian, intensiti ion peptida dibandingkan di antara sampel untuk menentukan kelimpahan relatif (*relative abundance*) sesuatu protein (McKenna et al. 2004).

Nisbah pengekspresan (*AnΔprtT* : PY11) bagi 50 protein umum yang dikenal pasti pada kedua-dua strain dalam sampel hari ke-5 mendapati sebanyak 32 protein dikawal atur naik, 16 protein dikawal atur turun dan 2 protein tiada perubahan (Lampiran L, Jadual 1). Dalam kajian ini, sesuatu protein akan dikategorikan sebagai dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11 sekiranya nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11 adalah melebihi 1. Rajah 5.5 menunjukkan carta bar nisbah pengekspresan bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 pada sampel hari ke-5. Antara protein yang dikawal atur naik adalah triasilgliserol lipase A (210730) dengan nisbah pengekspresan (*AnΔprtT* : PY11) 19.7; glutaminase A (52460), 7.7; 1,3-β-



Rajah 5.5: Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-5

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

glukanosiltransferase (212716), 7.2 dan glukan 1,3-β-glukosidase A (202490), 4.0. Lipase (triasilgliserol hidrolase EC 3.1.1.3) merupakan salah satu enzim lipolitik yang memangkinkan hidrolisis ikatan ester trigliserida menjadi gliserol dan asid lemak (Falony et al. 2006). Enzim L-glutaminase (EC 3.5.1.2) adalah enzim amidohidrolase yang menghasilkan asid L-glutamik dan ammonia daripada L-glutamin. Glutaminase memainkan peranan yang penting dalam metabolisme nitrogen selular bagi prokariot dan eukariot (Nathiya et al. 2011). Glukan 1,3-β-glukosidase A (202490) juga dikenali sebagai ekso-1,3-β-glukanase A (EC 3.2.1.58), terlibat dalam biosintesis atau degradasi dinding sel (Adams et al. 2004). Glukan adalah salah satu daripada komponen kimia utama dinding sel *Aspergillus,* oleh itu 1,3-β-glukanosiltransferase (212716) juga memainkan peranan yang penting dalam biosintesis dinding sel kulat (Braaksma et al. 2010). Satu-satunya protease yang dikawal atur naik adalah endopeptidase aspartik, PEPAb (206384) dengan nisbah 3.4.

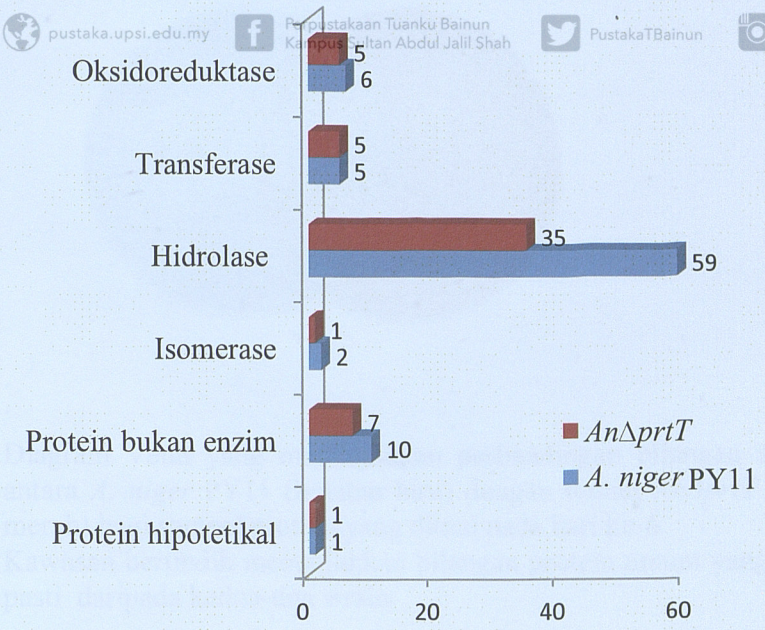
5.3.2 Perbandingan Sekretom Antara Mutan *AnΔprtT* Dengan *A. niger* PY11 Pada Hari Ke-6

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Pada sampel hari ke-6, analisis UPLC-nanoESI-MS/MS telah berjaya mengenal pasti sebanyak 84 protein daripada *A. niger* PY11 dan 58 protein daripada *AnΔprtT.* Daripada jumlah tersebut, 83 dan 54 protein diramalkan mempunyai isyarat peptida masing-masing bagi *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* (Jadual 5.1). Apabila dirujuk kepada taburan protein-protein tersebut mengikut kelas enzim, hidrolase didapati mendominasi sehingga 71% dan 65% masing-masing daripada keseluruhan sekretom *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-6 (Rajah 5.6). Di kalangan hidrolase, perbezaan yang jelas di antara *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* adalah pada bilangan enzim yang bertindak pada ikatan peptidase (E.C 3.4). Sebanyak 14 protease dikesan pada *A. niger* PY11 berbanding hanya 3 protease yang dikesan pada *AnΔprtT* (Rajah 5.7).

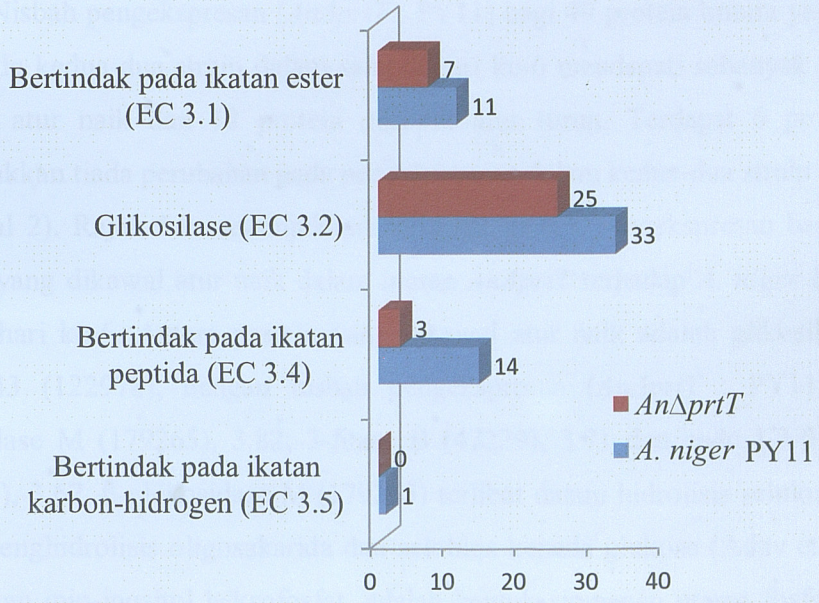
Perbandingan bilangan sekretom antara *A. niger* PY11 dengan mutan *AnΔprtT* bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-6 ditunjukkan pada Rajah 5.8. Sebanyak 49 protein umum dikenal pasti pada kedua-dua strain (Lampiran L, Jadual 2). Terdapat 34 protein ditemui hanya pada *A. niger* PY11 dan 14 daripadanya

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.6 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-6 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*

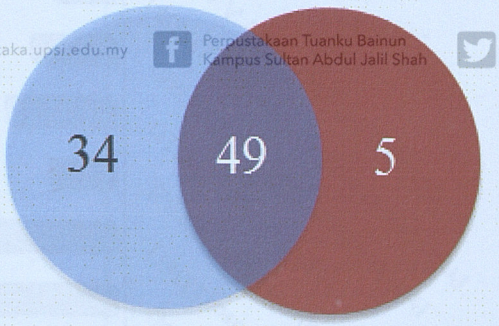
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Rajah 5.7 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-6 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.8 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-6
Kawasan bertindih menunjukkan bilangan protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain.

merupakan protease (Lampiran M). Sebanyak 5 protein ditemui hanya pada mutan *AnΔprtT* (Lampiran N) iaitu 1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B (51773), protein famili α-1,2-manosidase (41807), β-glukosidase M (210981), protease aspartik (41270) dan 1,3-β-glukanosiltransferase, gel2 (52629).

Nisbah pengekspresan (*AnΔprtT* : PY11) bagi 49 protein umum yang dikenal pasti pada kedua-dua strain dalam sampel hari ke-6 mendapati sebanyak 25 protein dikawal atur naik dan 18 protein dikawal atur turun. Terdapat 6 protein yang menunjukkan tiada perubahan pada pengekspresan dalam kedua-dua strain (Lampiran L, Jadual 2). Rajah 5.9 menunjukkan carta bar nisbah pengekspresan bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 pada sampel hari ke-6. Antara protein yang dikawal atur naik adalah glikosil hidrolase famili 43 (122978), dengan nisbah pengekspresan (*AnΔprtT* : PY11), 6.3; β-glukosidase M (179265), 3.82; 3-fitase B (47229), 3.71 dan endo-1,3-β-glukanase (170223), 3.67. β-glukosidase M (179265) terlibat dalam hidrolisis selulosa di mana ianya menghidrolisis oligosakarida dan selobios kepada glukosa (Adav et al. 2011). Fitate atau mio-inositol heksofosfat, adalah bentuk simpanan utama fosforus dalam makanan yang berasal daripada tumbuhan. Fitase adalah kumpulan spesifik fosfatase yang diperlukan untuk memulakan pembebasan fosforus daripada fitate (Han et al. 1999). Sebagaimana ekso-1,3-β-glukanase A (202490), endo-1,3-β-glukanase



Rajah 5.9: Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-6

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

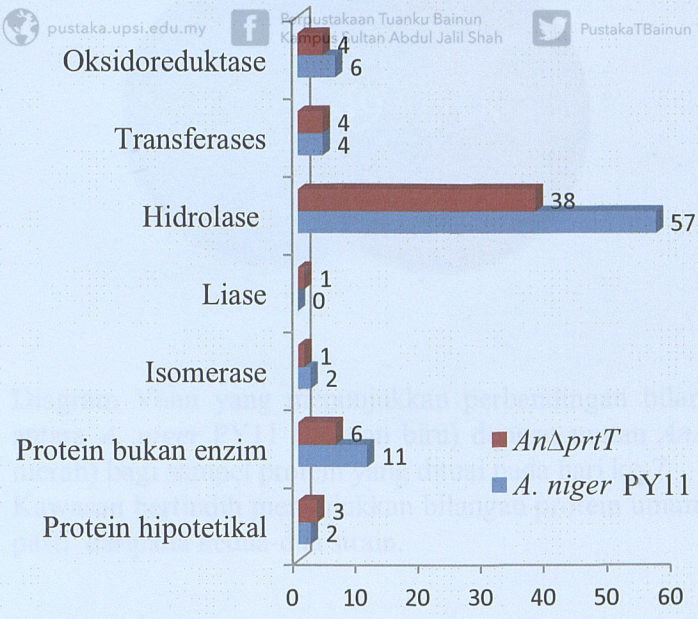
(170223) juga terlibat dalam biosintesis atau degradasi dinding sel (Adams et al. 2004). Terdapat dua protease yang turut meningkat pengekspresannya dalam *AnΔprtT* berbanding PY11 iaitu karboksipeptidase serina (54734), 6.89 dan endopeptidase aspartik, PEPAb (206384), 2.03.

5.3.3 Perbandingan Sekretom Antara Mutan *AnΔprtT* Dengan *A. niger* PY11 Pada Hari Ke-7

Analisis UPLC-nanoESI-MS/MS ke atas *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* bagi sampel hari ke- 7 masing-masing telah berjaya mengenal pasti sebanyak 86 dan 64 protein. Daripada jumlah tersebut, 82 dan 57 protein masing-masing bagi *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* diramal mempunyai isyarat peptida (Jadual 5.1). Sekretom kedua-dua strain kemudiannya dikelaskan mengikut kelas enzim. Berdasarkan taburan kelas enzim bagi protein yang dikesan pada hari ke-7, hidrolase merupakan kumpulan enzim terbesar yang mewakili 70% bagi *A. niger* PY11 dan 67% bagi *AnΔprtT* berbanding kelas enzim lain (Rajah 5.10). Setelah dibuat perbandingan di antara hidrolase yang ditemui pada *A. niger* PY11 dengan *AnΔprtT*, didapati terdapat perbezaan yang ketara pada bilangan enzim yang bertindak pada ikatan peptida (E.C 3.4). Sebanyak 14 protease dikesan pada *A. niger* PY11 berbanding hanya 2 protease pada *AnΔprtT* (Rajah 5.11).

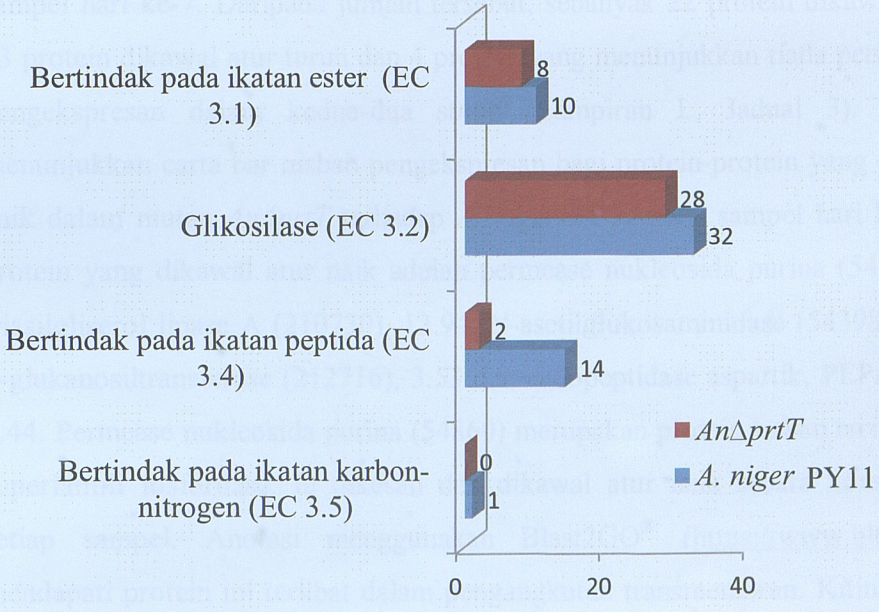
Sekretom *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-7 telah dibandingkan (Rajah 5.12). Sebanyak 49 protein umum dikenal pasti pada kedua-dua strain (Lampiran L, Jadual 3), Sebanyak 33 protein dikesan hanya pada *A. niger* PY11 (Lampiran M) manakala 7 protein hanya pada *AnΔprtT* (Lampiran N). Bilangan protease yang ditemui hanya pada *A. niger* PY11 adalah 14 (Lampiran M). Terdapat 7 protein yang ditemui hanya pada *AnΔprtT* iaitu lisofosfolipase 1 (197915), 1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B (51773), 1,3-β-glukanosiltransferase, gel2 (52629), endokitinase 1 (38015), prekursor glikoprotein FP21 (214072), rhamnogalakturonat liase B (47880) dan protein hipotetikal (43553) (Lampiran N). Struktur dinding sel kulat adalah dinamik dan sentiasa berubah semasa pembahagian sel, pertumbuhan dan morfogenesis. Dinding sel kulat adalah kompleks yang terdiri daripada kitin, glukan dan pelbagai polimer lain. Enzim hidrolitik seperti endokitinase (38015) terlibat dalam pencuraian dinding sel kulat (Adams et al. 2004). Rhamnogalakturonat

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.10 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-7 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.11 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-7 bagi *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

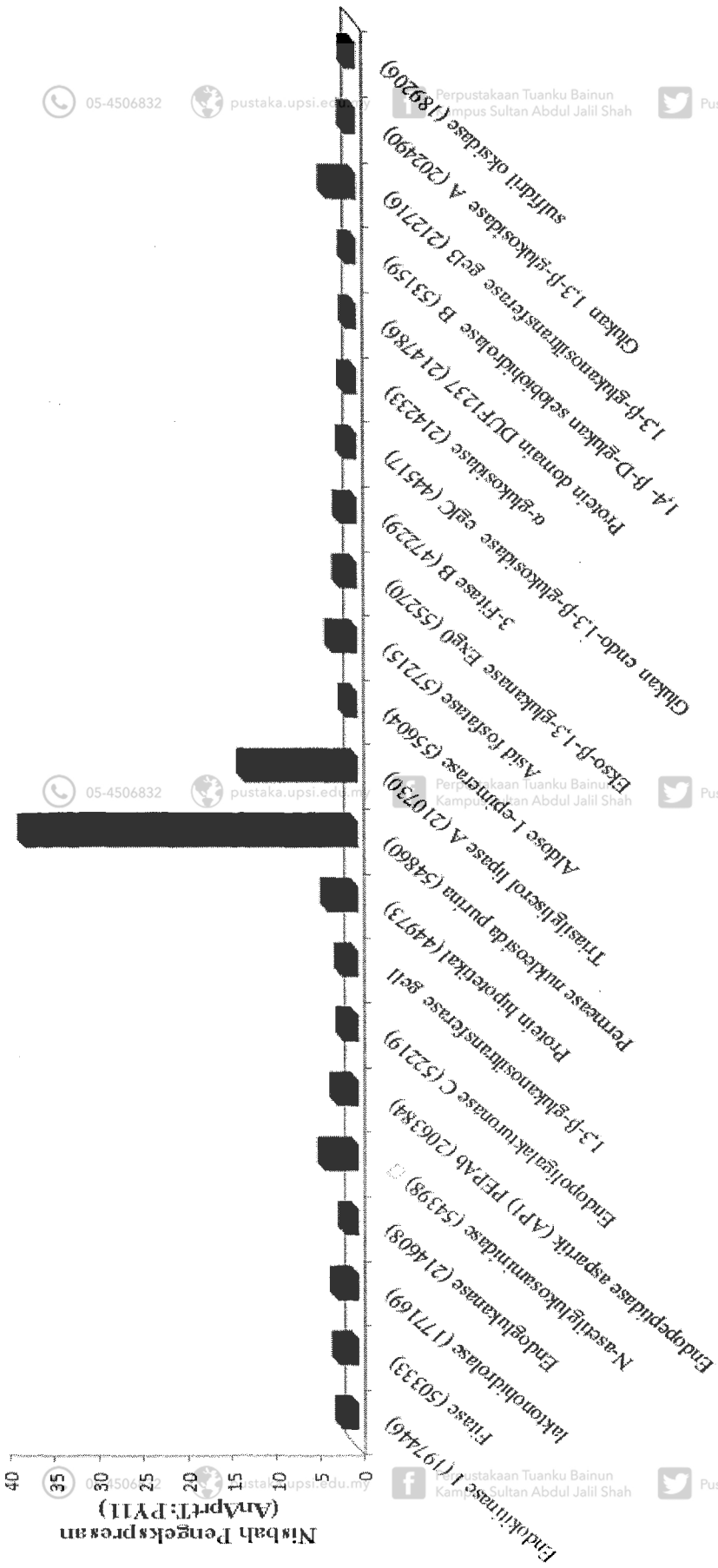


Rajah 5.12 Diagram Venn yang menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara *A. niger* PY11 (bulatan biru) dengan mutan *AnΔprtT* (bulatan merah) bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-7
Kawasan bertindih menunjukkan bilangan protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain.

liase B (47880) adalah enzim yang terlibat dengan degradasi pektin iaitu antara komponen utama dinding sel tumbuhan (van den Brink & de Vries 2011).

Sebanyak 49 protein umum yang dikenal pasti pada kedua-dua strain dalam sampel hari ke-7. Daripada jumlah tersebut, sebanyak 22 protein dikawal atur naik, 23 protein dikawal atur turun dan 4 protein yang menunjukkan tiada perubahan pada pengekspresan dalam kedua-dua strain (Lampiran L, Jadual 3). Rajah 5.13 menunjukkan carta bar nisbah pengekspresan bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 pada sampel hari ke-7. Antara protein yang dikawal atur naik adalah permease nukleosida purina (54860), 37.34; triasilgliserol lipase A (210730), 12.94; N-asetilglukosaminidase (54398), 3.86; 1,3-β-glukanosiltransferase (212716), 3.53 dan endopeptidase aspartik, PEPAb (206384) 2.44. Permease nukleosida purina (54860) merupakan protein bukan enzim di bawah superfamili fosforilase. Ia dikesan dan dikawal atur naik secara konsisten dalam setiap sampel. Anotasi menggunakan Blast2GO® (https://www.blast2go.com/) mendapati protein ini terlibat dalam pengangkutan transmembran. Kitin yang terdiri daripada biopolimer bagi N-asetilglukosamin (GlcNAc) merupakan salah satu daripada komponen dinding sel kulat. Banyak mikroorganisma mendegradasi kitin menggunakan enzim dengan dua langkah berturutan; degradasi kitin kepada GlcNAc oleh ekso- (EC 3.2.1.29) dan endo-kitinase (EC 3.2.1.14). Kemudian, hidrolisasi

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.13: Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-7

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

GlcNAc yang kebanyakannya ketobios kepada GlcNAc oleh N-asetilglukosaminidase (EC 3.2.1.30) (Kim et al. 2002).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

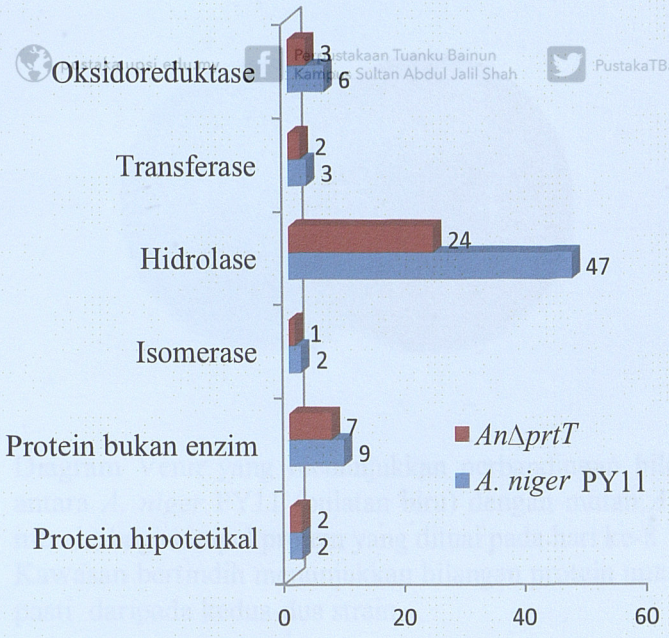
5.3.4 Perbandingan Sekretom Antara Mutan *AnΔprtT* Dengan *A. niger* PY11 Pada Hari Ke-8

Bagi sampel hari ke-8, analisis UPLC-nanoESI-MS/MS telah berjaya mengenal pasti sebanyak 71 protein daripada *A. niger* PY11 dan 39 protein daripada *AnΔprtT*. Sebanyak 69 protein daripada *A. niger* PY11 diramal mempunyai isyarat peptida dan begitu juga dengan kesemua 39 protein yang dikesan pada *AnΔprtT* (Jadual 5.1). Hidrolase merupakan kelas enzim yang terbesar bagi kedua-dua strain iaitu 68% bagi *A. niger* PY11 dan 62% bagi *AnΔprtT* (Rajah 5.14). Namun, terdapat perbezaan pada bilangan enzim yang bertindak pada ikatan peptidase di mana *A. niger* PY11 mencatatkan 10 protease manakala *AnΔprtT* hanya ada 1 protease (Rajah 5.15).

Perbandingan sekretom antara *A. niger* PY11 dengan mutan *AnΔprtT* pada hari ke-8 (Rajah 5.16) mendapati sebanyak 35 protein umum dikenal pasti pada kedua-dua strain. Sebanyak 34 protein ditemui hanya pada *A. niger* PY11 dan 4 protein ditemui hanya pada mutan *AnΔprtT*. Senarai protein umum yang dikenal pasti pada kedua-dua strain boleh didapati pada Lampiran L dalam Jadual 4. Senarai protein yang hanya dikesan pada *A. niger* PY11 ditunjukkan pada Lampiran M manakala senarai protein yang hanya dikesan pada *AnΔprtT* ditunjukkan pada Lampiran N. Terdapat 4 protein yang hanya ditemui pada *AnΔprtT* iaitu 1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B (51773), β–glukosidase M (179265), faktor transkripsi spesifik kulat (176123) dan glukan 1,3-β-glukosidase A (202490).

