



2 JUL 1992

HETEROLOGOUS TRANSFORMATION OF *ASPERGILLUS NIGER*

LADAPAN SAENGLAI

๒

อภินันท์นาการ

จาก

โณทัยพรวิไล อ. ๒๕๓๑

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1991

Copyright by Mahidol University

19092

ชื่อวิทยานิพนธ์

การนำยีนเข้าสู่เชื้อรา

Aspergillus niger

ผู้วิจัย

ลดดาพรรณ แสงคล้าย

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อภิญา อัครานิก Ph.D.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด D. Eng.

ชวนพิศ ดีเอโกนามกุล Ph.D.

วิทยา มีวุฒิสม Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา

21 พฤศจิกายน พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

การทดลองนำยีนเข้าสู่เชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ใช้ผลิตกรดซิตริกด้วยวิธี Transformation โดยใช้พลาสมิดที่ประกอบด้วยยีนของเชื้อจุลินทรีย์ต่างสกุล คือ พลาสมิด pDJB2 ที่มียีนสำหรับสร้างเอนไซม์ orotidine 5'-monophosphate decarboxylase หรือ *pyr4* gene ของเชื้อรา *Neurospora crassa* นำเข้าสู่สายพันธุ์ซึ่งต้องการ uridine สำหรับการเจริญเติบโต (*pyr⁻* mutant) และใช้พลาสมิด pOBT ที่มียีนต้านทานต่อยา bleomycin หรือ phleomycin (*ble* gene) ของแบคทีเรีย นำเข้าสู่สายพันธุ์ที่เป็น wild type และ *pyr⁻* mutant ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus minimal medium* (AMM) และ Czapek dox agar ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะ phleomycin เป็น selective media สำหรับการเจริญเติบโตของ *pyr⁺* transformants และ *phle^r* transformants ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยของ transformation frequency/ μ g DNA จากพลาสมิด pDJB2 สูงกว่าพลาสมิด pOBT เล็กน้อย ไม่พบพลาสมิดอิสระใน transformants ที่ได้จากพลาสมิดทั้งสอง แต่มีการแทรกตัว (integration) ของพลาสมิดเข้าไปในโครโมโซมของ transformants จากผลวิเคราะห์การแทรกตัวของพลาสมิด ในโครโมโซมของ transformant 30 ตัวซึ่งได้จาก transformation ด้วยพลาสมิด pDJB2 โดยใช้ Southern hybridization ตรวจพบ hybridization bandใน

2 transformants เท่านั้น และไม่พบชิ้นส่วนของ *pyr4* gene ใน *pyr*⁺ transformants ทั้งสอง พบเพียงชิ้นส่วนของ pBR325 เท่านั้น อย่างไรก็ตาม 1 ใน 2 transformant นี้ ยังคงสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจาก uridine และมี 100 % mitotic stability

สำหรับ *phle*^r transformants ซึ่งได้จาก transformation ด้วยพลาสมิด pOBT พบว่า มีการแทรกตัวของพลาสมิดทั้ง copy เดี่ยวและหลาย copies ที่ตำแหน่งบนโครโมโซมของ transformant 1 แห่งหรือมากกว่า นอกจากนี้ transformant ที่ทดสอบเกือบทุกตัว ยังมีการแทรกตัวของพลาสมิดแบบ tandem head-to-tail repeats และ transformant บางตัวสามารถต้านทานต่อตัวยา phleomycin ปริมาณสูงถึง 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจาก transfer บนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่มียาถึง 10 ครั้ง และยังมี mitotic stability 100 % อีกด้วย จะเห็นได้ว่าการนำยีนต่างสกุลเข้าสู่เชื้อรา *A. niger* โดยใช้พลาสมิด pOBT ให้ผลที่ดีและมีประสิทธิภาพของยีนที่นำเข้ามาสูงกว่าการใช้พลาสมิด pDJB2 ดังนั้น อาจนำระบบการนำเข้าสู่ยีนโดยใช้พลาสมิด pOBT นี้ไปใช้สำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *A. niger* เพื่อใช้สร้างกรดซิตริกปริมาณสูงขึ้นไป

Thesis Title Heterologous Transformation of
Aspergillus niger

Name Ladapan Saengkhai

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Apinya Assavanig	Ph.D.
Watanalai Panbangred	D. Eng.
Chuanpit De-eknamkul	Ph.D.
Vithaya Meevootisom	Ph.D.

Date of Graduation 21 November B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

Aspergillus niger (capable of citric acid production), designated wt or wild type strain and its uridine auxotrophic mutant, designated *pyr*⁻ mutant (or mutant 501) strain were used as recipients in the transformation experiment. The protoplasts of both strains were transformed with plasmid pDJB2 containing orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (*pyr4*) gene of *Neurospora crassa* and plasmid pOBT containing bacterial bleomycin resistance (*ble*) gene, respectively. The transformants obtained from pDJB2 (*pyr*⁺) were screened on *Aspergillus* minimal medium (AMM) agar lacking uridine while those obtained from pOBT (*phle*^R or *ble*^R) were screened on Czapek dox agar added with phleomycin. The results revealed that the average of transformation frequency/ μ g DNA obtained from pDJB2 was 1 transformant/ μ g DNA and those obtained from pOBT were 0.6 and 0.5 transformant/ μ g DNA for transformation of wt and *pyr*⁻ mutant strain 501,

respectively. No free plasmids were found in the transformants obtained from both plasmids but the integration of the plasmids into host chromosome had occurred. Southern hybridization analysis of *pyr*⁺ transformants showed no appearance of *N. crassa pyr4* gene and only pBR325 fragment of the pDJB2 presented on the nitrocellulose paper (only 2 out of 30 transformants showed the hybridization bands on the paper). However, one of two *pyr*⁺ transformant that showed pBR325 hybridization signal exhibited no further requirement of uridine for growth, and it showed 100 % mitotic stability.

Southern hybridization analysis of *phle*^R transformants indicated that integration of pOBT into the recipient chromosome mainly occurred as tandem head-to-tail repeats. Some *phle*^R transformants showed significantly increased resistance to phleomycin upto 1,000 µg/ml after 10 consecutive transfers on drug-free medium and they were 100 % mitotic stable. Heterologous transformation of *A. niger* with plasmid pOBT was accomplished and was more effective than that with pDJB2. The establishment of transformation system of *A. niger*, especially citric acid-producing strain, will be very useful in strain improvement of *A. niger* to enhance citric acid production.