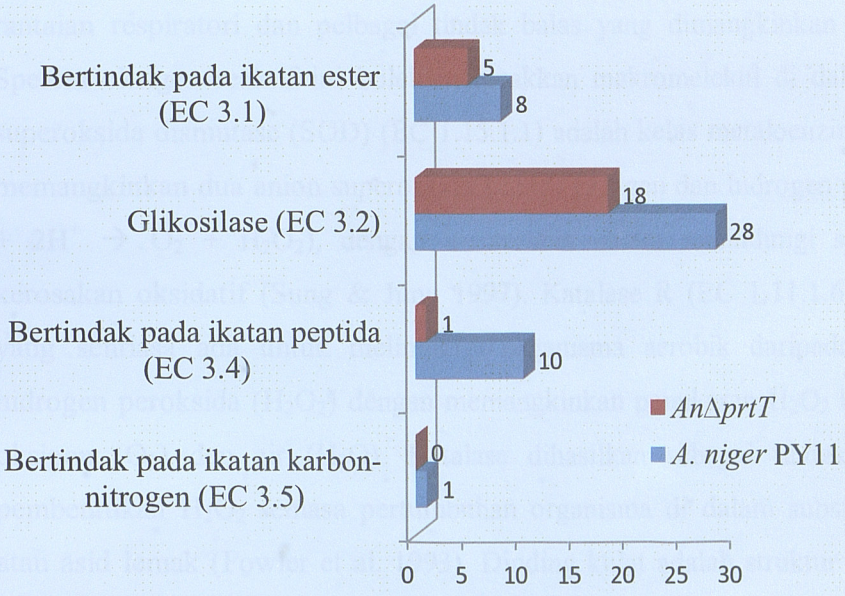
Nisbah pengekspresan (*AnΔprtT* : PY11) bagi 35 protein umum yang dikenal pasti pada kedua-dua strain dalam sampel hari ke-8 mendapati sebanyak 19 protein dikawal atur naik dan 3 protein dikawal atur turun. Terdapat 13 protein yang menunjukkan tiada perubahan pada pengekspresan dalam kedua-dua strain (Lampiran L, Jadual 4). Rajah 5.17 menunjukkan carta bar nisbah pengekspresan bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 pada sampel hari ke-8. Antara protein pada hari ke-8 yang dikawal atur naik adalah katalase R (55494) 7.69; protein galaktomano dinding sel kaya-serina-treonina

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.14 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-8 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*

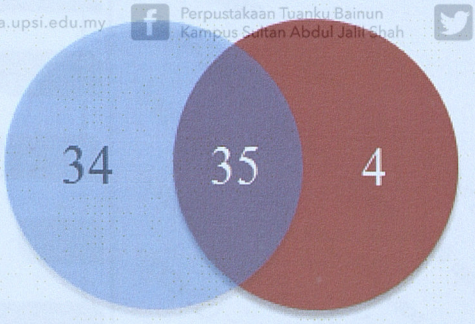
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun PustakaTBainun ptbupsi

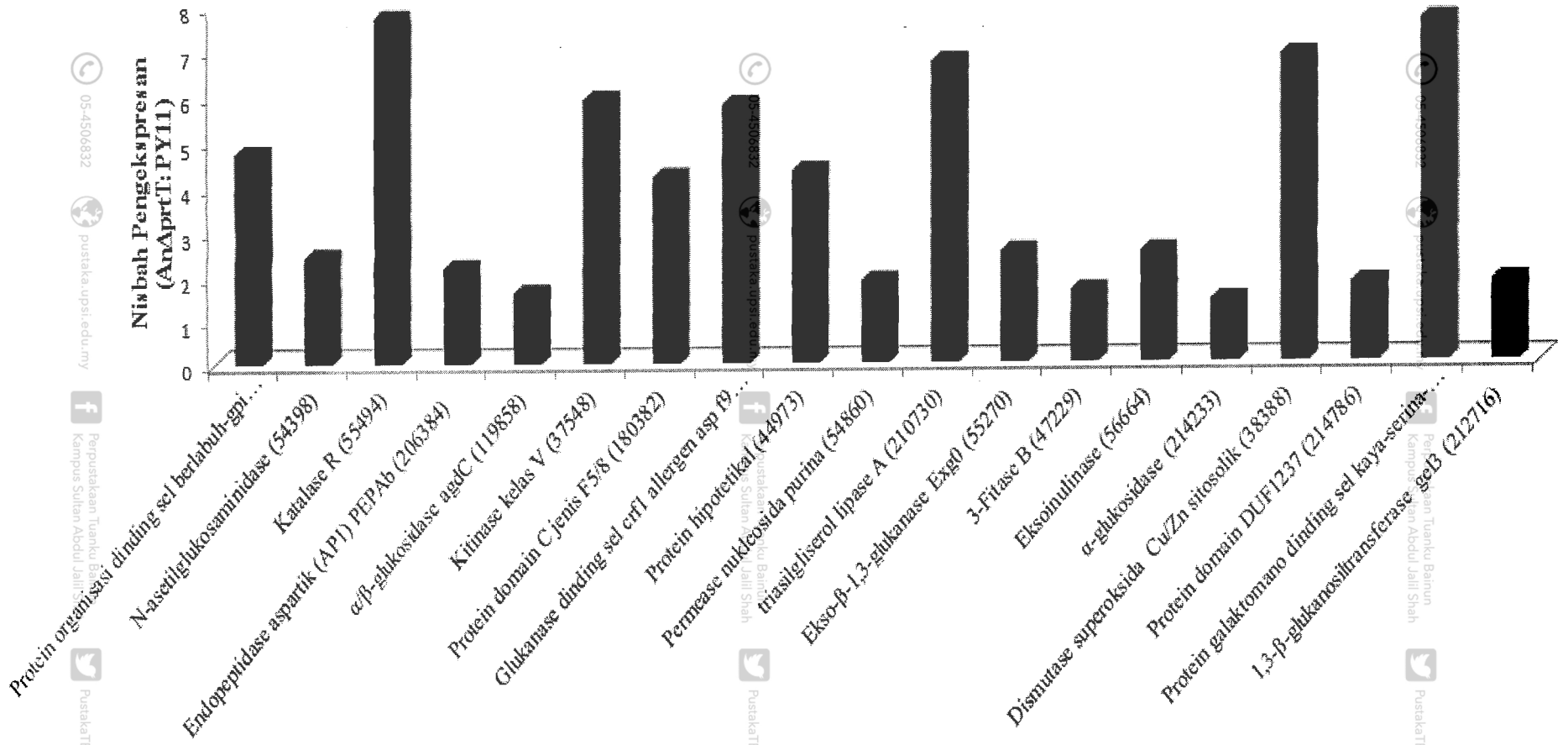
Rajah 5.15 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-8 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 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
Kawasan bertindih menunjukkan bilangan protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain.

(56553), 7.61; superoksida dismutase Cu/Zn sitosolik (38388), 6.82; triasilgliserol lipase A (210730), 6.69 dan kitinase kelas V (37548), 5.87). Beberapa spesies oksigen reaktif (H_2O_2, $.O_2$ dan .OH) terhasil sebagai produk sampingan yang tidak dapat dielakkan daripada proses pengangkutan-elektron seperti yang berlaku dalam rantaian respiratori dan pelbagai tindak balas yang dimangkinkan oleh oksidase. Spesies oksigen reaktif ini boleh merosakkan makromelekul di dalam sel. Cu/Zn superoksida dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) adalah kelas metaloenzim dimerik yang memangkinkan dua anion superoksida kepada oksigen dan hidrogen peroksida ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$), dengan itu terlibat dalam melindungi sel-sel daripada kerosakan oksidatif (Sung & Jung 1997). Katalase R (EC 1.11.1.6) adalah enzim yang sentiasa ada untuk melindungi organisma aerobik daripada kesan toksik hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan memangkinkan penukaran H_2O_2 kepada molekul oksigen (O_2) dan air (H_2O). Katalase dihasilkan sebagai tindak balas kepada pembentukan H_2O_2 semasa pertumbuhan organisma di dalam substrat karbohidrat atau asid lemak (Fowler et al. 1993). Dinding kulat adalah struktur kompleks yang terdiri daripada kitin, 1,3-β- dan 1,6-β-glukan, manan dan protein (Adams et al. 2004). Protein galaktomano dinding sel kaya-serina-treonina (56553) dan kitinase kelas V (337548) adalah protein yang berkaitan dengan pencuraian dinding sel. Protease yang dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* adalah endopeptidase aspartik, PEPAb (206384), 2.18.



Rajah 5.17: Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-8

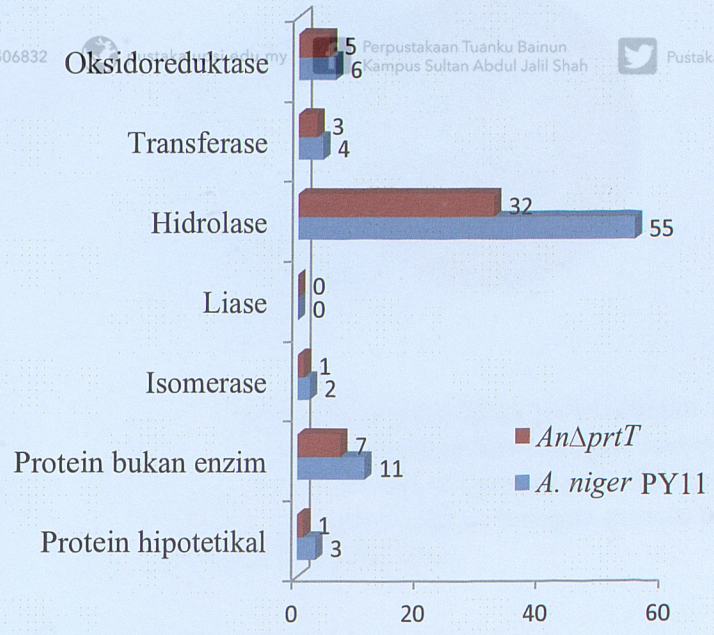
5.3.5 Perbandingan Sekretom Antara Mutan *AnΔprtT* Dengan *A. niger* PY11 Pada Hari Ke-9

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Analisis UPLC-nanoESI-MS/MS bagi sampel hari ke- 9 strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* telah mengenal pasti masing-masing sebanyak 89 dan 50 protein. Daripada jumlah tersebut, 81 dan 49 protein masing-masing bagi *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* diramalkan mempunyai isyarat peptida (Jadual 5.1). Setelah sekretom kedua-dua strain dikelaskan mengikut kelas enzim, didapati. hidrolase masih merupakan kumpulan enzim terbesar yang mewakili 68% bagi *A. niger* PY11 dan 65% bagi *AnΔprtT* berbanding kelas enzim lain (Rajah 5.18). Setelah dibuat perbandingan di antara hidrolase yang ditemui pada *A. niger* PY11 dengan *AnΔprtT*, didapati terdapat perbezaan yang ketara pada bilangan enzim yang bertindak pada ikatan peptida (E.C 3.4). Sebanyak 14 protease dikesan pada *A. niger* PY11 berbanding hanya 3 protease pada *AnΔprtT* (Rajah 5.19).

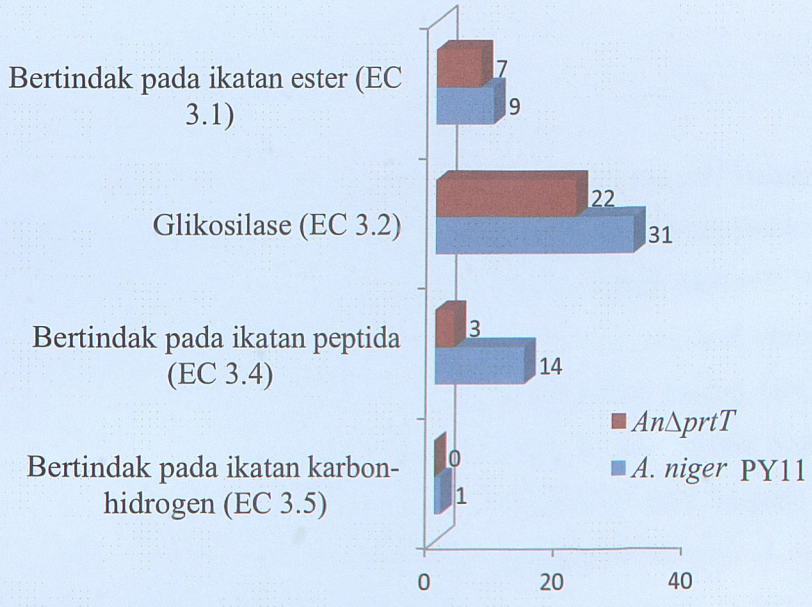
Sekretom *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-9 telah dibandingkan (Rajah 5.20). Sebanyak 44 protein umum dikenal pasti pada kedua-dua strain, 37 protein dikesan hanya pada *A. niger* PY11 manakala 5 protein hanya pada *AnΔprtT*. Senarai protein umum yang dikenal pasti pada kedua-dua strain boleh didapati dalam Jadual 5 pada Lampiran L. Senarai protein yang hanya dikesan pada *A. niger* PY11 bersama 14 protease yang turut dikenal pasti dalam sampel hari ke-9 ditunjukkan pada Lampiran M. Senarai protein yang hanya dikesan pada *AnΔprtT* adalah 1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B (51773), aminopeptidase Y (214665), peptidase-dipeptidil 5 (185799), asid fosfatase (57215) dan 6-fosfoglukonolaktonase (36022) (Lampiran N). Kedua-dua aminopeptidase dan peptidase-dipeptidil adalah jenis eksopeptidase. Aminopeptidase bertindak pada terminal N bebas dan membebaskan residu asid amino tunggal. Manakala, peptidase dipeptidil membebaskan dipeptida pada terminal N daripada rantaian polipeptida (Jisha et al. 2013).

Daripada 44 protein umum yang dikenal pasti pada kedua-dua strain dalam sampel hari ke-9, sebanyak 24 protein dikawal atur naik, 18 protein dikawal atur turun dan 2 protein yang menunjukkan tiada perubahan pada pengekspresan (Lampiran L, Jadual 5). Rajah 5.21 menunjukkan carta bar nisbah pengekspresan bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger*



Rajah 5.18 Carta bar taburan kelas enzim bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-9 bagi *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*

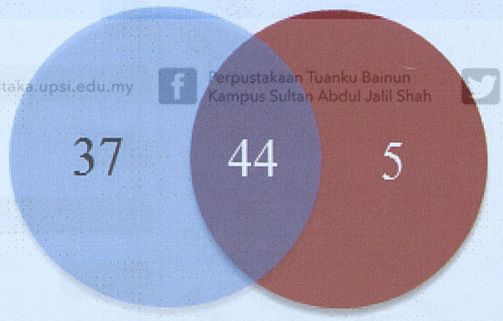
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 5.19 Carta bar taburan enzim hidrolase bagi protein yang dikenal pasti pada hari ke-9 bagi *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

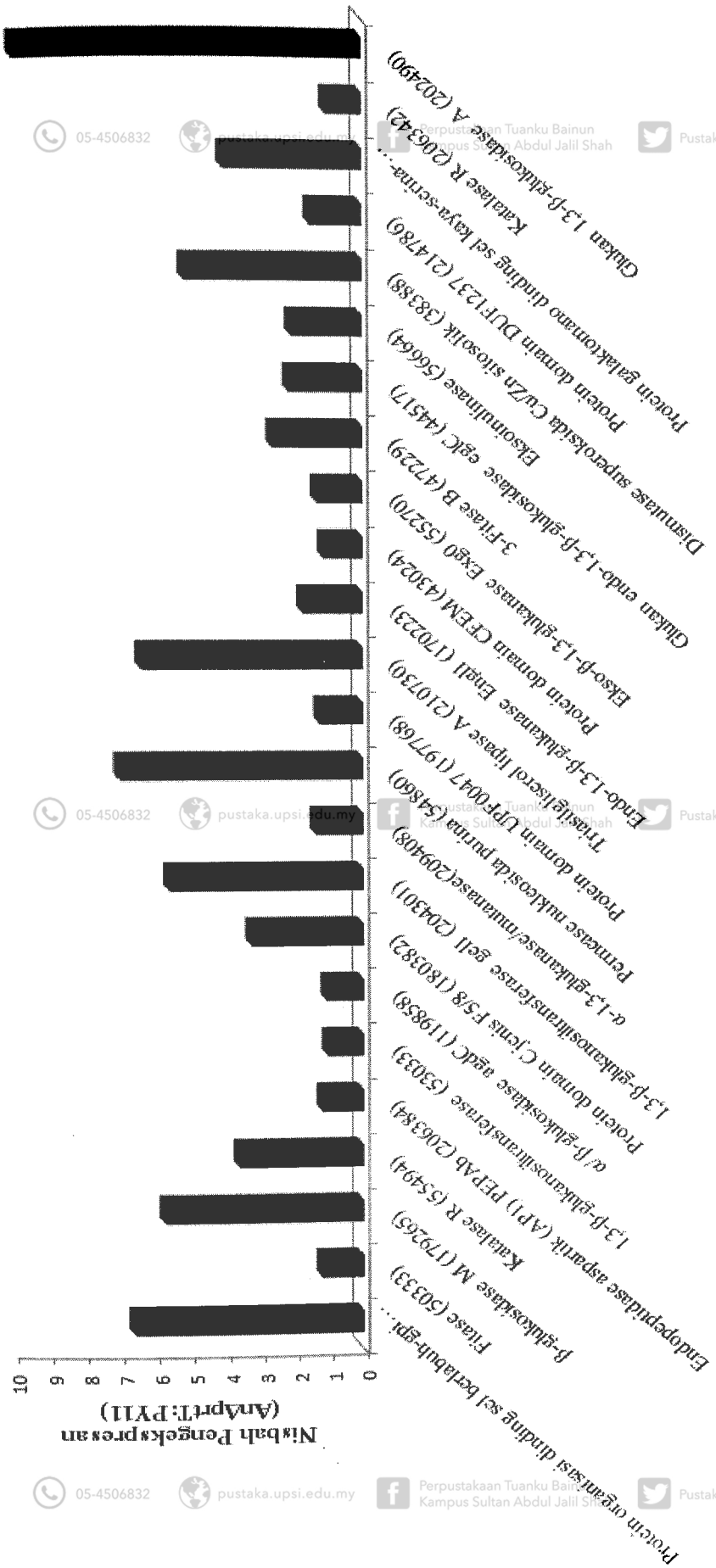


Rajah 5.20 Diagram Venn yang menunjukkan perbandingan bilangan sekretom antara *A. niger* PY11 (bulatan biru) dengan mutan *AnΔprtT* (bulatan merah) bagi sampel protein yang dituai pada hari ke-9
Kawasan bertindih menunjukkan bilangan protein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain.

PY11 pada sampel hari ke-9. Antara protein yang dikawal atur naik adalah glukan 1,3-β-glukosidase A (202490), 9.97; permease nukleosida purina (54860), 6.96; protein organisasi dinding sel berlabuh-gpi (50599), 6.55; triasilgliserol lipase A (210730), 6.36 dan β-glukosidase M (179265), 5.7. Protease yang dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* adalah endopeptidase aspartik, PEPAb (206384), 1.21.

5.4 PERBINCANGAN

Penyahaktifan gen yang mengekod faktor transkripsi *prtT* dalam *A. niger* PY11 telah mengurangkan aktiviti protease ekstra sel dan menyebabkan penurunan tahap transkripsi beberapa protease ekstra sel dalam mutan *AnΔprtT* (Bab IV). Bagi melihat kesan penyahaktifan *prtT* diperingkat proteomik, protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* telah dicirikan menggunakan kaedah UPLC-nanoESI-MS/MS. Analisis UPLC-nanoESI-MS/MS dilakukan ke atas protein ekstrak kasar kedua-dua strain yang dituai untuk lima hari berturut-turut iaitu bermula hari ke-5 hingga 9. Sebanyak 71 hingga 89 protein telah dikenal pasti daripada *A. niger* PY11, manakala antara 39 hingga 65 protein telah dikenal pasti daripada *AnΔprtT* bagi sampel kelima-lima hari. Jumlah sekretom mutan *AnΔprtT* yang dikesan lebih rendah mungkin disebabkan kesan penyahaktifan *prtT*. Analisis sekretom terhadap *A. niger* telah dilaporkan (Adav et al. 2010; de Oliveira et al. 2011; Lu et al. 2010; Tsang et al.



Rajah 5.21: Carta bar nisbah pengekspresan mutan *AnΔprtT* terhadap *A. niger* PY11 bagi protein-protein yang dikawal atur naik dalam sampel hari ke-9

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

2009). Namun, terdapat perbezaan di antara kajian ini dan kajian-kajian tersebut yang mungkin disebabkan oleh perbezaan dari segi metodologi kajian, latar belakang strain, komposisi medium, kaedah serta tempoh pengkulturan.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Strain *A.niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* telah dikultur dalam medium minimum yang mengandungi maltosa 15% (j/i) (MMJ) selama 10 hari dan kedua-duanya menunjukkan pertumbuhan yang setara. Katabolisme maltosa oleh *A. niger* melibatkan pemotongan maltosa kepada moieti glukosa oleh glukoamilase yang berlaku di luar sel kerana *A. niger* tidak mempunyai sistem pengambilan masuk maltosa ke dalam sel berbanding kebanyakan yis dan kulat berfilamen yang lain (Yuan et al. 2008; Vongsangnak et al. 2009). Pengambilan glukosa berlaku sama ada secara terus dengan diikuti degradasi katabolik glukosa melalui tapak jalan glikolitik dan fosfat pentosa (Hondmann & Visser 1994), atau pengoksidaan luar sel glukosa kepada asid glukonik oleh glukosa oksidase seiring dengan penjanaan hidrogen peroksida sebagai laluan alternatif kepada katabolisma glukosa. Asid glukonik seterusnya dimetabolisasi melalui tapak jalan fosfat pentose (Muller 1985).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kebiasannya, proteom ekstra sel *A. niger* yang dikultur di dalam medium yang mengandungi maltosa didominasi oleh glukoamilase (de Oliveira et al. 2011; Lu et al. 2010). Namun, *AnΔprtT* dan strain induknya *A. niger* PY11 merupakan strain yang telah dinyahaktifkan gen glukoamilase A (Δ*glaA*). Oleh itu, glukoamilase sememangnya tidak dikesan di dalam sekretom kedua-dua strain. Selain glukoamilase, α-glukosidase (*agdA*) dan α-amilase (*amyA*) juga merupakan enzim amilolitik yang diekspreskan dengan tinggi dengan kehadiran maltosa (Gomi et al. 2000). Dalam kajian ini, oksidoreduktase seperti superoksida dismutase Cu/Zn sitosolik (38388), katalase R (55494) dan katalase R (206342) dikawalatur naik dalam mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11 ataupun hanya dikenal pasti di dalam *AnΔprtT* terutamanya pada hari ke-8 dan 9. Penambahan maltosa ke dalam medium, sering dikaitkan dengan pengenalpastian peratus oksidoreduktase yang tinggi di dalam filtrat kultur. Penemuan ini membawa kepada hipotesis iaitu pertumbuhan di dalam maltosa meningkatkan jumlah spesies oksigen reaktif (ROS) seperti hidrogen peroksida terbentuk di luar sel dan ini menyebabkan peningkatan enzim-enzim yang berkaitan dengan ROS (de Oliveira et al. 2011; Lu et al. 2010).

Secara keseluruhannya, taburan kelas enzim bagi protein yang dikesan pada kelima-lima sampel menunjukkan corak yang sama iaitu kelas enzim hidrolase mencatatkan kuantiti terbesar pada kedua-dua strain berbanding kelas enzim lain seperti oksidoreduktase, transferase atau isomerase. Selain itu, *A. niger* PY11 sentiasa mencatatkan bilangan hidrolase yang lebih tinggi berbanding *AnΔprtT*. Perincian ke atas enzim-enzim yang terdapat dalam kelas hidrolase mendapati perbezaan yang ketara adalah pada enzim yang bertindak pada ikatan peptida (E.C 3.4). Secara purata, sebanyak 14 protease dikesan pada *A. niger* PY11 dalam sampel kelima-lima hari berbanding hanya 1 hingga 3 protease dikesan pada mutan *AnΔprtT*. Hasil ini sememangnya dijangkakan kerana *AnΔprtT* merupakan mutan di mana faktor transkripsi yang mengawal pengekspresan gen-gen protease tertentu telah dinyahaktifkan. Jadual 5.2 menunjukkan ringkasan bagi protease yang dikenal pasti daripada *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9.

Terdapat 20 protease yang dikenal pasti di dalam analisis sekeretom ini (Jadual 5.2). Beberapa kajian lain turut mengenal pasti bilangan protease yang hampir sama dalam kajian mereka (Adav et al. 2010, Braaksma et al. 2010). Kesemua protease yang disenaraikan dalam Jadual 5.2 mempunyai isyarat peptida kecuali endopeptidase aspartik, PEPAb (206384). Protease aspartik (41270) pula diramalkan mempunyai isyarat peptida oleh satu perisian sahaja iaitu signal-BLAST (http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html). *pepAb*, *pepAa*, *pepAc* dan *pepAd* merupakan empat gen protease aspartik baru yang dikenal pasti melalui pendekatan perbandingan genom (Wang et al. 2008). Keempat-empat gen protease aspartik tersebut didapati terpulihara dalam genus *Aspergillus*. Selain PEPAb, PEPAc juga dikenal pasti dalam sampel *A. niger* PY11 pada hari ke-5 dan 6, tetapi tidak dikesan dalam mana-mana sampel mutan *AnΔprtT*.

Meskipun diramalkan tidak mempunyai isyarat peptida, endopeptidase aspartik, PEPAb (206384) dikesan secara konsisten pada kedua-dua strain dan dalam setiap sampel. Analisis kuantifikasi relatif juga mendapati PEPAb dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* pada kelima-lima hari dengan nisbah pengeskpresan di antara 1.21 hingga 3.4. Oleh itu, tidak mungkin protein ini dikesan dalam medium ekstra sel disebabkan lisis sel. Isyarat peptida protein ini juga tidak dikesan pada protein ortolog

Jadual 5.2: Ringkasan bagi protease yang dikenal pasti daripada *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9

Bil	No. Aksesi	Nama Protein	Isyarat Peptida (sp)	PY11 Hari					*AnΔprtT* Hari				
				5	6	7	8	9	5	6	7	8	9
1	206384	Endopeptidase aspartik, pepAb	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2	201655	Endopeptidase aspartik, pepA	sp	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
3	214460	Karboksipeptidase S1	sp	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
4	211032	Peptidase tripeptidil, sed2	sp	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
5	55493	Peptidase tripeptidil, s8	sp	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
6	55133	Peptidase tripeptidil, s8	sp	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
7	54734	Karboksipeptidase serina	sp	/	/	/	/	/	-	/	-	-	-
8	46979	Karboksipeptidase serina	sp	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
9	52703	Endoprotease, peptidase s28	sp	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-
10	52700	Peptidase tripeptidil, sed2	sp	/	/	/	-	/	-	-	-	-	-
11	55665	Peptidase tripeptidil, sed2	sp	/	/	/	-	/	-	-	-	-	-
12	56689	Karboksipeptidase serina	sp	/	/	/	-	/	-	-	-	-	
13	53364	Endopeptidase aspartik	sp	/	-	/	/	-	-	-	-	-	
14	18966	Protease aspartik, pepAc	sp	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-
15	56161	Karboksipeptidase serina, pepF	sp	/	-	-	-	/	-	-	-	-	-
16	214665	Aminopeptidase Y	sp	-	-	/	-	-	-	-	/	-	/

17	41638	Karboksipeptidase serina	sp	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-
18	52082	Aspergilopepsin 2, pepB	sp	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-
19	41270	Protease aspartik	sp	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
20	185799	Peptidase dipeptidil 5	sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/

(/) Dikenal pasti

(-) Tidak dikenal pasti

pustaka.upsi.edu.my
Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah
PustakaTBainun
ptbupsi
05-4506832

daripada mana-mana spesies *Aspergillus*. Menurut Lu et al. (2010), PEPAb bukanlah protein yang diarahkan perembesannya melalui isyarat peptida biasa. Tahap perembesan lakase heterolog di dalam mutan *pepAb* daripada *A. niger* didapati meningkat sebanyak 42% berbanding jenis liar (Wang et al. 2008). Ini mencadangkan bahawa walaupun PEPAb tidak dirembeskan melalui sistem rembesan yang memerlukan isyarat peptida, namun kehadirannya ternyata memberi kesan terhadap penghasilan protein heterolog.

Genom *A. niger* mengekod hampir 200 protein yang terlibat dalam degradasi proteolitik termasuklah pelbagai protease ekstra sel seperti endoprotease aspartil (9 protein), karboksipeptidase serina (10 protein) dan di- dan tri-peptidil aminopeptidase (9 protein) (Pel et al. 2007). Berbanding *A. nidulans* dan *A. oryzae*, bilangan aminopeptidase ekstra sel dalam *A. niger* lebih rendah (3 protein). Kelimpahan endoprotease aspartil dan karboksipeptidase (yang biasanya aktif pada pH rendah) dan bilangan aminopeptidase (yang biasanya aktif pada pH tinggi atau neutral) yang rendah adalah berpadanan dengan sifat keasidan *A. niger* (Pel et al. 2007). Dalam kajian ini, sebanyak tujuh endopeptidase dan 13 eksopeptidase telah dikenal pasti (Jadual 5.2). Sebanyak 13 eksopeptidase tersebut boleh dikelaskan kepada aminopeptidase (1 protein), karboksipeptidase (6 protein), peptidase tripeptidil (5 protein) dan peptidase dipeptidil (1 protein). *A. niger* sememangnya terkenal sebagai kulat yang melakukan asidifikasi medium pengkulturan. Analisis spektrum proteolitik dalam *A. niger* mendedahkan bahawa protease asid lebih mendominasi. Ini menjelaskan mengapa aktiviti protease asidik menyebabkan masalah besar semasa pengekspresan protein homolog dan heterolog (ven den Hombergh et al. 1997b). Daripada 20 protease yang dikenal pasti dalam kajian ini, sebanyak 3 protease dikesan pada kedua-dua strain, 15 protease dikesan hanya pada *A. niger* PY11 dan 2 protease dikesan hanya pada *AnΔprtT* (Jadual 5.2). Dua protease yang hanya dikesan pada *AnΔprtT* adalah protease aspartik (41270) yang dikesan hanya pada hari ke-6 dan peptidase dipeptidil 5 (185799) yang dikesan hanya pada hari ke-9.

Dalam Bab IV, analisis pengekspresan gen melalui transkripsi berbalik RT-PCR telah dilakukan terhadap empat protease ekstra sel iaitu aspergilopepsin A, *pepA* (201655), aspergilopepsin B, *pepB* (52082), protease serina, *pepD* (203039) dan

karboksipeptidase serina, *pepF* (56161). Hasil keputusan RT-PCR tersebut menunjukkan bahawa pengekspresan *pep*A, *pep*B dan *pep*F dikawal atur pada peringkat transkripsi oleh faktor transkripsi *prt*T. Transkrip *pepD* pula tidak dikesan pada kedua-dua strain. Ini menunjukkan gen pepD tidak teraruh. Analisis sekretom ke atas *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* telah mengesahkan hasil analisis pengekspresan gen apabila mengesan kehadiran aspergilopepsin A, *pepA* (201655), aspergilopepsin B, *pepB* (52082) dan karboksipeptidase serina, *pepF* (56161) pada sampel *A. niger* PY11 tetapi tidak pada sampel mutan *AnΔprtT* (Jadual 5.3). Sebagaimana analisis RT-PCR, protease serina, *pepD* (203039) turut tidak dikesan pada kedua-dua strain pada mana-mana hari.

Faktor transkripsi *prtT* mengandungi domain pengikatan DNA kluster zink dwi-nuklear $Zn(II)_2$-Cys6. Melalui analisis mikroatur DNA yang dilakukan oleh Parenicova dan van Peij (2007), sebanyak 13 gen protease yang menunjukkan tahap pengekspresan yang rendah dan signifikan telah dikenal pasti melalui perbandingan antara mutan *prtT A. niger* strain CBS 513.88 dengan strain induknya. Pencarian untuk tapak pengikatan *prtT* turut dilakukan ke atas keseluruhan genom *A. niger* melalui analisis bioinformatik. Hasilnya, tapak pengikatan faktor transkripsi *prtT* putatif pada kawasan promoter gen-gen protease yang dikawal atur oleh *prtT* dalam *A. niger* iaitu motif sepanjang 33 nukleotida 5'–G/C $(N)_5$ C C G A/T C G G $(N)_{19}$ G/C-3'; di mana N=C atau G atau A atau T, telah ditemui dan dipatenkan (Parenicova & van Peij 2007).

A. niger diketahui boleh merembeskan pelbagai enzim hidrolitik yang berupaya mencernakan biojisim tumbuhan kepada gula (de Vries & Visser 2001). Penukaran biojisim lignoselulosa kompleks kepada gula terfermentasi memerlukan julat enzim yang luas seperti kompleks selulase, hemiselulase dan peroksidase. Hidrolisis lengkap selulosa kepada gula melibatkan pemotongan ikatan dalaman dalam rantaian selulosa oleh endoglukanase, pembebasan selobiosa oleh eksoglukanase yang bertindak pada hujung rantaian selulosa dan penukaran selobios kepada gula oleh β-glukosidase (Adav et al. 2010). Analisis sekretom *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* mendapati terdapat enzim selulase dikenal pasti kedua-dua strain seperti β-glukosidase M (179265) dan 1,4-β-D-glukan selobiohidroalse B (53159).

Hemiselulosa adalah biojisim boleh diperbaharui kedua terbanyak selepas selulosa. Antara hemiselulase yang dikesan dalam kajian ini adalah endopoligalakturonase C (52219), arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase C (197735), α-1,2-manosidase (177032), manosil-oligosakarida α-1,2-manosidase 1B (205517), α-galaktosidase (37736), α-galaktosidase B (207264) dan β-galaktosidase E (51764).

Walaupun dikultur dalam medium yang tidak mengaruh penghasilan selulase atau hemiselulase, *A. niger* didapati tetap berupaya menghasilkan enzim-enzim tersebut. Adav et al. (2010) menunjukkan bahawa banyak enzim pencerna lignoselulosa seperti selulase dan hemiselulase dikenal pasti dalam fermentasi *A. niger* di dalam medium minimum tanpa substrat selulosa. Tsang et al. (2009) dalam kajiannya telah mengkultur *A. niger* dalam enam medium minimum yang mengandungi sumber karbon yang berbeza iaitu glukosa, gliserol, sorbitol, *locust bean gum*, pektin sitrus dan xilan kayu birch. Sejumlah 39 protein didapati diekspreskan dalam keenam-enam medium dan kebanyakannya merupakan enzim-enzim yang terlibat dalam hidrolisis selulosa, xilan serta arabinan. Dalam *A. niger*, biosintesis enzim ekstra sel kebanyakannya dikawal atur diperingkat transkripsi (de Oliveira et al. 2011). Faktor transkripsi yang mengawal pengekspresan adalah sama ada penindas seperti CreA, atau pengaktif seperti XlnR dan AmyR yang masing-masing mengaktifkan pengekspresan gen-gen yang mengekod enzim hemi- atau selulolitik dengan kehadiran D-xilosa dan enzim amilolitik dengan kehadiran D-maltosa (Dowzer & Kelly 1991; Petersen et al. 1999; van Peij et al. 1998). Kedua-dua faktor transkripsi XlnR dan AmyR ditindas oleh CreA dengan kehadiran D-glukosa.

Pengekspresan enzim-enzim yang terlibat dengan degradasi dan biogenesis dinding sel seperti endokitinase (38015), α-1,3-glukanase (209408), endo-1,3-β-glukanase (170223) dan ekso-1,3-β-glukanase (55270) dalam mutan *AnΔprtT* menunjukkan peningkatan berbanding *A. niger* PY11 daripada hari ke-5 hingga 9. Ini mungkin menunjukkan bahawa *AnΔprtT* mengalami pembentukan semula dinding sel secara intensif berbanding *A. niger* PY11. Selain itu, mungkin mutan *AnΔprtT* perlu mencari sumber karbon alternatif sebagai sumber tenaga sebagai respon kepada ketidakupayaannya untuk menggunakan protein dalam medium disebabkan penyahaktifan gen *prtT*. Corak peningkatan pengekspresan enzim-pencerna

karbohidrat yang meningkat turut dilaporkan dalam kajian proteomik ke atas mutan *prtT A. fumigtus* (Hagag et al. 2012).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

5.5 KESIMPULAN

Analisis sekretom ke atas *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* menggunakan kaedah UPLC-nanoESI-MS/MS secara keseluruhannya berjaya mengenal pasti sebanyak 20 protease. Daripada jumlah tersebut, sebanyak 15 protease hanya dikesan pada *A. niger* PY11 tetapi tiada dalam sampel *AnΔprtT*. Ini bermakna, pengekspresan 15 protease tersebut (201655, 214460, 211032, 55493, 55133, 46979, 52703, 52700, 55665, 56689, 53364, 189966, 56161, 41638, 52082) mungkin dikawal atur oleh faktor transkripsi *prtT*. Selebihnya (206384, 54734, 214665, 41270, 185799) adalah protease yang tidak dikawal atur oleh *prtT* kerana dikesan dalam sampel *AnΔprtT*. Menariknya, protease pepAb (206384) diekspreskan dalam kedua-dua strain dan dikawal atur naik secara konsisten pada setiap sampel. Justeru, *pepAb* mungkin sesuai dijadikan sasaran untuk penyahaktifan gen bagi mengurangkan kesan degradasi proteolitik ke atas protein heterolog. Selain itu, terdapat banyak protein dan enzim yang terlibat dalam degradasi dan biogenesis dinding sel dikawal atur naik di dalam *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11. Ini mungkin menunjukkan bahawa *AnΔprtT* mengalami pembentukan semula dinding sel secara intensif berbanding *A. niger* PY11. Penyahaktifan *prtT* mungkin menyebabkan mutan *AnΔprtT* kekurangan enzim-enzim untuk hidrolisis protein lalu meningkatkan pengekspresan enzim-enzim yang dapat membantu mencari sumber karbon alternatif sebagai sumber tenaga.

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

BAB VI

PENGEKSPRESAN KUTINASE HETEROLOG DARIPADA *A. niger* PY11 DAN *AnΔprtT*

6.1 PENGENALAN

Penghasilan protein rekombinan melibatkan pasaran yang bernilai berbilion dolar (Amerika). Sehingga tahun 2002, lebih 155 produk farmaseutikal dan vaksin yang telah diluluskan oleh FDA (*Food and Drug Administration*) dibangunkan oleh syarikat biofarmaseutikal (Demain & Vaishnav 2009). Pembangunan sesuatu produk baru bermula dengan pemilihan hos penghasilan. Oleh kerana tiada hos tunggal yang terbaik untuk menghasilkan semua jenis protein, maka beberapa sistem pengekspresan telah dibangunkan daripada hos bakteria hinggalah sel mamalia (Mattanovich et al. 2012). Bagi penghasilan protein rekombinan, kualiti, hasil, kefungsian dan tempoh masa penghasilan protein adalah faktor penting yang perlu dipertimbangkan dalam memilih sistem pengkespresan yang tepat (Demain & Vaishnav 2009).

Protein yang diingini dihasilkan secara besar-besaran melalui kejuruteraan genetik untuk memenuhi permintaan industri. Oleh sebab itu, kebanyakan produk biofarmeseutikal yang dihasilkan pada hari ini adalah secara rekombinan. Langkah pertama untuk menghasilkan protein rekombinan adalah mendapatkan jujukan DNA yang diingini dan kemudian protein tersebut dihasilkan di dalam sistem pengekspresan yang dipilih. Protein rekombinan boleh diekspreskan daripada pelbagai sistem pengekspresan seperti dalam kultur sel bakteria, yis, kulat, mamalia, tumbuhan, serangga mahupun tumbuhan dan haiwan transgenik. Protein yang bersaiz besar biasanya diekspreskan di dalam sistem eukariot manakala protein yang bersaiz

kecil diekspreskan di dalam sistem prokariot. Bagi protein yang kaya dengan ikatan dwisulfida atau memerlukan modifikasi pos translasi seperti glikosilasi, hos seperti kulat, sel mamalia atau sistem bakulovirus menjadi pilihan (Demain & Vaishnav 2009).

Kutinase (EC 3.1.1.74) adalah esterase serina yang tergolong dalam superfamili α/β hidrolase. Kutinase dihasilkan secara semula jadi oleh kebanyakan kulat fitopatogenik untuk menghidrolisis lapisan kutin yang melindungi kutikel tumbuhan. Kutikel tumbuhan terdiri daripada poliester lipid tak larut yang dipanggil kutin dan berfungsi untuk melindungi tumbuhan daripada dehidrasi dan sebagai penghalang kepada jangkitan patogen (Chen et al. 2013). *Glomerella cingulata* adalah kulat fitopatogenik yang menyebabkan antraknos pada buah, batang dan daun. cDNA kutinase *G. cingulata* telah diklon dan diekspreskan dalam *E. coli* dan struktur kristal kutinase rekombinan *G. cingulata* telah ditentukan (Farah Diba et al. 2001; Nyon et al. 2008, 2009). Kutinase mampu menghidrolisis pelbagai rantaian ester yang pendek dan panjang. Kutinase juga sangat aktif dan stabil walaupun dengan kehadiran agen pengoksidaan, detergen dan protease. Oleh sebab itu, kutinase digunakan secara meluas dalam bidang pertanian, industri dan farmaseutikal. Penghasilan kutinase rekombinan dalam hos heterolog adalah pendekatan yang terbaik untuk memenuhi keperluan industri kerana tahap pengekspresannya dalam hos asal biasanya rendah (Chen et al. 2013).

Dalam Bab IV, mutan *AnΔprtT* yang menunjukkan pengurangan aktiviti protease ekstra sel berbanding *A. niger* PY11 telah dibangunkan melalui penyahaktifan faktor transkripsi, *prtT*. Hasil pencirian protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* yang dilaporkan dalam Bab V pula mendapati pengurangan aktiviti protease ekstra sel pada *AnΔprtT* adalah disebabkan oleh kehilangan pengekspresan sebanyak 15 protease dalam mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11. Seterusnya dalam bab ini, mutan *AnΔprtT* digunakan sebagai model sistem pengekspresan kulat-kurang protease yang mengekspreskan kutinase rekombinan daripada *G. cingulata*.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Fokus kajian dalam bab ini adalah untuk membandingkan keupayaan *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* untuk menghasilkan protein heterolog. Untuk itu, kedua-dua strain ditransformasikan dengan plasmid yang membawa gen kutinase *G. cingulata* dan tahap pengekspresan kutinase heterolog daripada transforman-penghasil kutinase bagi kedua-dua strain ditentukan. Selain itu, kestabilan kutinase heterolog terhadap degradasi proteolitik dalam ampaian kultur *A. niger* PY11- dan *AnΔprtT*-penghasil kutinase turut diuji.

6.2 TRANSFORMASI *AnΔprtT* DENGAN PLASMID ANEp-Cre-ptrA UNTUK KITAR SEMULA PENANDA *pyrG*

Dalam Bab IV, mutan *AnΔprtT* terhasil apabila gen *prtT* pada genom *A. niger* PY11 (*pyrG*$^-$) dinyahaktifkan dan digantikan dengan gen penanda *pyrG* daripada kaset gangguan gen *prtT*. Integrasi gen penanda *pyrG* pada *AnΔprtT* menjadikan mutan tersebut prototrof uridina (*pyrG*$^+$). Kaset gangguan *prtT* direka bentuk agar gen penanda *pyrG* yang dibawanya boleh dikitar semula dengan memasukkan jujukan *loxP* bersaiz 34 bp di kedua-dua sisi penanda *pyrG*. Rekombinasi di antara kedua-dua jujukan *loxP* yang dimangkinkan oleh *Cre* rekombinase boleh menyingkirkan *pyrG* keluar daripada mutan *AnΔprtT* dan menjadikannya kembali auksotrof uridina (*pyrG*$^-$). Dengan ini, gen *pyrG* boleh digunakan semula sebagai penanda dalam proses transformasi *AnΔprtT* yang seterusnya.

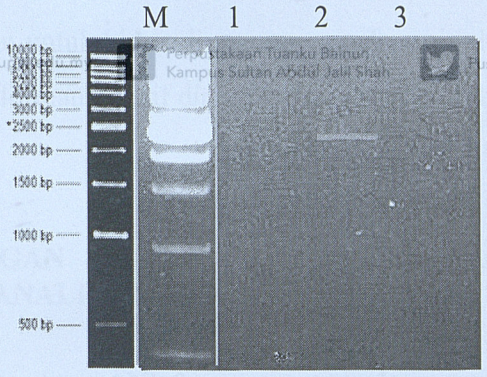
Bagi memangkinkan proses rekombinasi di antara jujukan *loxP* pada kaset gangguan, mutan *AnΔprtT* yang membawa gen *Cre* rekombinase mesti dijana terlebih dahulu. Oleh itu, *AnΔprtT* telah ditransformasi dengan plasmid ANEp-Cre-ptrA. ANEp-Cre-ptrA merupakan plasmid episomal yang membawa gen Cre rekombinase yang diletakkan di bawah kawalan promoter gen xilanase A, *xlnA* daripada *A. nidulans*. Promoter *xlnA* diaruh oleh xilosa dan direncat oleh glukosa. ANEp-Cre-ptrA juga membawa gen kerintangan terhadap antibiotik piritiamin (Lampiran F). Kepekatan perencatan minimum piritiamin terhadap *AnΔprtT* telah ditentukan pada 0.1 mg/L (Kubodera et al. 2002). Sferoplas *AnΔprtT* disediakan mengikut kaedah yang diperincikan oleh Storms et al. (2005). Sebanyak dua koloni transforman yang hidup di atas piring MM yang mengandungi 1% (j/i) xilosa dan antibiotik piritiamin (0.1 mg/L) dipilih secara rawak. Pemencilan spora tungal dilakukan terhadap dua

koloni transforman tersebut sebelum disubkultur di atas medium yang baru. Keupayaaan transforman yang hidup di atas piring yang mengandungi piritiamin menunjukkan vektor ANEp-Cre-ptrA yang membawa gen kerintangan terhadap piritiamin telah memasuki nukleus *AnΔprtT.* Selepas tujuh hari, konidium transforman putatif tersebut dituai dan dipiringkan sekali lagi di atas agar MM yang mengandungi 1% (j/i) xilosa, antibiotik piritiamin (0.1 mg/L) dan 5-FOA (2 mg/mL). Selepas tiga hari, didapati hanya tiga koloni yang hidup di atas agar tersebut. Ketiga-tiga koloni tersebut disubkultur sekali lagi di atas agar MM yang mengandungi 1% (j/i) xilosa, antibiotik piritiamin (0.1 mg/L) dan 5-FOA (2 mg/mL). Hanya koloni yang telah kehilangan penanda *pyrG* sahaja yang boleh hidup di atas piring yang mengandungi 5-FOA. Ini kerana mutan kurang-*pyrG* (auksotrof uridina) adalah rintang terhadap asid 5'-fluoroorotik (5-FOA) manakala prototrof uridina pula toksik terhadap 5-FOA.

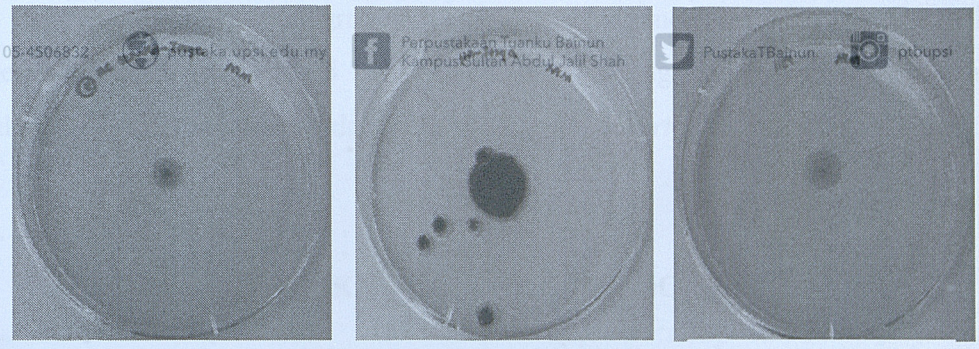
Seterusnya, kehilangan penanda *pyrG* daripada mutan *AnΔprtT* disahkan melalui analisis PCR. Pasangan pencetus F2' dan R5' digunakan untuk mengamplifikasi fragmen *loxP-pyrG-loxP* bagi mengesan kehadiran penanda *pyrG* dalam mutan *AnΔprtT*. Fragmen *loxP-pyrG-loxP* tidak berjaya diamplifikasi daripada satu koloni putatif yang dan ini menandakan fragmen tersebut telah keluar atau dikitar semula daripada genom *AnΔprtT* (Rajah 6.1). Bagi memastikan *AnΔprtT* (*pyrG*$^-$) telah kembali menjadi auksotrof uridina, transfoman tersebut dikultur semula di atas agar MM dan sebagaimana strain *A. niger* PY11, mutan *AnΔprtT* (pyrG$^-$) juga didapati tidak dapat hidup di atas agar MM tanpa urasil dan uridina (Rajah 6.2).

6.3 TRANSFORMASI *AnΔprtT* DENGAN KASET PENGEKSPRESAN GEN PELAPOR

Bagi menguji keefisienan *AnΔprtT* dan *A. niger* PY11 sebagai hos untuk penghasilan protein heterolog, kedua-dua strain telah ditransformasikan dengan plasmid ANIp2-cut yang membawa gen kutinase *G. cingulata*. Vektor asas ANIp2 mengandungi promoter aruhan tinggi glukoamilase A (*Gla*Pr), gen penanda *pyrG* dan gen kerintangan terhadap ampisilin. Transkripsi promoter glukoamilase A diaruh dengan tinggi oleh maltosa. Kedua-dua, strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* (*pyrG*$^-$) digunakan



Rajah 6.1 Profil elektroforesis agarosa (1%) produk PCR bagi pengesahan kitar semula penanda *pyrG* daripada mutan *AnΔprtT*
Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: Kawalan negatif (campuran tindak balas PCR tanpa templat DNA); Lajur 2: Amplikon bagi jujukan fragmen *loxP-pyrG-loxP* (~3.5 kb) mengunakan templat DNA *AnΔprtT* (*pyrG*$^+$); Lajur 3: *AnΔprtT* (*pyrG*$^-$).



(a) (b) (c)

Rajah 6.2 Pertumbuhan kulat di atas agar MM tanpa urasil dan uridina pada hari ke-6 selepas proses kitar semula gen penanda *pyrG*
a. *AnΔprtT* (*pyrG*$^-$). b. *AnΔprtT* (*pyrG*$^+$). c. *A. niger* PY11 (sebagai kawalan)

untuk transformasi dengan vektor ANIp2-cut. Strain *A. niger* yang kekurangan *pyrG* seperti *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* (selepas *pyrG* dikeluarkan) adalah auksotrofik terhadap uridina. Transformasi *A. niger* PY11 dengan vektor atau kaset yang membawa *pyrG* membolehkan pemilihan transforman putatif dilakukan di atas

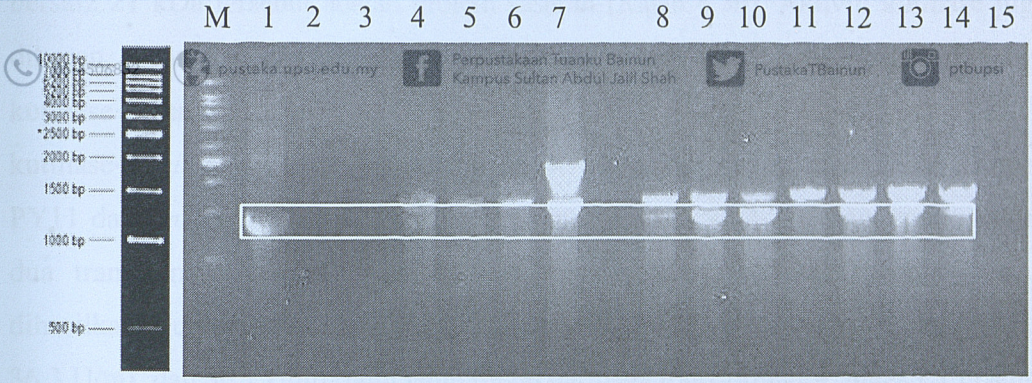
medium tanpa urasil dan uridina (Takahashi et al. 2004). Maka, transforman dipilih berdasarkan keupayaan untuk hidup di atas agar medium minimum tanpa urasil dan uridina. Sepuluh transforman putatif dipilih secara rawak dan disubkultur di atas agar MM yang baru.

6.4 PENYARINGAN TRANSFORMAN MEMBAWA GEN PELAPOR MELALUI ANALISIS PCR

Pengesahan integrasi vektor ANIp2-cut yang membawa gen kutinase ke dalam genom transforman dilakukan melalui PCR. Terlebih dahulu, DNA genom transforman putatif dipencilkan dan DNA yang diperoleh digunakan dalam analisis PCR. Pasangan pencetus Fwd_pyrG dan Rev_GlaTt digunakan untuk mengesahkan integrasi ANIp2-cut dalam genom *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*. Bagi *A. niger* PY11, daripada 12 transforman yang disaring, 7 transforman menunjukkan integrasi vektor ANIp2-cut apabila amplikon bersaiz ~1.4 kb berjaya diamplifikasi daripada genom transforman (Rajah 6.3). Manakala bagi *AnΔprtT*, kehadiran amplikon bersaiz ~1.4 kb yang mengesahkan integrasi ANIp2-cut dalam genom transforman *AnΔprtT* dikesan pada 12 daripada 15 transforman yang disaring. Rajah 6.4 menunjukkan analisis PCR bagi sebahagian daripada transforman *AnΔprtT* yang disaring.

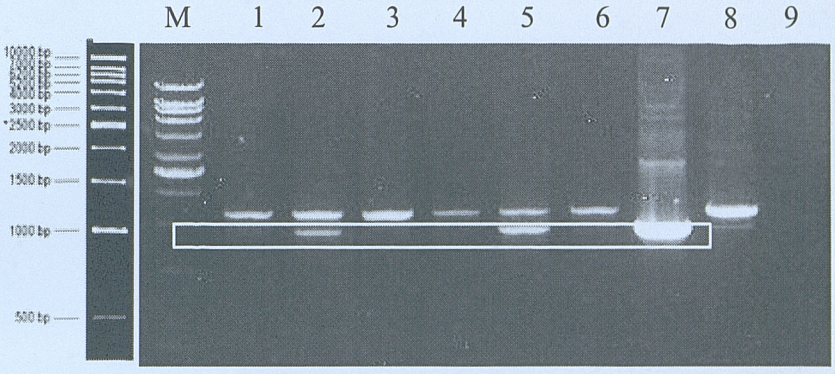
6.5 PENGEKSPRESAN KUTINASE HETEROLOG

Sebanyak 2 x 10^6 spora/mL dikultur di dalam 50 mL medium minimum yang mengandungi 15% (j/i) maltosa (MMJ). Kepekatan maltosa sebanyak 15% (j/i) digunakan (berdasarkan komunikasi peribadi dengan R. Storms, Concordia University, Kanada) untuk mengaruh pengekspresan kutinase heterolog yang diklonkan di bawah kawalan promoter aruhan tinggi gen glukoamilase A (*Gla*Pr). Pengkulturan dilakukan di dalam piring petri secara statik selama 4 hari pada suhu 30°C. Pengekspresan menggunakan sistem *A. niger* menghasilkan protein kutinase *G. cingulata* secara ekstra sel. Kedua-dua *AnΔprtT* dan *A. niger* PY11 berupaya mengekspreskan protein yang mempunyai saiz yang selari dengan kutinase sasaran iaitu 21 kDa (Rajah 6.5a). Seterusnya, analisis pemedapan Western dilakukan bagi mengesan kehadiran kutinase *G. cingulata* serta untuk mengesahkan jalur protein



Rajah 6.3 Profil elektroferesis agarosa (1%) bagi analisis penyaringan transforman yang membawa plasmid ANIp2-cut dalam *A. niger* PY11 Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb (Vivantis, Malaysia); Lajur 1: Kawalan positif mengandungi templat plasmid ANIp2-cut. Lajur 2: Kawalan negatif mengandungi templat DNA *A. niger* PY11 tak tertransformasi dengan plasmid ANIp2-cut. Lajur 3-14: Amplikon bersaiz ~1.4 kb yang mengesahkan integrasi plasmid ANIp2-cut dalam genom transforman putatif *A. niger* PY11. Lajur 15: Kawalan negatif mengandungi semua komponen PCR kecuali templat DNA.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 6.4 Profil elektroferesis agarosa (1%) bagi analisis penyaringan transforman yang membawa plasmid ANIp2-cut dalam *AnΔprtT* Lajur M: Penanda DNA VC 1 kb (Vivantis, Malaysia); Lajur 1- 6: Amplikon bersaiz ~1.4 kb yang mengesahkan integrasi plasmid ANIp2-cut dalam genom transforman putatif *AnΔprtT*. Lajur 7: Kawalan positif mengandungi templat plasmid ANIp2-cut. Lajur 8: Kawalan negatif mengandungi templat DNA *AnΔprtT* tak tertransformasi dengan plasmid ANIp2-cut. Lajur 9: Kawalan negatif mengandungi semua komponen PCR kecuali templat DNA.

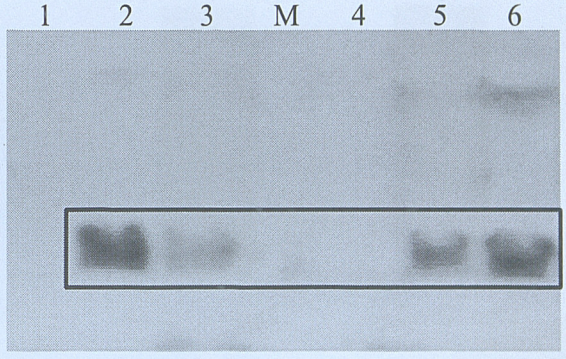
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

bersaiz 21 kDa tersebut adalah protein sasaran (Rajah 6.5b). Aktiviti kutinase juga dikesan dalam supernatan kultur kedua-dua strain yang membuktikan bahawa kutinase heterolog telah dirembeskan oleh *A. niger*. Walau bagaimanapun, aktiviti kutinase *G. cingulata* tidak dikesan pada supernatan kultur kawalan daripada *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* yang tidak diintegrasikan dengan ANIp2-cut. Bagi setiap strain, dua transforman penghasil-kutinase dianalisis. Aktiviti kutinase heterolog yang dihasilkan oleh transforman *AnΔprtT*-cut1 and *AnΔprtT*-cut2 masing-masing adalah 36.3 U/mL dan 36.7 U/mL iaitu lebih tinggi daripada transforman *A. niger* PY11-cut1

(a)



(b)

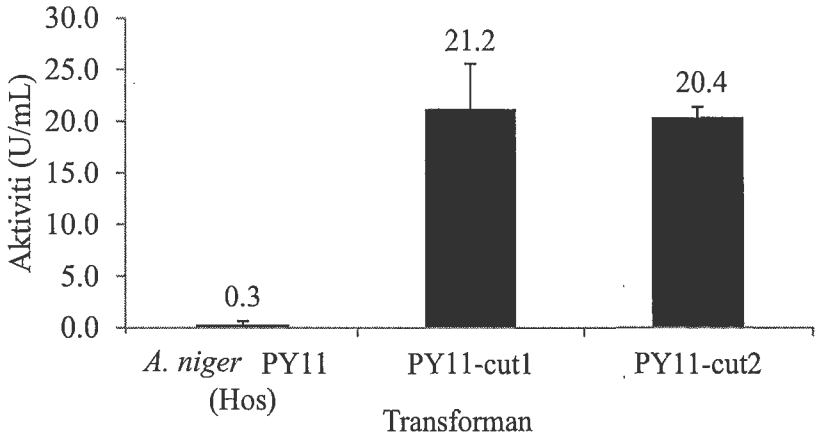


Rajah 6.5 Analisis SDS-PAGE (Panel a) dan pemedapan Western (Panel b) bagi pengekspresan kutinase heterolog
Lajur 1: Kawalan protein daripada *A. niger* PY11 tak tertransformasi dengan ANIp2-cut; Lajur 2: Protein daripada *A. niger* PY11-cut1; Lajur 3: Protein daripada *A. niger* PY11-cut2; Lajur M: Penanda berat molekul protein (NEB, England); Lajur 4: Kawalan protein daripada *AnΔprtT* tak tertransformasi dengan ANIp2-cut; Lajur 5: Protein daripada *AnΔprtT*-cut1; Lajur 6: Protein daripada *AnΔprtT*-cut2. Bagi pemedapan Western, antibodi yang digunakan adalah anti-kutinase.

dan *A. niger* PY11-cut2 (21.2 U/mL dan 20.4 U/mL) (Rajah 6.6a & 6.6b). Ini menunjukkan penyahaktifan *prtT* mampu meningkatkan penghasilan kutinase heterolog oleh *A. niger*.

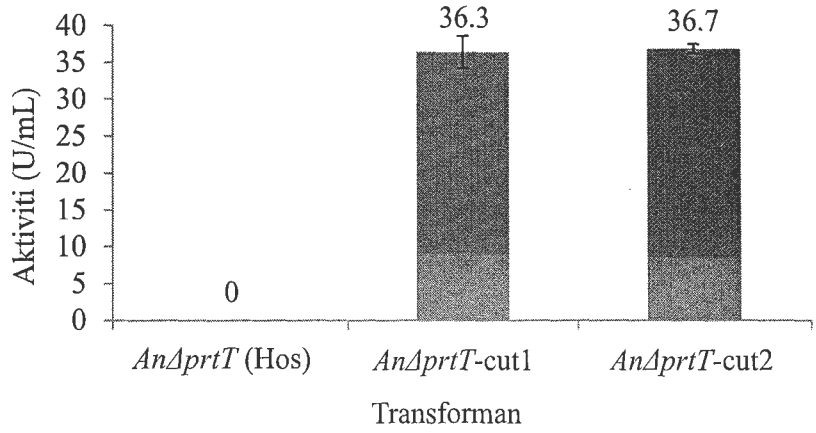
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

(a)



(b)

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



Rajah 6.6 Aktiviti kutinase heterolog yang dihasilkan oleh *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* berbanding hos masing-masing
a. Aktiviti kutinase heterolog daripada *A. niger* PY11 b. Aktiviti kutinase heterolog daripada *AnΔprtT*. Hasil ini diekspreskan sebagai min ± sisihan piawai.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

6.6 KESAN PENYAHAKTIFAN *prtT* TERHADAP KESTABILAN KUTINASE HETEROLOG SEMASA PENYIMPANAN

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kestabilan kutinase *G. cingulata* dalam supernatan kultur *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* dibandingkan dengan membiarkan supernatan kultur tersebut pada suhu 4°C selama enam minggu dan pada suhu 25°C selama dua minggu. Degradasi kutinase heterolog pada suhu 4°C ditentukan setiap minggu dengan mengukur aktiviti residu protein sasaran. Kutinase heterolog daripada kedua-dua strain didapati stabil pada suhu 4°C dengan degradasi proteolitik yang minimum selama enam minggu tempoh penyimpanan (Rajah 6.7a). Pada hari ke-6, hasil analisis ANOVA (Ujian Duncan Multiple Range) mendapati bahawa tiada perbezaan yang signifikan ($P<0.05$) pada aktiviti residu kutinase heterolog antara PY11-cut2 dan *AnΔprtT*-cut1 serta *AnΔprtT*-cut1 dan *AnΔprtT*-cut2. Sebaliknya, terdapat perbezaan yang signifikan ($P<0.05$) pada aktiviti residu kutinase heterolog antara PY11-cut1 dan PY11-cut 2, PY11-cut1 dan *AnΔprtT*-cut1, PY11-cut1 dan *AnΔprtT*-cut2, serta PY11-cut2 dan *AnΔprtT*-cut2. Namun, sebab mengapa terdapatnya perbezaan ini tidak diketahui.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Pada suhu 25°C, aktiviti residu diukur setiap dua hari. *AnΔprtT*-cut1 dan *AnΔprtT*-cut2 didapati masih memiliki 80% daripada aktiviti kutinase yang asal (sebelum penyimpanan bermula) selepas 14 hari tempoh penyimpanan. Namun begitu, kutinase yang dihasilkan oleh *A. niger* PY11-cut1 dan *A. niger* PY11-cut2 kehilangan lebih 50% daripada aktiviti kutinase yang asal (sebelum penyimpanan bermula) selepas enam hari penyimpanan dan hanya memiliki aktiviti yang boleh diabaikan selepas 14 hari (Rajah 6.7b). Maka, dapat disimpulkan bahawa penurunan aktiviti proteolitik luar sel *AnΔprtT* telah mengurangkan degradasi protein heterolog di dalam supernatan kultur.

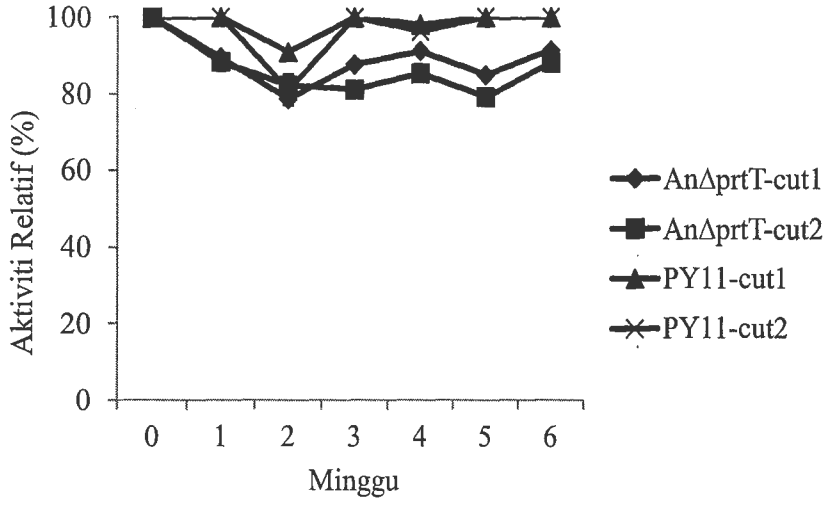
6.7 PERBINCANGAN

Matlamat kajian dalam bab ini adalah untuk menentukan kapasiti dan tahap pengekspresan kutinase heterolog yang dihasilkan oleh *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*. Selain itu, kestabilan kutinase heterolog terhadap degragasi oleh protease natif bagi kedua-dua strain turut diuji. Pada Bab IV, mutan *AnΔprtT* telah dihasilkan dan

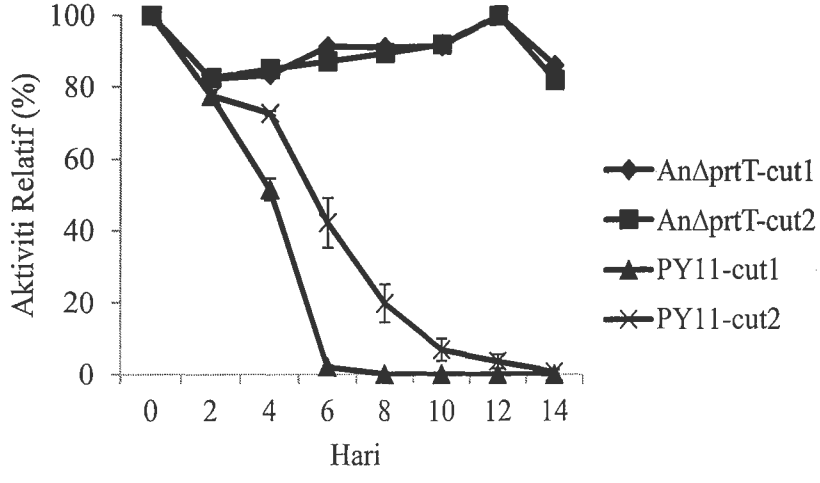
dicirikan. Gen *prtT* dinyahaktif untuk mengkaji fungsi serta kesan penyahaktifannya terhadap penghasilan protease ekstra sel *A. niger*. Penyahaktifan gen *prtT* dilakukan dengan menggantikan gen tersebut dengan kaset gangguan yang mengandungi penanda *pyrG* daripada *A. nidulans*.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

(a)



(b)



Rajah 6.7 Kestabilan kutinase heterolog dalam ekstrak kasar *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*
a. Profil aktiviti relatif kutinase heterolog yang dieram pada suhu 4°C selama enam minggu. b. Profil aktiviti relatif kutinase heterolog yang dieram pada suhu 25°C selama dua minggu. Peratus aktiviti relatif dikira dengan mengambil aktiviti awal sebelum pengeraman sebagai 100%.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Dalam kajian ini, kaset gangguan gen *prtT* dibina dengan mencantumkan penanda *pyrG* dengan jujukan pengapit bagi gen sasaran. Sistem gen penanda yang boleh dikitar semula dibina dengan memasukkan jujukan *loxP* bersaiz 34 bp di kedua-dua sisi penanda *pyrG* yang boleh berkomplemen dengan mutasi *pyrG* pada PY11. Transformasi *A. niger* PY11 (auksotrof uridina) dengan kaset gangguan tersebut menjadikan mutan *An*Δ*prtT* yang terhasil sebagai prototrof uridina. Bagi membolehkan gen *pyrG* diguna semula sebagai penanda dalam transformasi *An*Δ*prtT* dengan plasmid yang membawa gen kutinase *G. cingulata*, maka, penanda tersebut perlu dikeluarkan daripada genom *An*Δ*prtT*. Penyingkiran penanda *pyrG* boleh berlaku selepas pengekspresan *cre* rekombinase dalam strain *An*Δ*prtT*. Justeru, *An*Δ*prtT* ditransformasikan dengan plasmid ANEp-Cre-ptrA. Plasmid ANEp-Cre-ptrA membawa gen *Cre* rekombinase yang telah diletakkan di bawah kawalan promoter gen xilanase, *xlnA* daripada *A. nidulans*. Ini bermakna, pengekspresan *Cre* rekombinase boleh diaruh oleh xilosa dan direncat oleh glukosa. Penanda *pyrG* disingkirkan apabila berlaku rekombinasi di antara dua jujukan *loxP* yang dimangkinkan oleh *Cre* rekombinase disamping meninggalkan satu jujukan *loxP* dalam genom pada tapak penyahaktifan (rujuk Rajah 3.4). Rekombinasi teraruh di antara jujukan ulangan langsung *loxP* merupakan strategi alternatif untuk menyingkirkan penanda yang diapit. Ini akan mengembalikan *An*Δ*prtT* kepada fenotip auksotrof uridina sebagaimana strain induk *A. niger* PY11.

Sistem rekombinasi *Cre/loxP* yang diadaptasi daripada baketriofaj PI merupakan salah satu strategi yang efisien untuk kitar semula gen penanda (Sternberg & Hamilton 1981). Sistem *Cre-lox* ini diaplikasikan secara khusus untuk pemotongan gen penanda yang digunakan semasa proses penggantian gen dalam *Lactobacillus plantarum* (Lambert et al. 2007). Strategi ini melibatkan pemotongan fragmen DNA yang diapit oleh jujukan *loxP*. Pemotongan fragmen DNA tersebut dimangkinkan oleh *Cre* rekombinase yang mengenali secara spesifik jujukan *loxP* bersaiz 34 bp dan memangkinkan proses rekombinasi resiprokal di antara pasangan *loxP* tersebut (Forment et al. 2006). Sistem ini telah terbukti berfungsi dalam *S. cerevisiae* dan kulat-kulat lain seperti *Candida albicans*, *A. fumigatus* dan *Cryptococcus neoformans* (Dennison et al. 2005; Krappman et al. 2005; Patel et al. 2010; Sauer 1987). Disebabkan rekombinasi homolog dalam kulat berfilamen adalah kurang efisien

berbanding *S. cerevisiae*, *Cre/loxP* mungkin berguna untuk meningkatkan kitar semula gen penanda selepas setiap pusingan penyahaktifan gen (Forment et al. 2006).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Adakalanya, apabila gen penanda diperkenalkan ke dalam genom bagi membantu proses pemilihan mutan, perencatan pertumbuhan mungkin berlaku. Pengekspresan gen penanda boleh menyebabkan kesan polar pada pengekspresan gen-gen yang terletak pada kawasan huluan dan hilirannya. Justeru, penyingkiran gen penanda daripada genom melalui rekombinasi *Cre-lox* adalah cara yang efisien untuk mengatasi isu ini (Lambert et al. 2007). Mizutani et al. (2012) telah membangunkan kaedah kitar semula gen penanda menggunakan system *Cre-loxP* dengan memperkenalkan *Cre* secara terus ke dalam sel menggunakan pembawa *Cre*. Kaedah ringkas ini terdiri daripada dua langkah. Langkah pertama adalah dengan memperkenalkan *Cre* komersil bersama asid nukleik yang bertindak sebagai pembawa *Cre* ke dalam protoplas strain sasaran yang mempunyai gen penanda di antara dua tapak *loxP* yang mempunyai orientasi yang sama. Langkah kedua adalah untuk menyaring strain yang gen penandanya telah dikitar semula menggunakan piring pemilihan. Berbanding kaedah konvensional, kaedah ini lebih ringkas dan telah mengurangkan beberapa langkah dalam sistem *Cre-loxP*.

Bagi menguji keefisienan *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* sebagai hos untuk penghasilan protein heterolog, kedua-dua strain telah ditransformasikan dengan plasmid ANIp2-cut yang membawa gen kutinase *G. cingulata*. Transforman prototrof uridina dipilih berdasarkan keupayaan untuk hidup di atas agar medium minimum tanpa urasil dan uridina. Integrasi vektor ANIp2-cut yang membawa gen kutinase ke dalam genom *A. niger* pula disahkan melalui analisis PCR. Kutinase heterolog diekspreskan oleh transforman daripada kedua-dua strain yang membawa plasmid ANIp2-cut menggunakan sistem kultur cecair permukaan statik. Sistem kultur cecair permukaan statik adalah kaedah di mana biojisim kultur fermentasi tumbuh pada permukaan medium cecair. Sistem ini tidak memerlukan goncangan fizikal kerana kulat secara semulajadinya wujud dalam bentuk berfilamen dan goncangan boleh memecahkan miselium (Jacob & Prema 2006). Oleh itu, kaedah pengkulturan ini lebih menjimatkan tenaga dan kos kerana penggoncang tidak diperlukan. Biojisim dan jumlah protein yang dirembeskan oleh kulat yang dikultur menggunakan kaedah

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

ini adalah lebih tinggi daripada kultur goncangan (Imanaka et al. 2010; Noh et al. 2012). Seterusnya, pengekspresan kutinase heterolog oleh transfoman *AnΔprtT* dan *A. niger* PY11 dianalisis. Kutinase *G. cingulata* bersaiz 21 kDa berjaya dikesan di dalam supernatan kultur kedua-dua strain melalui elektroforesis SDS-PAGE dan kehadirannya disahkan melalui analisis pemedapan Western. Kajian ini membuktikan bahawa penyahaktifan *prtT* tidak menjejaskan keupayaan mutan *AnΔprtT* untuk menghasilkan protein heterolog. Selain itu, berdasarkan analisis ke atas dua transforman bagi setiap strain yang dipilih, aktiviti kutinase daripada strain *AnΔprtT* didapati adalah lebih baik.

Secara umumnya, tahap penghasilan protein heterolog daripada *A. niger* adalah lebih rendah berbanding protein homolog disebabkan oleh degradasi proteolitik oleh protease natif yang dirembeskan ke dalam medium pengkulturan. Tambahan pula, *Aspergillus* berupaya merembeskan pelbagai jenis protease ekstra sel. Oleh sebab itu, degradasi proteolitik oleh protease kulat diakui sebagai salah satu daripada masalah utama yang mengganggu keefisienan penghasilan protein heterolog (Archer & Peberdy 1997; Gouka et al. 1997a; van den Hombergh et al. 1997b). Maka, pembangunan mutan kurang-protease untuk mengelakkan degradasi protease merupakan strategi yang praktikal untuk memperbaiki produktiviti protein heterolog. Kejayaan meningkatkan penghasilan protein heterolog oleh mutan kurang-protease berbanding strain kawalan dalam kulat telah dilaporkan oleh banyak pihak (Ganatra et al. 2011; Karnaukhova et al. 2007; Wang et al. 2008; Zhu et al. 2012). Sebagai contoh, peptidase tripeptidil, *AosedD* dalam *A. oryzae* telah dikenal pasti sebagai protease ekstra sel yang berpotensi menyebabkan degradasi protein heterolog. Penyahaktifan *AosedD* ternyata telah meningkatkan hasil protein rekombinan kimosin bovin (CHY) dan lisozim manusia (HLY) masing-masing sebanyak 2.9 dan 1.7 kali ganda berbanding strain kawalan (Zhu et al. 2012). Karnaukhova et al. (2007) pada asalnya cuba mengekspreskan perencat proteinase-α_1 manusia dalam *A. niger* strain AB4.1. Malangnya, aktiviti protein rekombinan tersebut gagal dikesan dalam medium kultur daripada transforman yang dipilih. Namun, apabila strain mutan kurang-protease D15#26 digantikan sebagai hos, perencat proteinase-α_1 manusia berjaya diekspreskan sebagai protein terglikosilasi yang aktif dan lebih stabil.

Ujian kestabilan kutinase *G. cingulata* terhadap aktiviti protease luar sel yang dirembeskan oleh hos masing-masing menunjukkan bahawa protein heterolog yang dihasikan oleh *An*Δ*prtT* lebih stabil berbanding *A. niger* PY11. Selepas dua minggu disimpan pada suhu 25°C, kutinase heterolog dalam supernatan kultur *An*Δ*prtT* masih mempunyai aktiviti 80% daripada aktiviti kutinase yang asal (sebelum penyimpanan bermula). Namun begitu, aktiviti proteolitik basal masih dikesan pada supernatan kultur *An*Δ*prtT* yang menunjukkan bahawa protease masih dihasilkan oleh mutan ini. Memandangkan terdapat pelbagai jenis protease serta proses-proses berbeza yang melibatkan langkah-langkah proteolisis, maka tidak hairanlah dikatakan bahawa pengawalaturan protease adalah kompleks (van den Hombergh et al. 1997b). Justeru, selain *prtT*, pasti terdapat faktor transkripsi lain yang turut terlibat dalam pengawalaturan pengekspresan protease luar sel dalam *A. niger*. Gen-gen pengawal atur domain-luas seperti *creA* (penindas katabolit karbon) dan *areA* (penindas metabolit nitrogen) juga dilaporkan memberikan kesan terhadap pengekspresan protease (Braaksma & Punt 2008).

Dalam *A. niger*, protease ekstra sel tertakluk kepada pengawalaturan yang kompleks pada tahap transkripsi. Protease juga boleh dikawal atur pada tahap translasi atau disintesiskan sebagai zimogen untuk menghalang aktivitinya sebelum ia sampai ke lokasi yang betul (van den Hombergh et al. 1997b). Selain itu, terdapat protease yang diaktifkan melalui tapak jalan proteolisis dan protein perencat mungkin juga mengawal aktiviti mereka. Aruhan spesifik-tapak jalan dan pengawalaturan domain luas memberikan gambaran bahawa sel biasanya menyesuaikan diri dengan metabolisme keseluruhannya untuk menggunakan nutrisi dengan cara tertentu atau dengan cara paling berkesan (van den Hombergh et al. 1997b). Transkripsi gen-gen protease ekstra sel dalam *A. niger* didapati sensitif terhadap sumber karbon dan nitrogen yang dibekalkan dalam medium manakala gen-gen yang mengekodkan protease intra sel pula tidak sensitif. Motif pengenalan konsensus bagi CREA (faktor perantara untuk penindasan katabolit karbon) ditemui pada kawasan promoter *pepA*, *pepB* dan *pepF* dalam *A. niger* walaupun fungsinya tidak diuji (Archer & Peberdy 1997). Bagi *prtT*, Parenicova dan van Peij (2007) telah mempatenkan penemuan tapak-tapak pengikatan DNA terpulihara pada kawasan promoter gen-gen protease yang diperlukan untuk pengaktifan transkripsi bergantung-*prtT* dalam *A. niger*.

Pembangunan mutan kurang-protease adalah cara yang berguna untuk mengurangkan degradasi protein heterolog dalam *Aspergillus*. Dalam *A. oryzae*, penyahaktifan sebanyak sepuluh gen protease telah memperbaiki penghasilan kimosin bovin dan lisozim manusia (Yoon et al. 2011). Namun, penyahaktifan gen-gen regulatori seperti *creA* dan *areA* tidak sesuai dilakukan untuk menjana strain kurang-protease kerana ia akan menyebabkan kecacatan pertumbuhan pleotrofik pada mutan-mutan tersebut (Braaksma & Punt 2008). Oleh itu, kajian ini telah menunjukkan bahawa penyahaktifan *prtT* yang mengawal atur pengekspresan gen-gen protease utama adalah cara yang lebih mudah dan efektif untuk mengurangkan kesan protease terhadap protein heterolog di dalam *A. niger*. Mutan *An*Δ*prtT* juga tidak menunjukkan perbezaan pertumbuhan berbanding strain induknya *A. niger* PY11.

6.8 KESIMPULAN

Mutan *An*Δ*prtT* telah berjaya ditransformasikan dengan plasmid ANEp-cre-ptrA bagi menghasilkan strain yang boleh mengekspreskan protein cre rekombinase. Enzim ini diperlukan untuk memangkinkan proses penyingkiran gen penanda *pyrG* daripada *An*Δ*prtT*. Kedua-dua strain auksotrof uridina iaitu *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* juga berjaya ditransformasi dengan plasmid ANIp2-cut yang membawa gen kutinase daripada *G. cingulata*. Analisis terhadap transfoman PY11- dan *An*Δ*prtT*-penghasil kutinase menunjukkan kedua-duanya berjaya mengekspreskan kutinase heterolog yang aktif. Hasil ini membuktikan bahawa penyahaktifan gen *prtT* sama sekali tidak mengurangkan keupayaan mutan *An*Δ*prtT* untuk mengekspreskan protein heterolog. Meskipun kutinase *G. cingulata* didapati stabil dalam kedua-dua supernatan kultur *A. niger* PY11 dan *An*Δ*prtT* pada suhu 4°C selama 6 minggu, namun protein heterolog tersebut didapati lebih stabil di dalam supernatan kultur *An*Δ*prtT* berbanding di dalam supernatan kultur *A. niger* PY11 pada suhu 25°C setelah dieram selama dua minggu.

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

BAB VII

PERBINCANGAN UMUM

Faktor transkripsi spesifik-protease, *prtT* telah dinyahaktifkan daripada genom *A. niger* PY11 bagi memahami peranan yang dimainkan oleh gen tersebut dalam pengawalaturan pengekspresan gen-gen protease. Mutan *AnΔprtT* yang terhasil disahkan melalui analisis PCR dan Southern. Penyahaktifan *prtT* ternyata mengurangkan aktiviti protease ekstra sel dalam mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11 dan ini dibuktikan melalui analisis pengasaian aktiviti proteolitik secara kualitatif dan kuantitatif. Namun, pengekspresan enzim-enzim yang terlibat dalam hidrolisis kanji seperti amilase dan α-glukosidase oleh *AnΔprtT* tidak terjejas akibat penyahaktifan gen *prt*T. Pertumbuhan PY11 dan *AnΔprtT* juga didapati setara dan ini membuktikan penyahaktifan gen *prt*T tidak memberi kesan terhadap pertumbuhan *A. niger*. Analisis transkripsi berbalik (RT-PCR) mendapati tahap pengekspresan protease ekstra sel utama seperti *pepA*, *pepB* dan *pepF* berkurangan dalam mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11. Ini menunjukkan bahawa pengekspresan *pepA*, *pepB* dan *pepF* dikawal atur pada peringkat transkripsi oleh faktor transkripsi *prtT*. Namun, mungkin tidak semua protease ekstra sel berada di bawah pengawalaturan pengekspresan oleh *prtT*. Pengekspresan protease ekstra sel seperti sedolisin, *sedB* dan peptidase dipeptidil, *dppV* dalam *A. fumigatus* didapati tidak bergantung secara eksklusif kepada *prtT* (Bergmann et al. 2009).

Pendekatan proteomik digunakan untuk mencirikan protease ekstra sel *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* melalui kaedah UPLC-nanoESI-MS/MS. Sekretom *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* dianalisis dan dibandingkan bagi sampel lima hari berturut-turut (hari ke-5 hingga 9). Antara 71 hingga 89 protein dikenal pasti daripada *A. niger* PY11 untuk kelima-lima hari, manakala antara 39 hingga 65 dikenal

pasti daripada mutan *AnΔprtT* untuk tempoh yang sama. Jumlah sekretom mutan *AnΔprtT* yang dikenal pasti lebih rendah daripada *A. niger* PY11 mungkin disebabkan kesan penyahaktifan *prtT*. Perbezaan yang paling ketara pada sekretom kedua-dua strain adalah pada bilangan protease yang ditemui. Secara purata, sebanyak 14 protease dikesan pada *A. niger* PY11 dalam sampel kelima-lima hari berbanding hanya 1 hingga 3 protease dikesan pada mutan *AnΔprtT*. Keadaan ini menjelaskan mengapa aktiviti protease ekstra sel mutan *AnΔprtT* berkurangan berbanding *A. niger* PY11.

Keseluruhannya, sebanyak 20 protease dikenal pasti dalam kajian ini dan kesemuanya diramalkan mempunyai isyarat peptida kecuali endopeptidase aspartik, PEPAb (206384). Kebanyakan protease yang ditemui adalah kumpulan eksopeptidase seperti karboksipeptidase dan peptidase tripeptidil yang biasanya aktif pada pH rendah. Ini menunjukkan bahawa protease asid lebih mendominasi kultur *A. niger* daripada protease neutral mahupun alkali. Masalah degradasi protein homolog dan heterolog yang diekspreskan oleh *A. niger* sering dikaitkan dengan aktiviti protease asidik (van den Hombergh et al. 1997b). Analisis sekretom *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* juga mengesan kehadiran banyak enzim selulase dan hemiselulase. Ini menunjukkan bahawa *A. niger* secara semula jadi berupaya menghasilkan pelbagai enzim pencerna-karbohidrat walaupun tidak dikultur dalam medium yang mengandungi lignoselulosa. Enzim-enzim yang terlibat dengan biogenesis dan degradasi dinding sel juga didapati dikawal atur naik dalam mutan *AnΔprtT* berbanding *A. niger* PY11. Respon ini mungkin disebabkan oleh penyahaktifan *prtT* yang mengakibatkan mutan *AnΔprtT* kekurangan enzim-enzim penting untuk mencerna protein. Oleh itu, mutan *AnΔprtT* melakukan penstrukturan semula dinding sel nya bagi mendapatkan sumber karbon alternatif.

Daripada 20 protease yang dikenal pasti, faktor transkripsi *prtT* berkemungkinan berfungsi mengawal atur pengekspresan 15 protease sahaja termasuk *pepA*, *pepB* dan *pepF* yang telah dipastikan melalui analisis transkripsi berbalik. Manakala 5 protease lagi tidak dikawal oleh *prtT*. Ini bermakna, pengawalaturan pengekspresan protease luar sel bukan dikawal atur secara eksklusif oleh *prtT* sahaja sebagaimana yang dilaporkan oleh Bergmann et al. (2009). Oleh kerana kajian ini,

hanya menumpukan kepada analisis sekretom, maka tidak diketahui sama ada *prtT* turut mengawal atur pengekspresan protease intra sel. Namun begitu, analisis terhadap kawasan promoter gen-gen protease putatif dalam genom *A. niger* telah menemui tapak pengikatan faktor transkripsi *prtT* pada beberapa protease intra sel dan protease vakuol (Parenicova & van Peij 2007).

Mutan *AnΔprtT* yang dijana dalam kajian ini mempunyai latar belakang strain yang berbeza dengan mutan yang dihasilkan oleh Punt et al. (2008). Mutan *prtT* yang dihasilkan oleh Punt et al. (2008) berasal daripada *A. niger* strain AB4.1 (*pyrG-*). Manakala, *AnΔprtT* berasal daripada *A. niger* strain PY11 (*cspA1*$^{-}$, *pyrG6*$^{-}$, *ΔglaA::HISG, ΔbglA::HISG)* yang telah dibangunkan dan dieksploitasi sebagai hos pengekspresan protein heterolog yang efisien. Penyahaktifan gen *prtT* yang dilakukan ke atas *A. niger* PY11 bertujuan untuk menambah baik kualiti strain sedia ada supaya penghasilan dan kualiti protein heterolog dapat dipertingkatkan. Analisis transkripsi berbalik (RT-PCR) mendapati transkrip *pepD* tidak dikesan dalam strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* sama ada dalam keadaan teraruh mahupun tidak teraruh. Hasil ini disokong oleh dapatan daripada analisis sekretom yang mendapati PEPD sememangnya tidak dikesan pada kedua-dua *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT*. Mungkin mutagenesis secara rawak menggunakan radiasi ultra lembayung ke atas *A. niger* strain PY11 yang menghasilkan mutasi pada gen *cspA1*$^{-}$ dan *pyrG6*$^{-}$ turut menyebabkan gangguan terhadap gen *pepD* secara tidak langsung. Ini menyebabkan pengekspresan transkrip *pepD* gagal dikesan dalam analisis transkripsi berbalik (RT-PCR). Sebaliknya, Punt et al. (2008) mendapati tahap pengekspresan transkrip *pepD* menurun dalam mutan *prtT* berbanding strain induknya.

Beberapa kajian telah membuktikan bahawa masalah degradasi protein heterolog oleh protease boleh diatasi dengan melakukan penyahaktifan gen-gen protease (Ganatra et al. 2011; Karnaukhova et al. 2007; Wang et al. 2008; Zhu et al. 2012). Justeru, keupayaan *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT* untuk berfungsi sebagai hos pengekspresan protein heterolog diuji. Kedua-dua strain ditransformasikan dengan gen kutinase *G. cingulata*. Kutinase heterolog bersaiz 21 kDa berjaya diekspreskan oleh kedua-dua strain dan hasil ini membuktikan bahawa penyahaktifan *prtT* tidak menjejaskan keupayaan mutan *AnΔprtT* untuk menghasilkan protein heterolog.

Kutinase heterolog yang dihasikan oleh *AnΔprtT* didapati lebih stabil terhadap aktiviti protease ekstra sel berbanding kutinase heterolog yang dihasilkan oleh *A. niger* PY11. Selepas 14 hari disimpan pada suhu 25°C, kutinase heterolog dalam supernatan kultur *AnΔprtT* masih mempunyai aktiviti 80% daripada aktiviti kutinase yang asal (sebelum penyimpanan bermula). Sebaliknya, supernatan kultur *A. niger* PY11 kehilangan lebih 50% daripada aktiviti kutinase yang asal hanya selepas 6 hari penyimpanan. Kestabilan kutinase *G. cingulata* dalam supernatan kultur *AnΔprtT* mungkin disumbangkan oleh pengurangan aktiviti protease luar sel yang juga disebabkan oleh pengurangan jumlah protease yang dirembeskan oleh mutan.

Secara umumnya, pengawalaturan protease dalam *A. niger* adalah kompleks. Dalam kajian ini, penyahaktifan *prtT* didapati tidak menghapuskan aktiviti protease ekstra sel sepenuhnya. Aktiviti proteolitik basal masih dikesan pada supernatan kultur *AnΔprtT* dan ini menunjukkan bahawa protease masih dihasilkan oleh mutan. Selain *prtT*, pasti terdapat faktor transkripsi lain yang turut terlibat dalam pengawalaturan pengekspresan protease luar sel dalam *A. niger*. Peranan gen-gen regulatori domain-luas seperti *creA* (penindas katabolit karbon) dan *areA* (penindas metabolit nitrogen) yang turut memberi kesan kepada pengekspresan protease tidak boleh dinafikan.

Kajian ini membuktikan bahawa strategi penambahbaikan strain melalui penjanaan strain kurang-protease membantu meningkatkan penghasilan dan kestabilan kutinase *G. cingulata* dalam *A. niger*. Strategi bioproses dan pengoptimuman keadaan pengkulturan juga boleh digabungkan untuk mengurangkan aktiviti protease. Namun, selain daripada degradasi proteolitik, faktor-faktor lain juga penting untuk pengoptimuman penghasilan protein heterolog dalam kulat berfilamen. Faktor yang menyebabkan masalah kepada penghasilan protein yang diingini perlu dinilai untuk setiap protein individu untuk memperoleh hasil yang maksimum. Pada masa akan datang, data proteomik yang sedia ada mungkin boleh diintegrasikan dengan data daripada teknologi 'omik' lain seperti transkriptomik dan metabolomik. Maklumat yang diperoleh boleh dieksploitasi untuk meningkatkan lagi kapasiti *A. niger* sebagai hos pengekspresan selain dapat membantu menjawab segala persoalan biologi dan meningkatkan pemahaman berkenaan sistem pengekspresan kulat ini.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

BAB VIII

KESIMPULAN

Mutan kurang-protease, *AnΔprtT* telah dibangunkan melalui penyahaktifan gen *prtT* mengekod faktor transkripsi yang mengawal atur pengekspresan gen-gen protease dalam *A. niger*. *AnΔprtT* mempamerkan fenotip mutan apabila menunjukkan pengurangan aktiviti protease ekstra sel berbanding *A. niger* PY11. Faktor transkripsi *prtT* didapati mengawal atur sekurang-kurangnya 15 protease ekstra sel yang dipastikan melalui analisis perbandingan sekretom *A. niger* PY11 dan mutan *AnΔprtT*. Protein-protein tersebut termasuklah endopeptidase aspartik, pepA (201655); karboksipeptidase S1 (214460); peptidase tripeptidil, sed2 (211032); peptidase tripeptidil, s8 (55493); peptidase tripeptidil, s8 (55133); karboksipeptidase serina (46979); endoprotease s28 (52703); peptidase tripeptidil, sed2 (52700); peptidase tripeptidil, sed2 (55665); karboksipeptidase serina (56689); endopeptidase aspartik (53364); protease aspartik, pepAc (189966); karboksipeptidase serina, pepF (56161); karboksipeptidase serina (41638); aspergillopepsin-2, pepB (52082). Penghasilan kutinase heterolog daripada *G. cingulata* yang diekspreskan oleh *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* meningkat kepada masing-masing 20 dan 36 kali ganda lebih tinggi berbanding strain induk tak tertransformasi. Kutinase heterolog yang dihasikan oleh *AnΔprtT* didapati lebih stabil terhadap aktiviti protease ekstra sel berbanding kutinase heterolog yang dihasilkan oleh *A. niger* PY11. Kutinase heterolog dalam supernatan kultur *AnΔprtT* masih mempunyai aktiviti 80% daripada aktiviti kutinase yang asal (sebelum penyimpanan bermula) selepas 14 hari disimpan pada suhu 25°C. Manakala, kutinase heterolog dalam supernatan kultur *A. niger* PY11 hanya mempunyai aktiviti yang boleh diabaikan (kurang daripada 3%) pada suhu dan tempoh penyimpanan yang sama. Kesimpulannya, pengurangan aktiviti protease ekstra sel dalam *A. niger* dapat meningkatkan aktiviti dan kestabilan protein heterolog.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

RUJUKAN

Abremski, K., Hoess, R. & Sternberg, N. 1983. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32: 1301–1311.

Adams, D. J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150(7): 2029–2035.

Adav, S. S., Li, A. A., Manavalan, A., Punt, P. & Sze, S. K. 2010. Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. *Journal of Proteome Research* 9(8): 3932–3940.

Andersen, M. R., Salazar, M. P., Schaap, P. J., van de Vondervoort, P. J. I., Culley, D., Thykaer, J., Frisvad, J. C., Nielsen, K.F., Albang, R., Albermann, K., Berka, R.M., Braus, G.H., Braus-Stromeyer, S.A., Corrochano, L.M., Dai, Z., van Dijck, P.W.M., Hofmann, G., Lasure, L.L., Magnuson, J.K., Menke, H., Meijer, M., Meijer, S.L., Nielsen, J.B., Nielsen, M.L., van Ooyen, A.J.J., Pel, H.J., Poulsen, L., Samson, R.A., Stam, H., Tsang, A., van den Brink, J.M., Atkins, A., Aerts, A., Shapiro, H., Pangilinan, J., Salamov, A., Lou, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Grimwood, J., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P., Martinez, D., van Peij, N.N.M.E., Roubos, J.A., Nielsen, J. & Baker, S.E. 2011. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Research* 21(6): 885–897.

Archer, D. B., MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J. & Roberts, I. N. 1992. Proteolytic degradation of heterologous proteins expressed in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 14(5): 357–362.

Archer, D. B. & Peberdy, J. F. 1997. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* 17(4): 273–306.

Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J. & Nash, C. 1993. Infection strategies of *Colletotrichum* species. Dlm. Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (pnyt.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, hlm. 88–120. Wallingford: CAB International.

Bartling, S., van den Hombergh, J. P., Olsen, O., von Wettstein, D. & Visser, J. 1996. Expression of an *Erwinia* pectate lyase in three species of *Aspergillus*. *Current Genetics* 29(5): 474–481.

Bergmann, A., Hartmann, T., Cairns, T., Bignell, E. M. & Krappmann, S. 2009. A regulator of *Aspergillus fumigatus* extracellular proteolytic activity is dispensable for virulence. *Infection and Immunity* 77(9): 4041–4050.

Berka, R. M., Ward, M., Wilson, L. J., Hayenga, K. J., Kodama, K. H., Carlomagno, L. P. & Thompson, S. A. 1990. Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene* 86(2): 153–162.

Bhardwaj, H., Gupta, R. & Tiwari, A. 2013. Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. *Journal of Polymers and the Environment* 21(2): 575–579.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Boeke, J. D., La Croute, F. & Fink, G. R. 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5′-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular and General Genetics* 197(2): 345–346.

Bos, C. J., Debets, A. J., Swart, K., Huybers, A., Kobus, G. & Slakhorst, S. M. 1988. Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. *Current Genetics* 14(5): 437–443.

Braaksma, M., Martens-Uzunova, E. S., Punt, P. J. & Schaap, P. J. 2010. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. *BMC Genomics* 11(1): 584.

Braaksma, M. & Punt, P. 2008. *Aspergillus* as a cell factory for protein production: controlling protease activity in fungal production. Dlm. Goldman, G.H & Osmani, S.A. (pnyt.). *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods*, hlm. 441–455. Boca Raton: CRC Press.

Braaksma, M., Smilde, A. K., van der Werf, M. J. & Punt, P. J. 2009. The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger*. *Microbiology* 155(10): 3430–3439.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry 72*: 248–54.

Broekhuijsen, M. P., Mattern, I. E., Contreras, R., Kinghorn, J. R. & van den Hondel, C. A. 1993. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *Journal of Biotechnology* 31(2): 135–145.

Carvalho, C. M. L., Aires-Barros, M. R. & Cabral, J. M. S. 1998. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(3): 28–29.

Chen, S., Su, L., Chen, J. & Wu, J. 2013. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances* 31(8): 1754–1767.

Chiba, Y., Midorikawa, T. & Ichishima, E. 1995. Cloning and expression of the carboxypeptidase gene from *Aspergillus saitoi* and determination of the catalytic residues by site-directed mutagenesis. *The Biochemical Journal* 308(2): 405–409.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Chin, I.-S., Abdul Murad, A. M., Mahadi, N. M., Nathan, S. & Abu Bakar, F. D. 2013. Thermal stability engineering of *Glomerella cingulata* cutinase. *Protein Engineering, Design & Selection*□26(5): 369–375.

Choi, J., Détry, N., Kim, K.-T., Asiegbu, F. O., Valkonen, J. P. T. & Lee, Y.-H. 2014. Fungal peroxidase database for comparative genomics. *BMC microbiology* 14(1): 117.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Christensen, T. & Hynes, M. J. 2000. Fungus wherein the *areA* gene has been modified and an *areA* gene from *Aspergillus oryzae*. US patent 6025185.

Christensen, T., Hynes, M. J. & Davis, M. A. 1998. Role of the regulatory gene areA of *Aspergillus oryzae* in nitrogen metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9): 3232–3237.

Conesa, A., Jeenes, D., Archer, D. B., van den Hondel, C. A. M. J. J. & Punt, P. J. 2002. Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 846–851.

Conesa, A., Punt, P. J., van Luijk, N. & van den Hondel, C. A. 2001. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genetics and Biology* 33(3): 155–171.

Coughlan, C. M., Walker, J. L., Cochran, J. C., Wittrup, K. D. & Brodsky, J. L. 2004. Degradation of mutated bovine pancreatic trypsin inhibitor in the yeast vacuole suggests post-endoplasmic reticulum protein quality control. *The Journal of Biological Chemistry* 279(15): 15289–15297.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Cullen, P. J., Sabbagh, W., Graham, E., Irick, M. M., van Olden, E. K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L. & Sprague, G.F. 2004. A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes and Development* 18(14): 1695–1708.

d'Enfert, C. 1996. Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5′-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. *Current Genetics* 30(1): 76–82.

de Oliveira, J. M. P. F., van Passel, M. W. J., Schaap, P. J. & de Graaff, L. H. 2011. Proteomic analysis of the secretory response of *Aspergillus niger* to D-maltose and D-xylose. *PloS one* 6(6): 20865.

de Vries, R. P., van den Broeck, H. C., Dekkers, E., Manzanares, P., de Graaff, L. H. & Visser, J. 1999. Differential expression of three alpha-galactosidase genes and a single beta-galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6): 2453–2460.

de Vries, R. P. & Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(4): 497–522.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(4): 19–21.

Demain, A. L. & Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27(3): 297–306.

Dennison, P. M. J., Ramsdale, M., Manson, C. L. & Brown, A. J. P. 2005. Gene disruption in *Candida albicans* using a synthetic, codon-optimised Cre-loxP system. *Fungal Genetics and Biology* 42(9): 737–748.

Dowzer, C. E. & Kelly, J. M. 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Cell Biology* 11(11): 5701–5709.

Dunn-Coleman, N. S., Bloebaum, P., Berka, R. M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G.L. & LaCost, R. 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Biotechnology* 9(10): 976–981.

Dutta, K., Sen, S. & Veeranki, V. D. 2009. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry* 44(2): 127–134.

Eng, J. K., McCormack, A. L. & Yates, J. R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5(11): 976–989.

Esposito, R. E. & Klapholz, S. 1981. Meiosis and ascospore development. Dlm. Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R. (pnyt.). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, hlm. 211–287. New York: Cold Spring Harbor Press.

Falony, G., Armas, J. C., Mendoza, J. C. D. & Hernandez, J. L. M. 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 235–240.

Farah Diba, A. B., Cooper, D. M., Zamrod, Z., Mahadi, N. M. & Sullivan, P. A. 2001. Cloning and characterization of the cutinase-encoding gene and cDNA from the fungal phytopathogen *Glomerella cingulata*. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 9: 119–130.

Fleissner, A. & Dersch, P. 2010. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4): 1255–1270.

Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R. & Carucci, D.J. 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419(6906): 520–526.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Forment, J. V, Ramón, D. & MacCabe, A. P. 2006. Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/loxP system. *Current Genetics* 50(3): 217–224.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Fowler, T., Rey, M. W., Vähä-Vahe, P., Power, S. D. & Berka, R. M. 1993. The *catR* gene encoding a catalase from *Aspergillus niger* primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Molecular Microbiology* 9(5): 989–998.

Frederick, G. D., Rombouts, P. & Buxton, F. P. 1993. Cloning and characterisation of *pepC*, a gene encoding a serine protease from *Aspergillus niger*. *Gene* 125(1): 57–64.

Fukushima, Y., Itoh, H., Fukase, T. & Motai, H. 1989. Continuous protease production in a carbon limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 604–608.

Ganatra, M. B., Vainauskas, S., Hong, J. M., Taylor, T. E., Denson, J.-P. M., Esposito, D., Read, J. D., Schmeisser, H., Zoon, K.C., Hartley, J.L. & Taron, C.H. 2011. A set of aspartyl protease-deficient strains for improved expression of heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 11(2): 168–178.

Gao, J., Opiteck, G. J., Friedrichs, M. S., Dongre, A. R. & Hefta, S. A. 2003. Changes in the protein expression of yeast as a function of carbon source. *Journal of Proteome Research* 2(6): 643–649.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W. & Gygi, S. P. 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12): 6940–6945.

Gomi, K., Akeno, T., Minetoki, T., Ozeki, K., Kumagai, C., Okazaki, N. & Iimura, Y. 2000. Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene, amyR, involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64(4): 816–827.

Gordon, C. L., Khalaj, V., Ram, A. F. J., Archer, D. B., Brookman, J. L., Trinci, A. P. J., Jeenes, D. J., Doonan, J.H., Wells, B., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. & Robson, G.D. 2000. Glucoamylase::green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology* 146(2): 415–426.

Gouka, R. J., Punt, P. J., Hessing, J. G. & van den Hondel, C. A. 1996. Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6): 1951–1957.

Gouka, R. J., Punt, P. J. & van den Hondel, C. A. 1997a. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47(1): 1–11.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Gouka, R. J., Punt, P. J. & van den Hondel, C. A. 1997b. Glucoamylase gene fusions alleviate limitations for protein production in *Aspergillus awamori* at the transcriptional and (post) translational levels. *Applied and Environmental Microbiology* 63(2): 488–497.

Grimm, L. H., Kelly, S., Krull, R. & Hempel, D. C. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(4): 375–384.

Guillemette, T., van Peij, N. N. M. E., Goosen, T., Lanthaler, K., Robson, G. D., van den Hondel, C. A. M. J. J., Stam, H. & Archer, D.B. 2007. Genomic analysis of the secretion stress response in the enzyme-producing cell factory *Aspergillus niger*. *BMC Genomics* 8(1): 158.

Gyamerah, M., Merichetti, G., Adedayo, O., Scharer, J. M. & Moo-Young, M. 2002. Bioprocessing strategies for improving hen egg-white lysozyme (HEWL) production by recombinant *Aspergillus niger* HEWL WT-13-16. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(4): 403–407.

Hagag, S., Kubitschek-Barreira, P., Neves, G. W. P., Amar, D., Nierman, W., Shalit, I., Shamir, R., Lopes-Bezerra, L. & Osherov, N. 2012. Transcriptional and proteomic analysis of the *Aspergillus fumigatus* Δ*prtT* protease-deficient mutant. *PloS one* 7(4): 33604.

Hammel, K. E. & Cullen, D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3): 349–355.

Hampton, R. Y. 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 14(4): 476–482.

Han, Y., Wilson, D. B. & Lei, X. gen. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(5): 1915–1918.

Hashimoto, J. G., Beadles-Bohling, A. S. & Wiren, K. M. 2004. Comparison of RiboGreen and 18S rRNA quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *BioTechniques* 36(1): 54-60.

Helenius, A. & Aebi, M. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry* 73: 1019–1049.

Hoess, R. H. & Abremski, K. 1985. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Molecular Biology* 181(3): 351–362.

Hondmann, D. H. . & Visser, J. 1994. Carbon metabolism. Dlm. Martinelli, S.D. & Kinghorn, J.R. (pnyt.). *In Aspergillus: 50 Year On*, hlm. 61–139. Amsterdam: Elsevier.

Hong, E., Davidson, A. R. & Kaiser, C. A. 1996. A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *The Journal of Cell Biology* 135(3): 623–633.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Hong, S., Cho, E.-M., Song, S.-E. & Eom, C.-Y. 2008. Molecular cloning of a putative gene encoding phospholipase B (plbA) from *Aspergillus nidulans*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(3): 189–194.

Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. & Graham Cooks, R. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*□ 40(4): 430–443.

Hynes, M. J. 1996. Genetic transformation of filamentous fungi. *Journal of Genetics* 75(3): 297–311.

Imanaka, H., Tanaka, S., Feng, B., Imamura, K. & Nakanishi, K. 2010. Cultivation characteristics and gene expression profiles of *Aspergillus oryzae* by membrane-surface liquid culture, shaking-flask culture, and agar-plate culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(3): 267–273.

Inoue, H., Kimura, T., Makabe, O. & Takahashi, K. 1991. The gene and deduced protein sequences of the zymogen of *Aspergillus niger* acid proteinase A. *The Journal of Biological Chemistry* 266(29): 19484–19489.

Jackson, D. P. & Cotter, D. A. 1984. Expression of proteolytic enzymes during *Dictyostelium discoideum* spore germination. *Archives of Microbiology* 137: 205–208.

Jacob, N. & Prema, P. 2006. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Steptomyces lydicus*. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 263–267.

Jacobs, D. I., Olsthoorn, M. M. A., Maillet, I., Akeroyd, M., Breestraat, S., Donkers, S., van der Hoeven, R. A. M., van den Hondel, C.A.M.J.J., Kooistra, R., Lapointe, T., Menke, H., Meulenberg, R., Misset, M., Muller, W.H., van Peij, N.N.M.E., Ram, A., Rodriguez, S., Roelofs, M.S., Roubos, J.A., van Tilborg, M.W.E.M., Verkleij, A.J., Pel, H.J., Stam, H. & Sagt, C.M.J. 2009. Effective lead selection for improved protein production in *Aspergillus niger* based on integrated genomics. *Fungal Genetics and Biology*□ 46(1): 141–152.

Jarai, G. & Buxton, F. 1994. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Current Genetics* 26(3): 238–244.

Jarai, G., Kirchherr, D. & Buxton, F. P. 1994a. Cloning and characterization of the *pepD* gene of *Aspergillus niger* which codes for a subtilisin-like protease. *Gene* 139(1): 51–57.

pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Jarai, G., van den Hombergh, H. & Buxton, F. P. 1994b. Cloning and characterization of the *pepE* gene of *Aspergillus niger* encoding a new aspartic protease and regulation of *pepE* and *pepC*. *Gene* 145(2): 171–178.

Jaton-Ogay, K., Paris, S., Huerre, M., Quadroni, M., Falchetto, R., Togni, G., Latgé, J. P. & Monod, M. 1994. Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology* 14(5): 917–928.

Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K.-Q. & Yang, J. 2013. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnology Advances* 31(8): 1562–1574.

Jin, F. J., Maruyama, J.-I., Juvvadi, P. R., Arioka, M. & Kitamoto, K. 2004. Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 239(1): 79–85.

John, M. E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research* 20(9): 2381.

Karnaukhova, E., Ophir, Y., Trinh, L., Dalal, N., Punt, P. J., Golding, B. & Shiloach, J. 2007. Expression of human alpha1-proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories* 6(1): 34.

Karpievitch, Y. V, Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D. & Dabney, A. R. 2010. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: biological and technological aspects. *The Annual of Applied Statistics* 4(4): 1797–1823.

Katz, M. E., Flynn, P. K., vanKuyk, P. A. & Cheetham, B. F. 1996. Mutations affecting extracellular protease production in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular & General Genetics* 250(6): 715–724.

Kim, S., Matsuo, I., Ajisaka, K., Nakajima, H. & Kitamoto, K. 2002. Cloning and characterization of the *nagA* gene that encodes beta-n-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66(10): 2168–2175.

Kim, Y., Nandakumar, M. P. & Marten, M. R. 2007. Proteomics of filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* 25(9): 395–400.

Kniemeyer, O. 2011. Proteomics of eukaryotic microorganisms: the medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics* 11(15): 3232–3243.

Koushki, M. M., Rouhani, H. & Farsi, M. 2011. Genetic manipulation of fungal strains for the improvement of heterologous genes expression (a mini-review). *African Journal of Biotechnology* 10(41): 7939–7948.

Krappmann, S. 2007. Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. *Fungal Biology Reviews* 21(1): 25–29.

Krappmann, S., Bayram, O. & Braus, G. H. 2005. Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus veA* locus via a novel recyclable marker module. *Eukaryotic Cell* 4(7): 1298–1307.

Krishnan, S. & Vijayalakshmi, M. A. 1985. Purification of an acid protease and a serine carboxypeptidase from *Aspergillus niger* using metal-chelate affinity chromatography. *Journal of Chromatography* 329(1): 165–170.

Kruse, K. B., Brodsky, J. L. & McCracken, A. A. 2006. Characterization of an ERAD gene as VPS30/ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human alpha-1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ. *Molecular Biology of the Cell* 17(1): 203–212.

Kubodera, T., Yamashita, N. & Nishimura, A. 2002. Transformation of *Aspergillus sp.* and *Trichoderma reesei* using the pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66(2): 404–406.

Kück, U. & Hoff, B. 2010. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(1): 51–62.

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S. & Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification* 41(1): 38–44.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685.

Lahjouji, K., Storms, R., Xiao, Z., Joung, K.-B., Zheng, Y., Powlowski, J., Tsang, A. & Varin, L. 2007. Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(2): 337–346.

Lambert, J. M., Bongers, R. S. & Kleerebezem, M. 2007. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(4): 1126–1135.

Langer, S. J. 2002. A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites. *Nucleic Acids Research* 30(14): 3067–3077.

Lata, C., Negi, D.S. & Mehrotra, V. 2014. Potential of microbial proteases. *Indian Streams Research Journal*. 4(2): 1-4

Lehmbeck, J. 2001. Alkaline protease deficient filamentous fungi. *US patent* (US6291209).

Lin, D., Tabb, D. L. & Yates, J. R. 2003. Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1646(1-2): 1–10.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Liu, F., Li, W., Ridgway, D., Gu, T. & Moo-Young, M. 1998. Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using cell immobilization. *Biotechnology Letters* 20(6): 539–542.

Lombraña, M., Moralejo, F. J., Pinto, R. & Martín, J. F. 2004. Modulation of *Aspergillus awamori* thaumatin secretion by modification of *bipA* gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5145–5152.

Long, H., Wang, T. & Zhang, Y. 2008. Isolation of *Trichoderma reesei pyrG* negative mutant by UV mutagenesis and its application in transformation. *Chemical Research in Chinese Universities* 24(5): 565–569.

Lu, X., Sun, J., Nimtz, M., Wissing, J., Zeng, A.-P. & Rinas, U. 2010. The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microbial Cell Factories* 9: 23.

Lubertozzi, D. & Keasling, J. D. 2009. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances* 27(1): 53–75.

Lundgren, D. H., Hwang, S.-I., Wu, L. & Han, D. K. 2010. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Review of Proteomics* 7(1): 39–53.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

MacRae, W. D., Buxton, F. P., Gwynne, D. I. & Davies, R. W. 1993. Heterologous protein secretion directed by a repressible acid phosphatase system of *Aspergillus niger*. *Gene* 132(2): 193–198.

Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M. & Porro, D. 2012. Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology* 824: 329–358.

Mattern, I. E., van Noort, J. M., van den Berg, P., Archer, D. B., Roberts, I. N. & van den Hondel, C. A. 1992. Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Molecular and General Genetics* 234(2): 332–336.

McKenna, T., Campuzano, I., Ritchie, M., Young, P., Geromanos, S., Silva, J., Riley, T., Neeson, K., Denney, R., Richardson, K. & Langridge, J. 2004. The Waters® protein expression system for qualitative and quantitative proteomics. Technical Note of Waters Corporation.

Melin, P., Stratford, M., Plumridge, A. & Archer, D. B. 2008. Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of *Aspergillus niger* to weak-acid preservatives. *Microbiology* 154(4): 1251–1257.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Meyer, V. 2008. Genetic engineering of filamentous fungi-progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* 26(2): 177–185.

Meyer, V., Wu, B. & Ram, A. F. J. 2011. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters* 33(3): 469–476.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Mizutani, O., Masaki, K., Gomi, K. & Iefuji, H. 2012. Modified Cre-loxP recombination in *Aspergillus oryzae* by direct introduction of Cre recombinase for marker gene rescue. *Applied and Environmental Microbiology* 78(12): 4126–4133.

Monod, M., Jousson, O. & Reichard, U. 2009. *Aspergillus fumigatus* secreted proteases. Dlm. Latgé, J.P. & Steinbach, W.J. (pnyt.). *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis*, hlm. 87–106. Washington: ASM Press.

Moralejo, F. J., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Lombraña, M., Fierro, F. & Martín, J. F. 2002. Silencing of the aspergillopepsin B (*pepB*) gene of *Aspergillus awamori* by antisense RNA expression or protease removal by gene disruption results in a large increase in thaumatin production. *Applied and Environmental Microbiology* 68(7): 3550–3559.

Moralejo, F. J., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Sisniega, H., Faus, I. & Martín, J. F. 2000. Overexpression and lack of degradation of thaumatin in an aspergillopepsin A-defective mutant of *Aspergillus awamori* containing an insertion in the *pepA* gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(6): 772–777.

Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah

Moralejo, F., Watson, A., Jeenes, D., Archer, D. & Martín, J. 2001. A defined level of protein disulfide isomerase expression is required for optimal secretion of thaumatin by *Aspergillus awamori*. *Molecular Genetics and Genomics* 266(2): 246–253.

Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101(5): 451–454.

Müller, H. M. 1985. Utilization of gluconate by *Aspergillus niger*. I. Enzymes of phosphorylating and nonphosphorylating pathways. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 140(6): 475–84.

Jisha, V.N., Smitha, R.B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K.N, Sajith, S., Priji, P.,Josh, M.S. & Benjamin, S. 2013. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research* 1(3): 39–51.

Nathiya, K., Nath, S.S. & Palaniswamy, J.A.A.M. 2011. Screening of a high glutaminolytic enzyme producing strain and its extracellular production by solid state fermentation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(3): 297-302.

Nesvizhskii, A. I., Vitek, O. & Aebersold, R. 2007. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature Methods* 4(10): 787–797.

Nevalainen, H. & Peterson, R. 2014. Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology* 5: 75.

Nevalainen, K. M. H. 2001. Strain improvement in filamentous fungi-an overview. *Applied Mycology and Biotechnology* 1: 289–304.

Nevalainen, K. M. H. & Te'o, V. S. J. 2003. Enzyme production in industrial fungi-moleular genetic strategies for integrated strain improvement. *Applied Mycology and Biotechnology* 3: 241–259.

Nevalainen, K. M. H., Te'o, V. S. J. & Bergquist, P. L. 2005. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* 23(9): 468–474.

Nirmal, N. P., Shankar, S. & Laxman, R. S. 2011. Fungal Proteases: An Overview. *International Journal of Biotechnology and Biosciences* 1(1): 1-40.

Nitsche, B. M., Jørgensen, T. R., Akeroyd, M., Meyer, V. & Ram, A. F. J. 2012. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics* 13(1): 380.

Noble, S. M. & Johnson, A. D. 2005. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 4(2): 298–309.

Noh, A. M., Jahim, J. M., Murad, A. M. A. & Bakar, F. D. A. 2012. Effect of various cultivation methods on cellobiohydrolase production from *Aspergillus niger*. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* 2(4): 16-19.

North, M. J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiological Reviews* 46(3): 308–340.

Nyon, M. P., Rice, D. W., Berrisford, J. M., Hounslow, A. M., Moir, A. J. G., Huang, H., Nathan, S., Mahadi, N.M., Farah Diba, A.B. & Craven, C.J. 2009. Catalysis by *Glomerella cingulata* cutinase requires conformational cycling between the active and inactive states of its catalytic triad. *Journal of Molecular Biology* 385(1): 226–235.

Nyon, M. P., Rice, D. W., Berrisford, J. M., Huang, H., Moir, A. J. G., Craven, C. J., Nathan, S., Mahadi, N.M. & Farah Diba, A.B. 2008. Crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant *Glomerella cingulata* cutinase. *Acta Crystallographica.* 64(6): 504–508.

O'Donnell, D., Wang, L., Xu, J., Ridgway, D., Gu, T. & Moo-Young, M. 2001. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. *Biochemical Engineering Journal* 8(3): 187–193.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Oh, S. S. L., Bakar, F. D. A., Adnan, A. M., Mahadi, N. M., Hassan, O. & Murad, A. M. A. 2009. Isolation and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Trichoderma virens* UKM1. *Biotechnology* 8: 194–203.

Oh, S. S. L., Leong, J. M., Murad, A. M. A., Mahadi, N. M. & Bakar, F. D. A. 2011. Cloning and analysis of *pyrG* gene encoding orotidine 5-monophosphate decarboxylase of *Aspergillus oryzae* strain S1. *Sains Malaysiana* 40(4): 337–343.

Oh, S. S. L., Storms, R., Yun, Z., Mohd Rodzi, M.R., Mahadi, N. M., Illias, R. M., Murad, A. M. A & Abu Bakar, F.D. 2013. Development of a *pyrG* mutant of *Aspergillus oryzae* strain S1 as a host for the production of heterologous proteins. *The Scientific World Journal* 2013:1-7

Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinsky, J. R., Resing, K. A. & Ahn, N.G. 2005. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* 4(10): 1487–1502.

Panda, T. & Gowrishankar, B. S. 2005. Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(2): 160–169.

Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22(3): 189–259.

Papagianni, M., Joshi, N. & Moo-Young, M. 2002. Comparative studies on extracellular protease secretion and glucoamylase production by free and immobilized *Aspergillus niger* cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29(5): 259–263.

Papagianni, M. & Moo-Young, M. 2002. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochemistry* 37(11): 1271–1278.

Parenicova, L. & Van Peij, N. N. M. E. 2007. DNA binding site of a transcriptional activator useful in gene expression. *Patent* WO/2007/062936.

Pasa-Tolić, L., Masselon, C., Barry, R. C., Shen, Y. & Smith, R. D. 2004. Proteomic analyses using an accurate mass and time tag strategy. *BioTechniques* 37(4): 621–636.

Patel, R. D., Lodge, J. K. & Baker, L. G. 2010. Going green in *Cryptococcus neoformans*: the recycling of a selectable drug marker. *Fungal Genetics and Biology*□ 47(3): 191–198.

Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A.E., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Debets, A.J.M., Dekker, P., van Dijck, P.W.M., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J.M.,

d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S.P., de Groot, P.W.J., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P.T.W., van den Hondel, C.A.M.J.J., van der Heijden, R.T.J.M., van der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J.E.C., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N.M.E., Ram, A.F.J., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M.J., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van den Vondervoort, P.J.J., Wedler, H., Wosten, H.A.B., Zeng, A.P., van Ooyen, A.J.J., Visser, J. and Stam, H. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology* 25(2): 221–231.

Penalva, M. A. & Arst, H. N. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3): 426–446.

Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20(18): 3551–3567.

Petersen, K. L., Lehmbeck, J. & Christensen, T. 1999. A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*. *Molecular and General Genetics* 262(4-5): 668–676.

Pitt, J. J. 2009. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 30(1): 19–34.

Porteus, B., Kocharunchitt, C., Nilsson, R. E., Ross, T. & Bowman, J. P. 2011. Utility of gel-free, label-free shotgun proteomics approaches to investigate microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(2): 407–416.

Prabha, V. L. & Punekar, N. S. 2004. Genetic transformation in *Aspergilli*: tools of the trade. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 41(5): 205–215.

Punt, P. J., Schuren, F. H. J., Lehmbeck, J., Christensen, T., Hjort, C. & van den Hondel, C. A. M. J. J. 2008. Characterization of the *Aspergillus niger prtT*, a unique regulator of extracellular protease encoding genes. *Fungal Genetics and Biology*□ 45(12): 1591–1599.

Punt, P. J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J. & van den Hondel, C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology* 20(5): 200–206.

Punt, P. J., Zegers, N. D., Busscher, M., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. M. J. J. 1991. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans gpdA* gene. *Journal of Biotechnology* 17(1): 19–33.

Purdy, R. E. & Kolattukudy, P. E. 1975. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani f. pisi*. *Biochemistry* 14(13): 2824–2831.

Radulovic, D., Jelveh, S., Ryu, S., Hamilton, T. G., Foss, E., Mao, Y. & Emili, A. 2004. Informatics platform for global proteomic profiling and biomarker discovery using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*□ 3(10): 984–997.

Radzio, R. & Kück, U. 1997. Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi. *Process Biochemistry* 32(6): 529–539.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 597–635.

Roberts, I. N., Jeenes, D. J., MacKenzie, D. A., Wilkinson, A. P., Sumner, I. G. & Archer, D. B. 1992. Heterologous gene expression in *Aspergillus niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic prophospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. *Gene* 122(1): 155–161.

Romanos, M. A., Scorer, C. A. & Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8(6): 423–488.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Romijn, E. P., Krijgsveld, J. & Heck, A. J. R. 2003. Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics. *Journal of Chromatography A* 1000(1-2): 589–608.

Ruijter, G. J. . & Visser, J. 1997. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiology Letters* 151(2): 103–114.

Sauer, B. 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 7(6): 2087–2096.

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. & Van Dijck, P. W. M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(4-5): 426–435.

Selina Oh Siew Ling. 2012. Development of the filamentous fungi, *Trichoderma* and *Aspergillus* expression system for heterologous protein production. Tesis Doktor Falsafah, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Sharma, R., Katoch, M., Srivastava, P. S. & Qazi, G. N. 2009. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(12): 2083–2094.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Sharon, H., Hagag, S. & Osherov, N. 2009. Transcription factor *PrtT* controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* 77(9): 4051–4060.

Shen, D.-K., Noodeh, A. D., Kazemi, A., Grillot, R., Robson, G. & Brugère, J.-F. 2004. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* 239(1): 87–93.

Shoji, J., Arioka, M. & Kitamoto, K. 2008. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnology Letters* 30(1): 7–14.

Shroff, R. A., O'Connor, S. M., Hynes, M. J., Lockington, R. A. & Kelly, J. M. 1997. Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 22(1): 28–38.

Singh, A., Ghosh, V. & Ghosh, P. 1994. Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology* 18: 177–180.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98(3): 503–517.

Steiger, M. G., Vitikainen, M., Uskonen, P., Brunner, K., Adam, G., Pakula, T., Penttilä, M., Saloheimo, M., Mach, R.L. & Mach-Aigner, A.R. 2011. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Applied and Environmental Microbiology* 77(1): 114–121.

Sternberg, N. & Hamilton, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. *Journal of Molecular Biology* 150(4): 467–486.

Storms, R., Zheng, Y., Li, H., Sillaots, S., Martinez-Perez, A. & Tsang, A. 2005. Plasmid vectors for protein production, gene expression and molecular manipulations in *Aspergillus niger*. *Plasmid* 53(3): 191–204.

Sung, M. K. & Jung, H. K. 1997. Peroxidative activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase. *Molecules and Cells* 7(1): 120–124.

Takahashi, T., Hatamoto, O., Koyama, Y. & Abe, K. 2004. Efficient gene disruption in the koji-mold *Aspergillus sojae* using a novel variation of the positive-negative method. *Molecular Genetics and Genomics* 272(3): 344–352.

Te'o, V. S., Cziferszky, A. E., Bergquist, P. L. & Nevalainen, K. M. 2000. Codon optimization of xylanase gene *xynB* from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* for expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters* 190(1): 13–19.

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. et al. 1995. The *Aspergillus PacC* zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal* 14(4): 779–790.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9): 4350–4354.

Tsang, A., Butler, G., Powlowski, J., Panisko, E. A. & Baker, S. E. 2009. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genetics and Biology*□ 46(1): 153–160.

Tuli, L., Tsai, T.-H., Varghese, R. S., Xiao, J. F., Cheema, A. & Ressom, H. W. 2012. Using a spike-in experiment to evaluate analysis of LC-MS data. *Proteome Science* 10: 13.

Valkonen, M., Ward, M., Wang, H., Penttilä, M. & Saloheimo, M. 2003. Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger var. awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12): 6979–6786.

van den Brink, H. J. M., Petersen, S. G., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K. & Harboe, M. 2006. Increased production of chymosin by glycosylation. *Journal of Biotechnology* 125(2): 304–310.

van den Hombergh, J. P., Jarai, G., Buxton, F. P. & Visser, J. 1994. Cloning, characterization and expression of *pepF*, a gene encoding a serine carboxypeptidase from *Aspergillus niger*. *Gene* 151(1-2): 73–79.

van den Hombergh, J. P., Sollewijn Gelpke, M. D., van de Vondervoort, P. J., Buxton, F. P. & Visser, J. 1997a. Disruption of three acid proteases in *Aspergillus niger*-effects on protease spectrum, intracellular proteolysis, and degradation of target proteins. *European Journal of Biochemistry* 247(2): 605–613.

van den Hombergh, J. P., van de Vondervoort, P. J., Fraissinet-Tachet, L. & Visser, J. 1997b. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in Biotechnology* 15(7): 256–263.

van den Hombergh, J. P., van de Vondervoort, P. J., van der Heijden, N. C. & Visser, J. 1995. New protease mutants in *Aspergillus niger* result in strongly reduced in vitro degradation of target proteins; genetical and biochemical characterization of seven complementation groups. *Current Genetics* 28(4): 299–308.

van Peij, N. N. M. E. & Parenicova, L. 2006. Fungal transcriptional activators useful in methods for producing a polypeptide. *Patent* WO/2006/040312.

van Peij, N. N. M. E., Visser, J. & de Graaff, L. H. 1998. Isolation and analysis of *xln R*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology* 27(1): 131–142.

vanKuyk, P. A., Cheetham, B. F. & Katz, M. E. 2000. Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases. *Fungal Genetics and Biology* 29(3): 201–210.

Verdoes, J. C., Punt, P. J., Burlingame, R., Bartels, J., Van Dijk, R., Slump, E., Meens, M., Joosten, R. & Emalfarb, M. 2007. A dedicated vector for efficient library construction and high throughput screening in the hyphal fungus *Chrysosporium lucknowense*. *Indian Biotechnology* 3: 48–57.

Vongsangnak, W., Salazar, M., Hansen, K. & Nielsen, J. 2009. Genome-wide analysis of maltose utilization and regulation in *Aspergilli*. *Microbiology* 155(12): 3893–3902.

Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. & Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10(13): 1793–1808.

Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. & Moo-Young, M. 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances* 23(2): 115–129.

Wang, Y., Xue, W., Sims, A. H., Zhao, C., Wang, A., Tang, G., Qin, J. & Wang, H. 2008. Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression. *Fungal Genetics and Biology* 45(1): 17–27.

Ward, O. P. 2012. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 30(5): 1119–1139.

Ward, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J. & Singh, A. 2005. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. Dlm. Laskin, A.I., Bennett, J.W., Gadd, G.M. & Sariaslani, S. (pnyt.). *Advances in Applied Microbiology*, hlm. 1–75. Amsterdam: Academic Press.

Ward, P. P., Piddington, C. S., Cunningham, G. A., Zhou, X., Wyatt, R. D. & Conneely, O. M. 1995. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Biotechnology* 13(5): 498–503.

Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A. & Ridgway, H. J. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research* 16(1): 31–44.

Wendland, J. 2003. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. *Current Genetics* 44(3): 115–123.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Xie, F., Liu, T., Qian, W.-J., Petyuk, V. A. & Smith, R. D. 2011. Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics. *The Journal of Biological Chemistry* 286(29): 25443–25449.

Xu, J., Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. & Moo-Young, M. 2000. Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. *Biotechnology Progress* 16(2): 222–227.

Yates, J. R., Ruse, C. I. & Nakorchevsky, A. 2009. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* 11: 49–79.

Yoon, J., Aishan, T., Maruyama, J. & Kitamoto, K. 2010. Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene *Aovps10*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(17): 5718–5727.

Yoon, J., Maruyama, J. & Kitamoto, K. 2011. Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(3): 747–759.

Yuan, X.-L., van der Kaaij, R. M., van den Hondel, C. A. M. J. J., Punt, P. J., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. & Ram, A. F. J. 2008. *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel alpha-glucan acting enzymes with unexpected expression profiles. *Molecular Genetics and Genomics*□ 279(6): 545–561.

Zhang, J., Gonzalez, E., Hestilow, T., Haskins, W. & Huang, Y. 2009. Review of peak detection algorithms in liquid-chromatography-mass spectrometry. *Current Genomics* 10(6): 388–401.

Zhang, X., Fang, A., Riley, C. P., Wang, M., Regnier, F. E. & Buck, C. 2010. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics-a review. *Analytica Chimica Acta* 664(2): 101–113.

Zhou, J., Lin, C., Zheng, X., Lin, X., Sang, W., Wang, S., Wang, Z., Daniel, E. & Guo-dong, L. 2009. Functional analysis of an alpha-1,2-mannosidase from *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics* 55(4): 485–496.

Zhu, L., Nemoto, T., Yoon, J., Maruyama, J. & Kitamoto, K. 2012. Improved heterologous protein production by a tripeptidyl peptidase gene (*AosedD*) disruptant of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 58(3): 199–209.

Zhu, W., Smith, J. W. & Huang, C.-M. 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1-6.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN A

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

MEDIUM PENGKULTURAN

Kaldu Luria Bertani (LB)

	Per 1000 mL
Tripton	10 g
Yis ekstrak	5 g
NaCl	10 g

Kesemua bahan di atas dilarutkan di dalam air suling dan ditetapkan kepada pH 7.5, lalu diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Medium disimpan pada suhu 4°C.

Kaldu LB-Ampisilin

Sama seperti di atas. Selepas diautoklaf medium disejukkan pada suhu 60°C sebelum ditambahkan dengan 1 mL ampisilin 50 mg/mL. Medium disimpan pada suhu 4°C.

Agar LB

Sama seperti kaldu LB dan ditambahkan dengan 15 g agar sebelum dilarutkan dan diautoklaf. Selepas diautoklaf, medium disejukkan pada suhu 60°C sebelum dituang ke dalam piring agar.

Agar LB-Ampisilin

Sama seperti kaldu LB ampisilin dan ditambahkan 15 g agar sebelum dilarutkan dan diautoklaf. Selepas diautoklaf, medium disejukkan pada suhu 60°C sebelum ditambahkan dengan 1 mL ampisilin 50 mg/mL dan dituang ke dalam piring agar.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Medium A (medium penyediaan sel kompeten)

	Per 200 mL
Glukosa	0.4 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Tripton	2.0 g
Yis ekstrak	1.0 g
NaCl	2.0 g

Medium A adalah kaldu LB diperkaya dengan 0.2% glukosa dan 10 mM $MgSO_4$. $7H_2O$. Kesemua bahan di atas dilarutkan di dalam air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Medium disimpan pada suhu 4°C.

Medium B (medium penyediaan sel kompeten)

	Per 200 mL
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Tripton	2.0 g
Yis ekstrak	1.0 g
NaCl	2.0 g
Gliserol	82 mL

Medium B adalah kaldu LB pH 7 diperkaya dengan 36% gliserol, 12% PEG (MW 7500) dan 12 mM $MgSO_4.7H_2O$. Kesemua bahan di atas dilarutkan di dalam 58 mL air suling dan pH diselaraskan pada 7.0 sebelum diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Selepas diautoklaf, medium disejukkan pada suhu 60°C sebelum ditambah dengan 60 mL PEG (MW 7500) yang telah disteril menggunakan membran penapis berukuran 0.45 µm. Medium disimpan pada suhu 4°C.

Kaldu medium lengkap (ML)

	Per 1000 mL
Larutan garam 20X	50 mL
Larutan magnesium sulfat 2.25 M	5 mL
Glukosa	10 g
Larutan unsur surih Hunter's	1 mL
Baktopepton	2 g

Yis ekstrak	1 g
Casamino asid	1 g
Larutan vitamin	1 mL

Kesemua bahan di atas dilarutkan dalam air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Medium disimpan pada suhu 4°C.

Agar medium lengkap (ML)

Sama seperti kaldu ML dan ditambahkan dengan 15 g agar sebelum dilarutkan dan diautoklaf. Selepas diautoklaf, medium disejukkan pada suhu 60°C sebelum dituang ke dalam piring agar.

Larutan garam 20X

	Per 1000 mL
Sodium nitrat ($NaNO_3$)	120 g
Potasium klorida (KCl)	10.4 g
Potasium fosfat (monobasic) (KH_2PO_4)	16.3 g
Potasium fosfat (dibasic) (K_2HPO_4)	20.9 g

Kesemua bahan di atas dilarutkan dalam air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan disimpan pada suhu 4°C.

Larutan unsur surih Hunter's

	Per 100 mL
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Zink Sulfat)	2.2 g
H_3BO_3 (Asid Borik)	1.1 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Manganous Klorida)	0.5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Ferrous Sulfat)	0.5 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Cobaltous Klorida)	0.16 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Kuprik Sulfat)	0.16 g
$(NH_4)_6Mo_2O_{24} \cdot 4H_2O$ (Ammonium molibdate)	0.11 g
EDTA, garam tetrasodium	6.5 g
EDTA, garam disodium	0.77 g

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kesemua bahan di atas ditambah mengikut urutan satu persatu dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan disimpan pada suhu 4°C. Larutan mulanya berwarna hijau dan akan beransur-ansur bertukar menjadi warna ungu selepas 1 jam pada 4°C.

Larutan vitamin

	Per 200 mL
Piridoksin –HCl	0.02 g
Tiamin-HCl	0.03 g
Asid p-aminobenzoik	0.15 g
Asid nikotinik	0.5 g
Riboflavin	0.5 g
Kolin-HCl	4.0 g
Stok biotin (50 mg/ 100 mL)	10 mL

Kesemua bahan di atas ditambah ke dalam botol kaca dan dibalut botol tersebut dengan kertas aluminium untuk melindungi larutan daripada cahaya. Larutan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan disimpan pada suhu 4°C.

Larutan Magnesium sulfat 2.25 M

	Per 200 mL
Magnesium sulfat (heptahidrat) ($MgSO_4.7H_2O$)	111 g

Bahan di atas ditambah ke dalam 100 mL air suling sebelum dipanaskan. Larutan tidak perlu dibiarkan sehingga mendidih. Setelah larut, larutan dicukupkan supaya menjadi 200 mL dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan disimpan pada suhu bilik.

Larutan garam/Tween

	1000 mL
NaCl	5 g
Larutan Tween 80 1% (i/i)	2 mL

Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kesemua bahan di atas dilarutkan dalam air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan disimpan pada suhu bilik.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kaldu medium minimum (MM)

	1000 mL
Larutan garam 20X	50 mL
Stok unsur surih Hunter's	1 mL
Larutan magnesium sulfat 2.25 M	5 mL
Sumber karbon (x %)	x g

Kesemua bahan di atas ditambahkan ke dalam air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit.

Agar medium minimum (MM)

Sama seperti kaldu MM dan ditambahkan dengan 15 g agar sebelum dilarutkan dan diautoklaf. Selepas diautoklaf, medium disejukkan pada suhu 60°C sebelum dituang ke dalam piring agar.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Agar MM-KCl

	Per 1000 mL
Larutan garam 20X	50 mL
Larutan magnesium sulfat 2.25 M	5 mL
Stok unsur surih Hunter's	1 mL
Glukosa	10 g
KCl	44.7 g
Agar	15 g

Kesemua bahan di atas ditambahkan ke dalam air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit.

Agar MM + kasein + gelatin

	Per 1000 mL
Larutan garam 20X	50 mL
Larutan magnesium sulfat 2.25 M	5 mL
Stok unsur surih Hunter's	1 mL

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Larutan vitamin	1 mL
Kasein	10 g
Kasamino asid	5 g
Gelatin	10 g
Triton X-100	0.1 mL
Agar	15 g

Kesemua bahan di atas ditambahkan ke dalam air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit.

Medium minimum J (MMJ)

	1000 mL
Larutan garam 20X	200 mL
Stok unsur surih Hunter's	4 mL
Maltosa (15%)	150 g

Kesemua bahan di atas ditambahkan ke dalam 980 mL air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Setelah sejuk pada suhu 60°C, 20 mL larutan magnesium sulfat 2.25 M steril ditambahkan ke dalam larutan MMJ.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN B

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LARUTAN DAN PENIMBAL

Larutan dan penimbal untuk penyediaan sferoplas dan transformasi kulat:

$MgSO_4$ 0.6 M

Sebanyak 147.89 g $MgSO_4.7H_2O$ ditimbang dan ditambahkan dengan air suling sehingga menjadi 1 L dan diautoklaf pada 121°C selama 20 minit. Larutan disimpan pada 4°C.

NaH_2PO_4 0.5 M

Sebanyak 6.9 g $NaH_2PO_4.H_2O$ ditimbang dan ditambahkan dengan air suling sehingga menjadi 100 mL.

Na_2HPO_4 0.5 M

Sebanyak 44.5 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ ditimbang dan ditambahkan dengan air suling sehingga menjadi 500 mL.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Medium Osmotik I (OM I)

NaH_2PO_4 0.5 M	5 mL
Na_2HPO_4 0.5 M	26.2 mL

Kesemua bahan di atas dicampurkan dan ditambah dengan air suling sehingga menjadi 500 mL. Larutan diautoklaf pada 121°C selama 20 minit.

Medium Osmotik II (OM II)

Sebanyak 591.55 g $MgSO_4.7H_2O$ dicampurkan dan ditambah dengan air suling sehingga menjadi 1 L. Larutan diautoklaf pada 121°C selama 20 minit.

Medium Osmotik (OM)

OM I	320 mL
OM II	500 mL

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kesemua bahan di atas dicampurkan dan ditambah dengan air suling sehingga menjadi 1 L.

Larutan S/C

Sorbitol	1 M
Kalsium klorida	50 mM

Larutan TB

	Per 500 mL
Sorbitol	54.66 g
Tris-HCl 1 M (pH 7.5)	50 mL

Kesemua bahan di atas dicampurkan dan ditambah dengan air suling sehingga menjadi 500 mL. Larutan diautoklaf pada 115°C selama 15 minit.

Penimbal untuk ekstraksi DNA serta elektroferesis sampel DNA dan RNA:

Penimbal ekstraksi DNA

Tris-HCl (pH 8)	0.05 M
EDTA (pH 8)	0.05 M
NaCl	0.5 M

Stok penimbal EDTA 0.5 M (pH 8)

Sebanyak 14.6 g EDTA ditimbang dan ditambahkan dengan air suling sehingga menjadi 100 mL. pH penimbal dilaraskan kepada 8.0 dengan pepejal sodium hidroksida sebelum diautoklaf pada 121°C selama 20 minit.

Penimbal TAE 50X

	Per 1000 mL
Tris-base, pH 8.0	242 g
Asid asetik glasial	57.1 mL
EDTA 0.5 M (pH 8)	100 mL

Kesemua bahan di atas dicampurkan dan ditambah dengan air suling sehingga menjadi 1 L. Larutan diautoklaf pada 115°C selama 15 minit.

Penimbal TAE 1X

Disediakan dengan mencairkan penimbal TAE 50X

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Penimbal muatan

Bromofenol biru	0.25%
Sukrosa	40%

Penimbal TE

Tris-HCl (pH 8)	10 mM
EDTA	1 mM

Penimbal MOPS 10X (pH 7) (1000 mL)

MOPS [asid 3-(N-morfolino) propanasulfonik]	0.2 M
Natrium asetat	0.05 M
EDTA	0.01 M

Penimbal MOPS 1X (1000 mL)

Penimbal MOPS 10X	100 mL
Formaldehid 37%	20 mL
Air-bebas RNase	880 mL

Penimbal muatan RNA 5X (10 mL)

Bromofenol biru	16 µL
EDTA 0.5 M (pH 8)	80 µL
Formaldehid 37%	720 µL
Gliserol 100%	2 mL
Formamida	3084 µL
Penimbal FA 10X	4 mL

Larutan-larutan di dalam pemblotan Southern:

Larutan depurinasi

HCl	0.25 M

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Larutan penyahaslian

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

Larutan peneutralan (pH 7.5)

NaCl	1.5 M
Tris-HCl	0.5 M

Larutan SSC 20X (pH 7)

Natrium sitrat	0.3 M
Natrium klorida	3.0 M

Larutan SSC 10X, 6X, 5X dan 2X

Disediakan dengan mencairkan larutan 20X SSC

Larutan-larutan di dalam penyediaan gel dan elektroforesis SDS-PAGE:

Akrilamida 30%

Akrilamida (Promega, USA) sebanyak 29.2 g dan 0.8 g N'N-bis akralamida (Promega, USA) dilarutkan di dalam 70 mL air suling terlebih dahulu sebelum dilaraskan pada jumlah isipadu 100 mL dengan air suling. Larutan ini disterilkan dengan membran penapis bersaiz 0.45 μm dan stabil disimpan gelap pada suhu 4°C selama 3 bulan.

Tris 1.5 M (pH 8.8)

Bes Tris (Trizma Base) (Merck, Jerman) sebanyak 18.15 g dilarutkan di dalam 70 mL air suling terlebih dahulu. pH dilaraskan pada 8.8 sebelum jumlah isipadu larutan ditambah menjadi 100 mL dengan air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan ini stabil disimpan pada suhu 4°C untuk jangkamasa panjang.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Tris 0.5 M (pH 6.8)

Bes Tris ((Trizma Base) (Merck, Jerman) sebanyak 6 g dilarutkan di dalam 70 mL air suling terlebih dahulu. pH dilaraskan pada 6.8 sebelum jumlah isipadu larutan ditambah menjadi 100 mL dengan air suling dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan ini stabil disimpan pada suhu 4°C untuk jangkamasa panjang.

Penimbal SDS-PAGE 5X (Running Buffer)

	Per 1000 mL
Bes Tris	15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g

Kesemua bahan dilarutkan di dalam air suling dan ditapis steril dengan membran penapis bersaiz 0.4 µm. Larutan ini stabil disimpan pada suhu bilik selama 3 bulan. Penimbal SDS-PAGE 1X disediakan dengan mencairkan penimbal SDS-PAGE 5X.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Larutan Coomasie Brilliant Blue R250

	Per 100 mL
Coomasie Brilliant Blue R250	0.25 g
Metanol	50 mL
Asid asetik glasial	10 mL

Kesemua bahan di atas dilarutkan di dalam 40 mL air suling dan ditapis dengan kertas turas Whatman 3 M. Larutan ini boleh diguna semula dan stabil disimpan pada suhu bilik.

Larutan penyahwarna

	Per 1000 mL
Metanol	250 mL
Asid asetik glasial	70 mL
Air suling	680 mL

Kesemua bahan dicampurkan bersama dan stabil disimpan pada suhu bilik.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Penimbal sampel 2X

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

	Per 10 mL
Tris 0.5 M (pH 6.8)	2.5 mL
SDS	0.4 g
Gliserol	2.0 mL
β-merkaptoetanol	0.2 mL
Bromofenol biru	0.001 g

Kesemua bahan dilarutkan di dalam air suling dan dialikuot ke dalam tiub eppendorf 1.5 mL. Penimbal ini stabil disimpan pada suhu -20°C.

Larutan-larutan di dalam pemedapan Western:

Penimbal pemindah atau penimbal Towbin

	Per 1200 mL
5X larutan penimbal SDS-PAGE	200 mL
Metanol	200 mL
Air suling	800 mL

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Kesemua bahan di atas dicampurkan bersama dan stabil disimpan pada suhu bilik.

Larutan penimbal penyekat (blocking buffer)

Sebanyak 1 g susu skim dilarutkan di dalam 25 mL larutan penimbal fosfat (PBS) 1X. Larutan ini disediakan segar sebelum digunakan.

Larutan salin fosfat berpenimbal 5X (pH 7.5) (PBS)

	Per 1000 mL
Na_2HPO_4	59.3 g
NaH_2PO_4	15.6 g
NaCl	29.2 g

Kesemua bahan di atas dilarutkan di dalam air suling dan dilaraskan pada pH 7.5 sebelum diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit. Larutan ini stabil disimpan pada suhu bilik selama 3 bulan. Larutan PBS 1X disediakan dengan mencairkan larutan PBS 5X.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Larutan salin fosfat berpenimbal Tween 20 5X (PBST)

Penyediaan sama seperti larutan salin fosfat berpenimbal 5X (pH 7.5). Setelah sejuk, 5 mL Tween 20 dicampurkan ke dalam larutan. Larutan ini stabil disimpan pada suhu bilik selama 3 bulan. Larutan PBST 1X disediakan dengan mencairkan larutan PBST 5X.

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

LAMPIRAN C

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

PENYEDIAAN GEL PEMISAH DAN GEL PEMAMPAT

1. Penyediaan 12% gel pemisah di dalam elektroforesis gel SDS-PAGE:

	2 gel	4 gel
Air suling	3.43 mL	6.86 mL
Akrilamida 30%	4.0 mL	8.0 mL
Tris 1.5 M (pH 8.8)	2.5 mL	5.0 mL
SDS 10%	50 µL	100 µL
Ammonium persulfat 10% (segar)	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL
Jumlah	10 mL	20 mL

2. Penyediaan 5% gel pemampat di dalam elektroforesis gel SDS-PAGE:

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

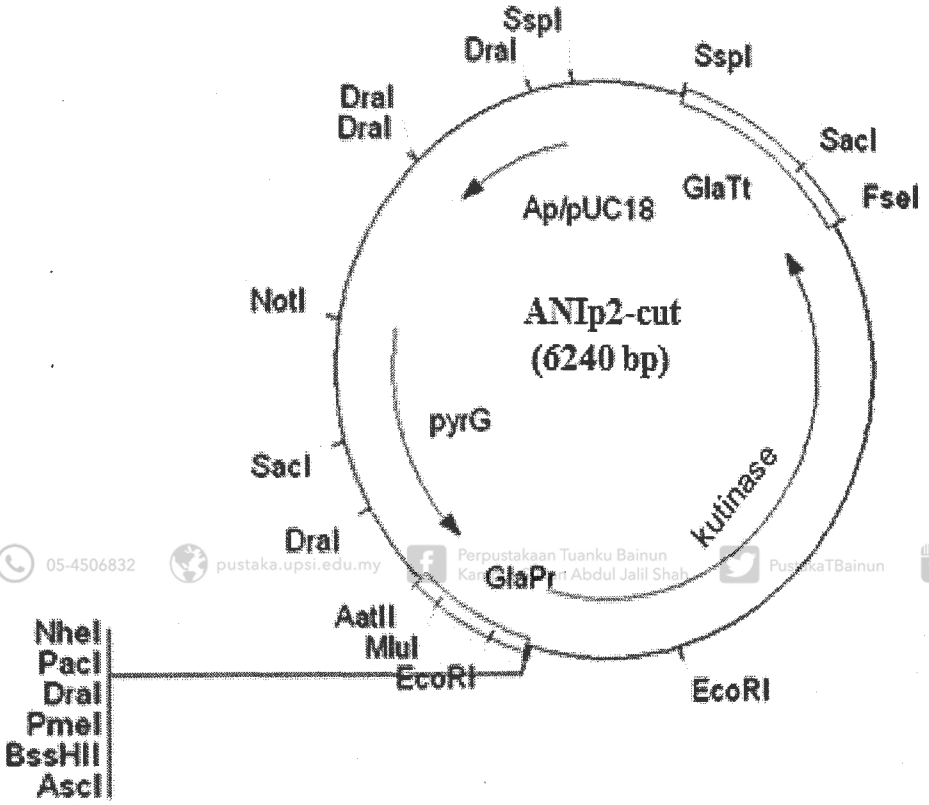
	2 gel	4 gel
Air suling	2.7 mL	5.4 mL
Akrilamida 30%	670 µL	1.34 mL
Tris 0.5 M (pH 6.8)	500 µL	1.0 mL
SDS 10%	50 µL	100 µL
Ammonium persulfat 10% (segar)	50 µL	100 µL
TEMED	2.0 µL	4.0 µL
Jumlah	4 mL	8 mL

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN D

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

PETA PLASMID ANIp2-cut



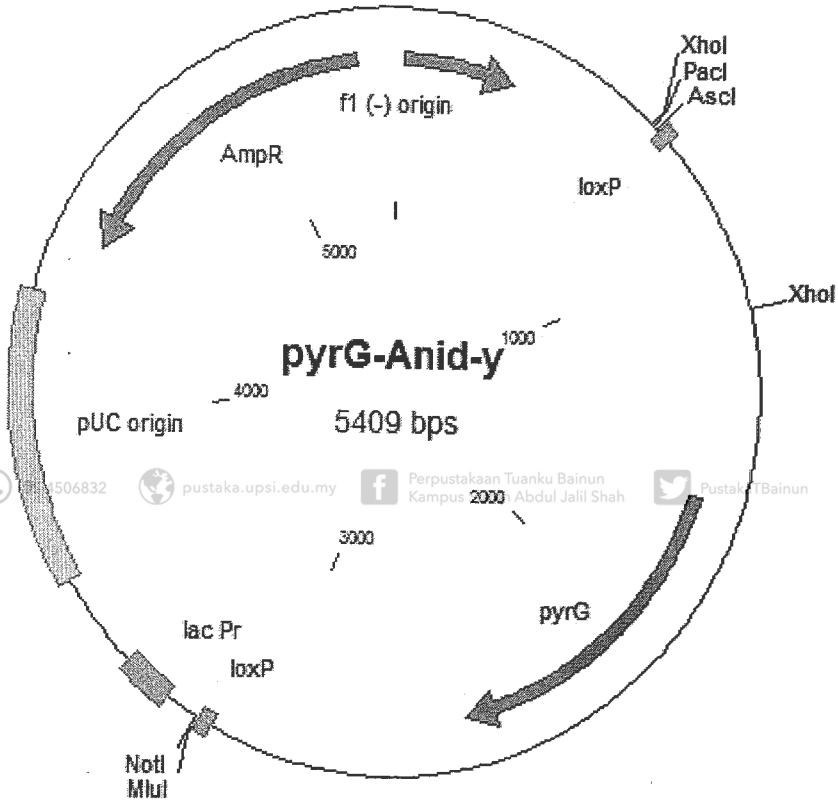
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN E

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

PETA PLASMID pyrG-Anid



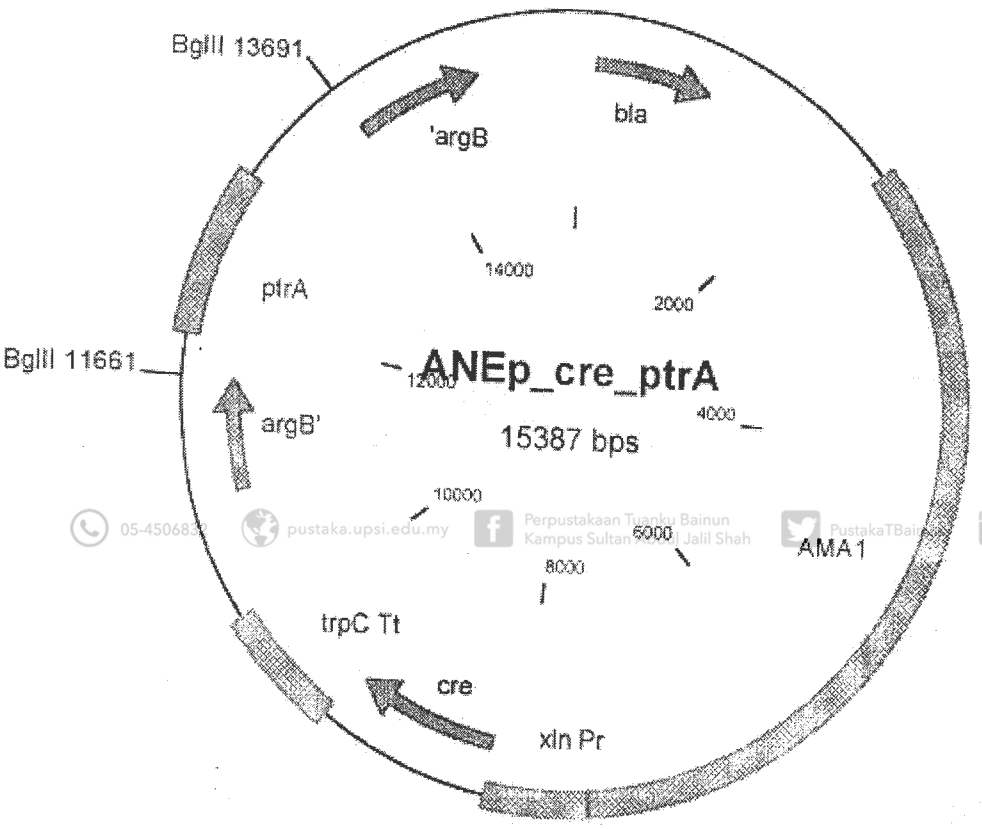
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN F

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

PETA PLASMID ANEp-Cre-ptrA

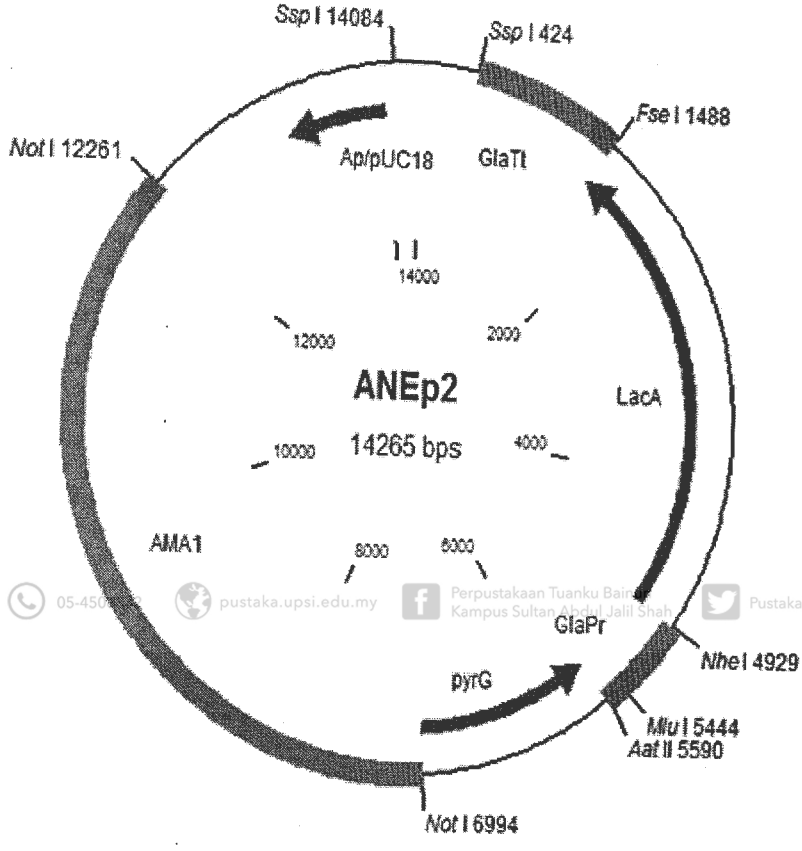


05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN G

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

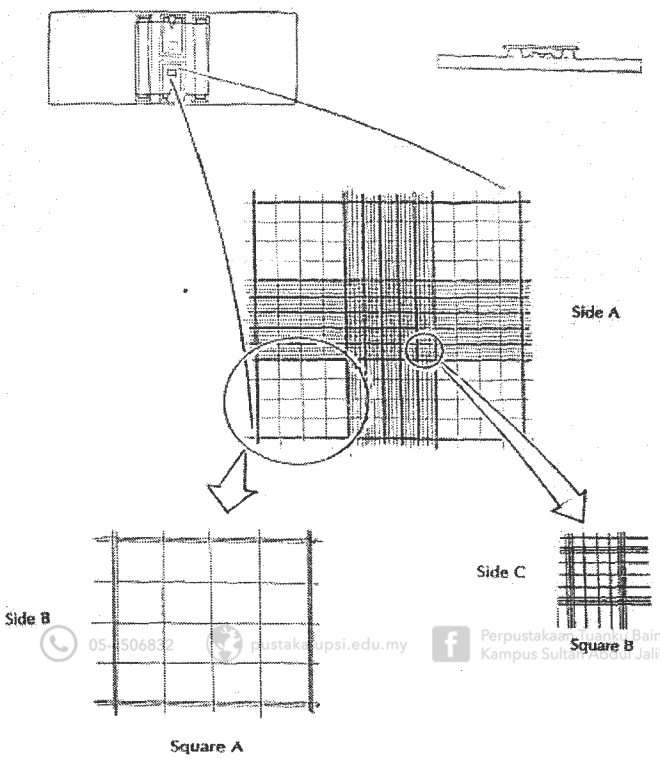
PETA PLASMID ANEp2

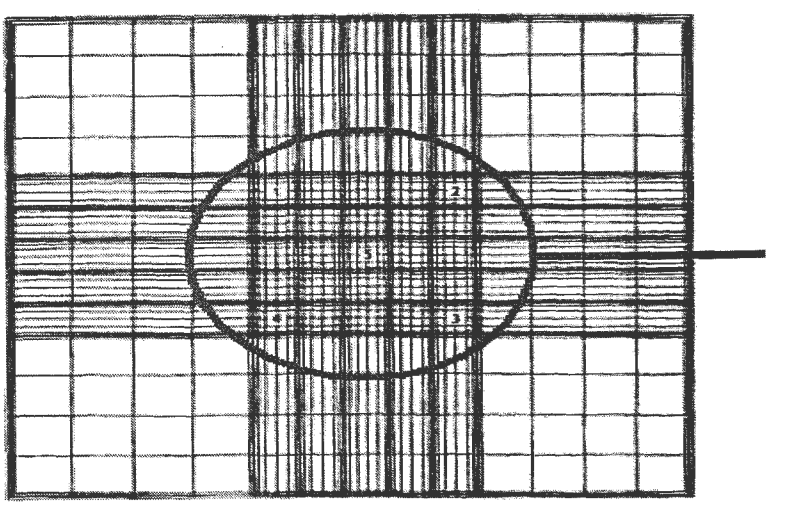


05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN H

PENGIRAAN KONIDIA DAN SFEROPLAS





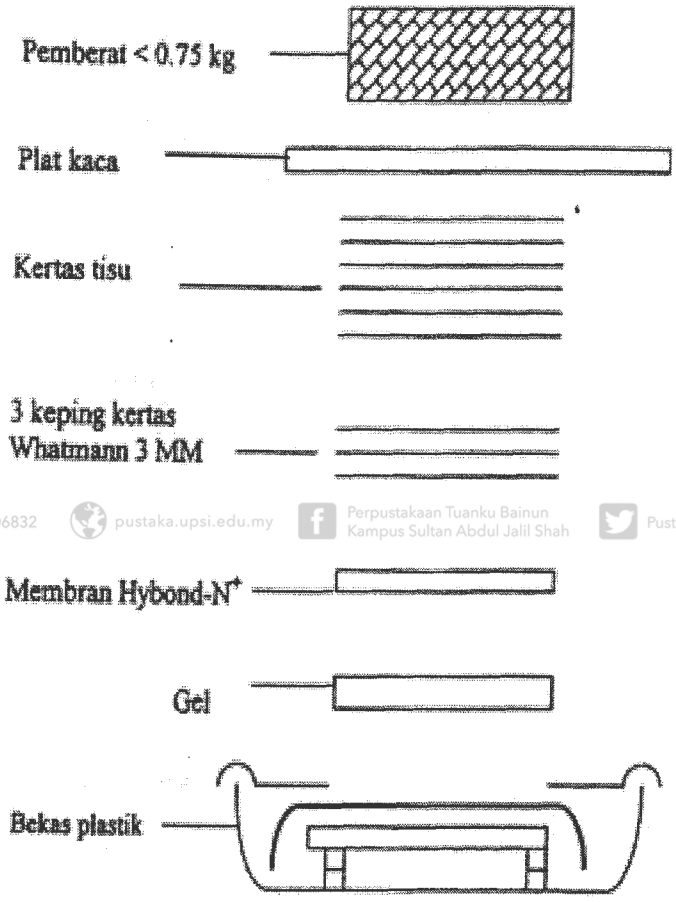
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Bilangan konidia / mL = (bilangan konidia dalam 5 kotak / 5) x 25 x pencairan x 10^4

LAMPIRAN I

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

RAJAH PEMBLOTAN KAPILARI



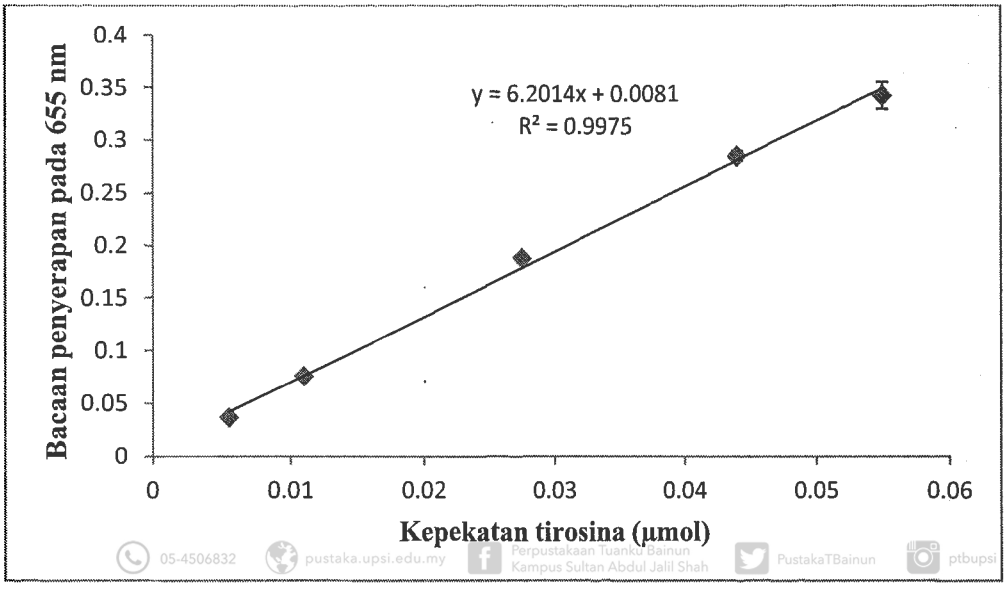
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN J

LENGKUK PIAWAI TIROSINA

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi



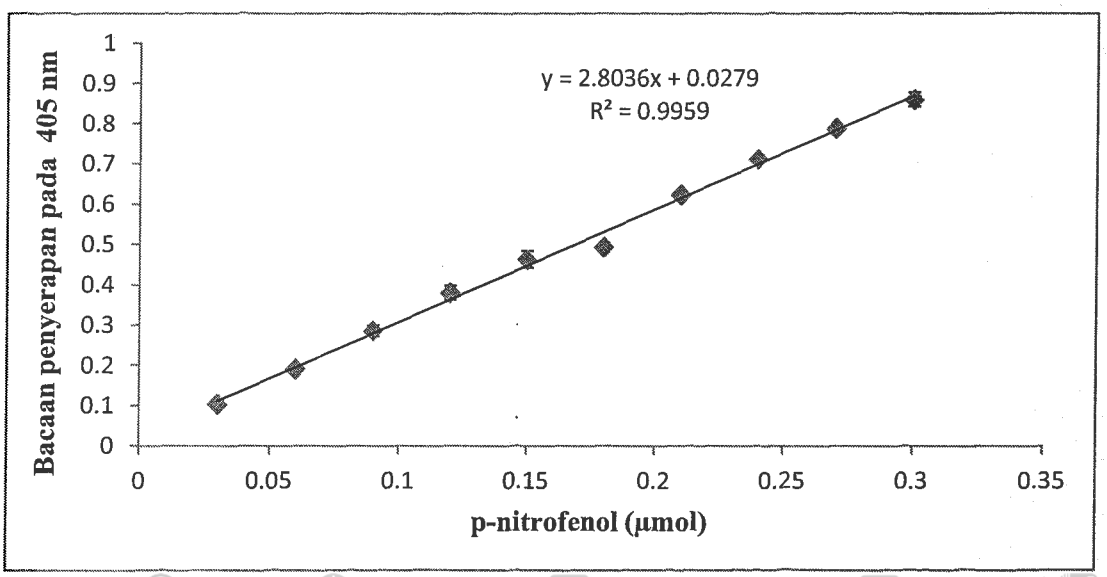
05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN K

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LENGKUK PIAWAI p-NITROFENOL



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

LAMPIRAN L

Jadual 1: Senarai potein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-5

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

No. Aksesi	Nama Protein	Nisbah Pengekspresan *AnΔprtT* : PY11
	Hidrolase	
197446	Endokitinase 1	↓ 0.94
202490	Glukan 1,3-β-glukosidase A	↑ 4.01
207829	α-1,2-manosidase	↓ 0.74
197735	Arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase C	↓ 0.08
50333	Fitase	↑ 2.12
177169	Laktonohidrolase	↑ 1.97
214608	Endoglukanase	↑ 1.67
179265	β-glukosidase M	↑ 3.46
54398	N-asetilglukosaminidase	↓ 0.12
119858	α/β-glukosidase, agdC	↓ 0.64
35378	Protein superfamili fosfoesterase	↑ 1.68
206384	*Endopeptidase aspartik (AP1) PEPAb	↑ 3.39
53620	Fosfolipase spesifik fosfatidilgliserol	↓ 0.93
205517	Manosil-oligosakarida α-1,2-manosidase 1B	↑ 1.04
53159	1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B	↑ 2.48
37548	Kitinase kelas V	↑ 3.56
196122	Glukanase dinding sel, crf1 alergen asp f9	↓ 0.62
52219	Endopoligalakturonase C	↑ 2.44
211053	Endoglukanase A	TP
51764	β-galaktosidase E	↑ 1.05
37736	α-galaktosidase	↓ 0.8
209408	α-1,3-glukanase/mutanase	↑ 1.72
210730	Triasilgliserol lipase A	↑ 19.69
170223	Endo-1,3-β-glukanase, Engl1	↑ 2.23
207264	α-galaktosidase B	↑ 1.26

47911	α-amilase stabil asid	↓	0.59
55270	Ekso-β-1,3-gukanase, Exg0	↑	3.67
47229	3-fitase B	↑	3.63
44517	Glukan endo-1,3-β-glukosidase, eglC	↑	1.57
52460	Glutaminase, GtaA	↑	7.69
56664	Eksoinulinase	↑	2.83
177032	α-1,2-manosidase	↑	1.15
214233	α-glukosidase	↓	0.95
52126	Alergen asp f 15	↑	2.64
	Oksidoreduktase		
209830	Protein mengandungi domain pengikatan FAD	↑	1.3
208521	Dihidrogenase terkandung FAD/FMN	↑	1.39
55494	Katalase R	↑	1.43
206342	Katalase R	↓	0.48
189206	Sulfidril oksidase	↓	0.86
	Transferase		
53033	1,3-β glukanosiltransferase	↓	0.01
212716	1,3-β-glukanosiltransferase, gel3	↑	7.17
	Isomerase		
55604	Aldos 1-epimerase	↓	0.9
	Protein bukan enzim		
124618	Protein dinding sel berlabuh GPI		TP
54860	Permease nukleosida purina	↑	1.82
214786	Protein domain DUF1237	↑	1.73
56553	Protein galaktomano dinding sel kaya-serina-treonina	↑	2.03
180382	Protein domain C jenis F5/8	↓	0.50
50599	Protein organisasi dinding sel berlabuh-gpi, emc33	↑	3.67
	Protein hipotetikal		
44973	Protein hipotetikal	↑	2.92
43411	Protein hipotetikal An09g02420	↓	0.17

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

↑ Simbol anak panah ke atas menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 meningkat (dikawal atur naik).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

↓ Simbol anak panah ke bawah menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 menurun (dikawal atur turun).

TP Simbol yang bermaksud tiada perubahan pada tahap pengekspresan.

(*) Simbol yang menandakan protease.

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

Jadual 2: Senarai potein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-6

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

No. Aksesi	Nama Protein	Nisbah Pengekspresan *AnΔprtT* : PY11	
	Hidrolase		
202490	Glukan 1,3-β-glukosidase A	↑	3.46
35378	Protein superfamili fosfoesterase	↑	1.06
214233	α-glukosidase	↑	1.84
177032	α-1,2-manosidase	↑	1.09
53361	Lipase	↑	3.42
56664	Eksoinulinase	↑	2.39
44517	Glukan endo-1,3-β-glukosidase,eglC	↑	1.79
47229	3-fitase B	↑	3.71
55270	Ekso-β-1,3-glukanase, Exg0	↑	3.46
57215	Asid fosfatase	↑	1.38
170223	Endo-1,3-β-glukanase, Engl1	↑	3.67
122978	Famili hidrolase glukosil 43	↑	6.3
211053	Endoglukanase A	↑	1.58
52219	Endopoligalakturonase C	↑	2.77
53620	Fosfolipase spesifik fosfatidilgliserol	↑	1.39
54734	*Karboksipeptidase serina	↑	6.89
197735	Arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase C	↑	2.29
50333	Fitase	↑	2.36
179265	β-glukosidase M	↑	3.82
206384	*Endopeptidase aspartik, PEPAb	↑	2.03
47911	α-amilase asid atabil	↓	0.54
210730	Triasilgliserol lipase A	↓	0.5
51764	β-galaktosidase E	↓	0.77
37548	Kitinase kelas V	↓	0.05
200605	α-N-arabinofuranosidase B	↓	0.27
119858	α/β-glukosidase, agdC	↓	0.55
205517	Manosil-oligosakarida α-1,2-manosidase 1B	↓	0.58
214608	Endoglukanase	↓	0.13
197446	Endokitinase I	↓	0.14
207264	α-galaktosidase B		TP

37736	α-galaktosidase		TP
196122	Glukanase dinding sel crf1 alergen asp f9		TP
52126	Alergen asp f 15	↓	0.7
	Oksidoreduktase		
208521	Dehydrogenase terkandung FAD/FMN	↑	1.05
189206	Sulfidril oksidase	↓	0.29
206342	Katalase R	↓	0.66
38388	Dismutase Superoksida Cu/Zn sitosolik	↓	0.06
55494	Katalase R	↓	0.27
	Transferase		
212716	1,3-β-glukanosiltransferase, gel3		TP
53033	1,3-β-glukanosiltransferase	↑	1.54
204301	1,3-β-glukanosiltransferase, gel1	↓	0.49
	Isomerase		
55604	Aldos-1-epimerase	↑	1.22
	Protein bukan enzim		
124618	Protein dinding sel berlabuh-GPI	↓	0.12
214786	Protein domain DUF1237	↑	1.4
180382	Protein domain C jenis F5/8	↓	0.39
56553	Protein galaktomano dinding sel kaya- serina-treonina		TP
50599	Protein organisasi dinding sel berlabuh-gpi, emc33	↓	0.48
54860	Permease nukleosida purina	↑	1.6
	Protein hipotetikal		
44973	Protein hipotetikal		TP

↑ Simbol anak panah ke atas menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 meningkat (dikawalatur naik).

↓ Simbol anak panah ke bawah menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 menurun (dikawalatur turun).

TP Simbol yang bermaksud tiada perubahan pada tahap pengekspresan.

(*) Simbol yang menandakan protease.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Jadual 3: Senarai potein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-7

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

No. Aksesi	Nama Protein	Nisbah Pengekspresan *AnΔprtT* : PY11
	Hidrolase	
210730	Triasilgliserol lipase A	↑ 12.94
202490	Glukan 1,3-β-glukosidase A	↑ 1.3
53159	1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B	↑ 1.23
214233	α-glukosidase	↑ 1.36
44517	Glukan endo-1,3-β-glukosidase, eglC	↑ 1.55
47229	3-fitase B	↑ 1.99
55270	Ekso-β-1,3-glukanase, Exg0	↑ 2.05
57215	Asid fosfatase	↑ 2.94
52219	Endopoligalakturonase C	↑ 1.73
206384	*Endopeptidase aspartik, PEPAb	↑ 2.44
54398	N-asetiglukosaminidase	↑ 3.86
214608	Endoglukanase	↑ 1.52
177169	Laktonohidrolase	↑ 2.44
50333	Fitase	↑ 2.23
197446	Endokitinase 1	↑ 1.9
35378	Protein superfamili fosfoesterase	↓ 0.96
56664	Eksoinulinase	↓ 0.64
47911	α-amilase stabil asid	↓ 0.78
207264	α-galaktosidase B	↓ 0.39
170223	Endo-1,3-β-glukanase, Engl1	↓ 0.95
209408	α-1,3-glukanase/mutanase	↓ 0.18
37736	α-galaktosidase	↓ 0.29
51764	β-galaktosidase E	↓ 0.63
211053	Endoglukanase A	↓ 0.63
196122	Glukanase dinding sel crf1 alergen asp f9	↓ 0.39
37548	Kitinase kelas V	↓ 0.51

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

119858	α/β-glukosidase, agdC	↓ 0.85
205517	Manosil-oligosakarida α-1,2-manosidase 1B	↓ 0.89
214665	*Aminopeptidase Y	↓ 0.44
197735	Arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase C	↓ 0.03
207829	α-1,2-manosidase	↓ 0.24
200605	α-N-arabinofuranosidase B	TP
53620	Fosfolipase spesifik fosfatidilgliserol	TP
	Oksidoreduktase	
55494	Katalase R	↓ 0.12
206342	Katalase R	↓ 0.83
189206	Sulfidril oksidase	↑ 1.21
38388	Dismutase superoksida Cu/Zn	TP
	Transferase	
53033	1,3-β-glukanosiltransferase	↓ 0.1
212716	1,3-β-glukanosiltransferase, gel3	↑ 3.53
204301	1,3-β-glukanosiltransferase, gel1	↑ 1.88
	Isomerase	
55604	Aldose-1-epimerase	↑ 1.4
	Protein bukan enzim	
197768	Protein domain UPF0047	↓ 0.08
180382	Protein domain C jenis F5/8	↓ 0.23
56553	Protein galaktomano dinding sel kaya- serina-treonina	↓ 0.9
54860	Permease nukleosida purina	↑ 37.34
214786	Protein domain DUF1237	↑ 1.15
50599	Protein organisasi dinding sel berlabuh-gpi, emc33	↓ 0.41
	Protein hipotetikal	
44973	Protein hipotetikal	↑ 3.49
43411	Protein hipotetikal	TP

↑ Simbol anak panah ke atas menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 meningkat (dikawalatur naik).

↓ Simbol anak panah ke bawah menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 menurun (dikawalatur turun).

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

TP Simbol yang bermaksud tiada perubahan pada tahap pengekspresan.

(*) Simbol yang menandakan protease.

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

Jadual 4: Senarai potein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-8

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

No. Aksesi	Nama Protein	Nisbah Pengekspresan *AnΔprtT* : PY11
	Hidrolase	
214233	α-glukosidase	↑ 1.43
56664	Eksoinulinase	↑ 2.53
47229	3-fitase B	↑ 1.65
55270	Ekso-β-1,3-glukanase, Exg0	↑ 2.53
210730	Triasilgliserol lipase A	↑ 6.69
196122	Glukanase dinding sel crf1 alergen asp f9	↑ 5.75
37548	Kitinase kelas V	↑ 5.87
119858	α/β-glukosidase, agdC	↑ 1.62
206384	*Endopeptidase aspartik, PEPAb	↑ 2.18
54398	N-asetilglukosaminidase	↑ 2.44
47911	α-amilase stabil asid	↓ 0.79
51764	β-galaktosidase E	↓ 0.53
197735	Arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidase C	↓ 0.37
35378	Protein superfamili fosfoesterase	TP
44517	Glukan endo-1,3-β-glukosidase, eglC	TP
207264	α-galaktosidase B	TP
170223	Endo-1,3-β-glukanase, Engl1	TP
52126	Alergen asp f 15	TP
205517	Manosil-oligosakarida α-1,2-manosidase 1B	TP
53620	Fosfolipase spesifik fosfatidilgliserol	TP
50333	Fitase	TP
197446	Endokitinase 1	TP
	Oksidoreduktase	
38388	Dismutase superoksida Cu/Zn sitosolik	↑ 6.82
189206	Sulfidril oksidase	TP
55494	Katalase R	↑ 7.69

	Transferase	
53033	1,3-β-glukanosiltransferase	TP
212716	1,3-β-glukanosiltransferase, gel3	↑ 1.86
	Isomerase	
55604	Aldos-1-epimerase	TP
	Protein bukan enzim	
180382	Protein domain C jenis F5/8	↑ 4.18
54860	Permease nukleosida purina	↑ 1.88
56553	Protein galaktomano dinding sel kaya-serina-treonina, mp1	↑ 7.61
214786	Protein domain DUF1237	↑ 1.82
50599	Protein organisasi dinding sel berlabuh-gpi, ecm33	↑ 4.71
	Protein hipotetikal	
43411	Protein hipotetikal	TP
44973	Protein hipotetikal	↑ 4.31

↑ Simbol anak panah ke atas menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 meningkat (dikawalatur naik).

↓ Simbol anak panah ke bawah menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 menurun (dikawalatur turun).

TP Simbol yang bermaksud tiada perubahan pada tahap pengekspresan.

(*) Simbol yang menandakan protease.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

Jadual 5: Senarai potein umum yang dikenal pasti daripada kedua-dua strain *A. niger* PY11 dan *AnΔprtT* pada hari ke-9

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

No. Aksesi	Nama Protein	Nisbah Pengekspresan *AnΔprtT* : PY11
	Hidrolase	
202490	Glukan 1,3-β-glukosidase A	↑ 9.97
56664	Eksoinulinase	↑ 2.08
44517	Glukan endo-1,3-β-glukosidase, eglC	↑ 2.16
47229	3-fitase B	↑ 2.64
55270	Ekso-β-1,3-glukanase, Exg0	↑ 1.34
170223	Endo-1,3-β-glukanase, Engl1	↑ 1.75
210730	Triasilgliserol lipase A	↑ 6.36
209408	α-1,3-glukanase/mutanase	↑ 1.38
119858	α/β-glukosidase, agdC	↑ 1.08
206384	*Endopeptidase aspartik, PEPAb	↑ 1.21
179265	β-glukosidase M	↑ 5.7
50333	Fitase	↑ 1.21
35378	Protein superfamili fosfoesterase	↓ 0.64
214233	α-glukosidase	↓ 0.86
47911	α-amilase stabil asid	↓ 0.76
207264	α-galaktosidase B	↓ 0.34
37736	α-galaktosidase	↓ 0.5
51764	β-galaktosidase E	↓ 0.52
52219	Endopoligalakturonase C	↓ 0.19
196122	Glukanase dinding sel crf1 alergen asp f9	↓ 0.83
37548	Kitinase kelas V	↓ 0.37
205517	Manosil-oligosakarida alfa-1,2-manosidase 1B	↓ 0.88
53620	Fosfolipase spesifik fosfatidilgliserol	↓ 0.95
54398	N-asetilglukosaminidase	↓ 0.66
197446	Endokitinase 1	↓ 0.87
197735	Arabinan endo-1,5-α-L-arabinosidaseC	TP

	Oksidoreduktase		
208521	Dehydrogenase mengandungi FAD/FMN	↓	0.31
206342	Katalase R	↑	1.07
38388	Dismutase superoksida Cu/Zn sitosolik	↑	5.16
55494	Katalase R	↑	3.6
189206	Sulfidril oksidase	↓	0.03
	Transferase		
204301	1,3-β-glukanosiltransferase, gel1	↑	5.58
53033	1,3-β-glukanosiltransferase	↑	1.04
212716	1,3-β-glukanosiltransferase, gel3		TP
	Isomerase		
55604	Aldos-1-epimerase	↓	0.61
	Protein bukan enzim		
56553	Protein galaktomano dinding sel kaya-serina-treonina, mp1	↑	4.06
214786	Protein domain DUF1237	↑	1.54
43024	Protein domain CFEM	↑	1.15
197768	Protein domain UPF0047	↑	1.27
54860	Permease nukleosida purina	↑	6.96
180382	Protein domain C jenis F5/8	↑	3.25
50599	Protein organisasi dinding sel berlabuh-gpi, ecm33	↑	6.55
	Protein hipotetikal		
43411	Protein hipotetikal	↓	0.23

↑ Simbol anak panah ke atas menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 meningkat (dikawalatur naik).

↓ Simbol anak panah ke bawah menunjukkan nisbah pengekspresan *AnΔprtT* : PY11 menurun (dikawalatur turun).

TP Simbol yang bermaksud tiada perubahan pada tahap pengekspresan.

(*) Simbol yang menandakan protease.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN M

Jadual 1: Senarai potein yang dikenal pasti hanya daripada strain *A. niger* PY11 pada hari ke-5 hingga 9

No. Aksesi	Nama Protein	Hari 5	Hari 6	Hari 7	Hari 8	Hari 9
56161	*Karboksipeptidase serina, pepF	/	–	–	–	/
211032	*Peptidase tripeptidil, sed2	/	/	/	/	/
189966	*Protease aspartik, pepAc	/	/	–	–	–
45801	Glukan endo-1,6-glukosidase, BGN16.3	/	–	–	–	–
214598	Endopoligalakturonase C	/	/	/	/	/
38784	Esterase feruloil, prekursor B	/	/	–	–	–
41606	α-galaktosidase D	/	/	–	–	/
53364	*Endopeptidase aspartik	/	–	/	/	–
55665	*Peptidase tripeptidil, sed2	/	/	/	–	/
188224	Protein mengikat permukaan hidrofobik A	/	/	/	/	/
57215	Asid fosfatase	/	–	–	–	–
46979	*Karboksipeptidase serina	/	/	/	/	/
138876	β-manosidase A	/	/	/	/	/
205361	Aldonolaktonase	/	/	/	/	/
52700	*Peptidase tripeptidil, sed2	/	/	/	–	/

37735	Protein hipotetikal	/	–	–	–	–
52703	*Endopeptidase peptidase s28	/	/	/	/	/
190306	Protein hipotetikal ANI_1_786184	/	–	–	–	–
201655	*Endopeptidase aspartik, pepA	/	/	/	/	/
51478	Esterase feruoil B-1	/	–	–	–	–
193610	Karboksilesterase	/	–	–	–	–
42238	Ribonuklease spesifik-guanil	/	–	–	–	–
56689	*Karboksipeptidase serina	/	/	/	–	/
214460	*Karboksipeptidase S1	/	/	/	/	/
205670	Ekso-1,4-β–xilosidase, xlnD	/	/	/	/	/
55133	*Peptidase tripeptidil s8	/	/	/	/	/
200605	α-N-arabinofuranosidase B	/	–	–	/	/
52587	Asid fosfatase	/	/	/	/	/
55493	*Peptidase tripeptidil s8	/	/	/	/	/
54734	*Karboksipeptidase serina	/	–	/	/	/
121359	N-asetilglukosaminidase	/	–	–	/	–
53159	1,4-β–D-glucan selobiohidrolase B	–	/	–	/	/
182100	Endo-arabinase	–	/	/	–	–
210988	Protein dinding sel, PhiA	–	/	/	–	–

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

43411	Protein hipotetikal An09g02420	–	/	–	–	–
52460	Glutaminase, GtaA	–	/	/	/	/
197768	Protein domain UPF0047	–	/	–	/	–
209408	α-1,3-glukanase/mutanase	–	/	–	/	–
50378	Manan endo-1,4-β-manosidase F	–	/	–	–	–
213462	CelA selulase ekstra sel / allergen Asp F7	–	/	–	–	/
54398	N-asetilglukosaminidase	–	/	–	–	–
41638	*Karboksipeptidase serina	–	/	–	–	–
177169	Laktonohidrolase	–	/	–	/	/
207829	α-1,2-manosidase subfamili putatif	–	/	–	/	/
51794	Ribobuklease T2	–	/	–	–	–
209830	Protein mengandungi domain mengikat FAD	–	/	/	/	/
177032	Potein famili α-1,2-manosidase	–	–	/	/	/
124618	Protein dinding sel berlabuh-GPI	–	–	/	/	/
41807	Protein famili α-1,2-manosidase	–	–	/	–	–
51468	Asid fosfatase	–	–	/	/	/
122978	Glikosil hidrolase famili 43	–	–	/	/	/
41679	Protein domain NPP1	–	–	/	–	–
52126	Alergen asp f 15	–	–	/	–	/
208521	Dehydrogenase mengandungi-FAD/FMN	–	–	/	/	–

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

43342	α-xilosidase	–	–	/	–	–
179265	β-glukosidase M	–	–	/	–	–
212664	Triasilgliserol lipase B	–	–	/	–	–
37736	α-galaktosidase ekstra sel	–	–	–	/	–
211053	Endoglukanase A	–	–	–	/	/
52219	Endopoligalakturonase C	–	–	–	/	–
214608	Endoglukanase	–	–	–	/	/
206342	Katalase R	–	–	–	/	–
44973	Protein hipotetikal	–	–	–	–	/
52082	*Aspergilopepsin-2, pepB	–	–	–	–	/
42231	Protein hipotetikal	–	–	–	–	/
51794	Ribonuklease T2	–	–	–	–	/

Tanda (/) bermaksud protein dikenal pasti

Tanda (-) bermaksud protein tidak dikenal pasti

Tanda (*) bermaksud protein tersebut adalah protease.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi

LAMPIRAN N

Jadual 1: Senarai potein yang dikenal pasti hanya daripada strain mutan *AnΔprtT* pada hari ke-5 hingga 9

No. Aksesi	Nama Protein	Hari 5	Hari 6	Hari 7	Hari 8	Hari 9
198099	Peroksidase	/	–	–	–	–
197915	Lisofosfolipase 1	/	–	/	–	–
51773	1,4-β-D-glukan selobiohidrolase B	/	/	/	/	/
41522	Protein pengisyaratan famili mucin, Msb2	/	–	–	–	–
50378	Manan endo-1,4-β-manosidase F	/	–	–	–	–
204301	1,3-β-glukanosiltransferase, gel 1	/	–	–	–	–
122978	Glikosil hidrolase family 43	/	–	–	–	–
41807	Protein famili α-1,2-manosidase	/	/	–	–	–
53361	Lipase	/	–	–	–	–
210981	β-glukosidase M	/	/	–	–	–
38388	Superoksida dismutase Cu/Zn sitosolik	/	–	–	–	–
41270	*Protease aspartik	–	/	–	–	–
52629	1,3-β-glukanosiltransferase, gel2	–	/	/	–	–
38015	Endokitinase 1	–	–	/	–	–
214072	Prekursor glikoprotein FP21	–	–	/	–	–

47880	Rhamnogalakturonat liase B	–	–	/	–	–
43553	Protein hipotetikal	–	–	/	–	–
179265	β–glukosidase M	–	–	–	/	–
176123	Faktor transkripsi spesifik kulat	–	–	–	/	–
202490	Glukan 1,3-β-glukosidase A	–	–	–	/	–
214665	*Aminopeptidase Y	–	–	–	–	/
185799	*Peptidase-dipeptidil 5	–	–	–	–	/
57215	Asid fosfatase	–	–	–	–	/
36022	6-fosfoglukonolaktonase	–	–	–	–	/

Tanda (/) bermaksud protein dikenal pasti

Tanda (-) bermaksud protein tidak dikenal pasti

Tanda (*) bermaksud protein tersebut adalah protease.

05-4506832 pustaka.upsi.edu.my Perpustakaan Tuanku Bainun Kampus Sultan Abdul Jalil Shah PustakaTBainun ptbupsi