เอกสารอ้างอิง

1. Ammuaykanjanasin, A. and et. al., 2005, 'Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp.BCC1067', FEMS Microbiology Letters, 251; 125 – 136.

2. Cheevadhanarak, S. and et. al., 1991, 'Transformation of *Aspergillus oryzae* with a dominant selectable marker', J. Biotechnology, 19: 117 – 122.

3. Tachaleat, A., 2002, 'Production of Green Florescent Protein in *Aspergillus oryzae*: Effect of protease activity', School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand, Master of Science.

4. Jirakkakul, J. And et. al, 2008, 'Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene resposible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp.BCC1067', Microbiology, 154; 995 – 1006.

5. Tachaleat, A. and et. al, 2010, 'Heterologous gene expression vector of protein and/or metabolite production in filamentous fungi', Thailand Patent, THA-1003000062, File; Jan 22, 2010.

6. Fujii, I. and et. al, 2005, 'An Iterative type I polyketide synthease PKSN catalyzes synthesis of the decaketide alternapyrone with Regio-specific Octa-Methylation', Chemistry and Biology, 12: 1301 – 1309.

7. Tsuchiya, K. and et. al, 1997, 'Epopromycins, Novel cell wall synthesis inhibitors of plant protoplast produced by *Streptomyces* sp.NK04000', J. Antibiotics, 50: 261 – 263.

8. Kondoh, M. and et. al, 1998, 'Cell cycle arrest and antitumor activity of pironetin and its derivative', Cancer Letters, 126:29 – 32.

9. Lin, A. and et. al, 2008, 'Two New 5-Hydroxy-2-pyrone derivatives isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus flavus*', J. Antibiotics, 61 (4): 245 – 249.

10. Sanchez, J. F. and et, al., 2008, 'Diversity of polyketide synthases found in the Aspergillus and Streptomyces Genomes', Molecular Pharmaceutics, 5(2): 226 – 233.

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่	
วันรับคำขอ 22 มิ.ย. 2553	เลขที่คำขอ 1003000062
วันยื่นคำขอ	
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์	
ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1.ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/~~การออกแบบผลิตภัณฑ์~~

"ดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิตโปรตีนและสารเมตาโบไลต์ในเชื้อราเส้นใย"

2.คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)	
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 111 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	3.1 สัญชาติ ไทย 3.2 โทรศัพท์ 02-564-7000 ต่อ 1314 – 1350 3.3 โทรสาร 02 564 7003 3.4 อีเมล์ tlo@tmc.nstda.or.th

4.สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☑ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี) ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)	
น.ส.อรุณศรี ศรีธนะอิทธิพล และ/หรือ นายชาญชัย นีรพัฒนกุล และ/หรือ น.ส.อรกมก หรรณรักษา อยู่ที่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 111อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120	5.1 ตัวแทนเลขที่ 1463,1731,1513 5.2 โทรศัพท์ 02 5647000 5.3 โทรสาร 025647003 5.4 อีเมล์ tlo@tmc.nstda.or.th

6.ผู้ประดิษฐ์/~~ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์~~ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)
1. นายอนุวัตน์ เดชะฤทธิ์ อยู่ที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 2.น.ส.รันทิรา ปัญญา 3. น.ส.อัมพร หลั่งรอด อยู่ที่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 113 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
4.นางสุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์ อยู่ที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

7.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8. การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9. การแสดงการประดิษฐ์ หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียน	10.2 วันที่ฝากเก็บ	สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ

11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่น ๆ

12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียนและประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ.
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในประกาศโฆษณา

13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย
ก. แบบพิมพ์คำขอ 2 หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 16 หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ 1 หน้า
ง. รูปเขียน 12 รูป 11 หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์
☐ รูปเขียน - รูป - หน้า
☐ ภาพถ่าย - รูป - หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า

14. เอกสารประกอบคำขอ
☐ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☑ เอกสารอื่น ๆ เอกสารประกอบการยื่นคำขอรับสิทธิบัตร

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก .....

16. ลายมือชื่อ (☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร; ☑ ตัวแทน)

(น.ส.อรุณศรี ศรีธนะอิทธิพล)
ตัวแทนผู้รับมอบอำนาจ

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

Aspergillus oryzae heterologous expression system for bioactive compound production

[1]*Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Thonburi, Bangkuntien, Bangkok 10150, Thailand.*
[2]*Bioresource research unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Science Park, Pathumthani 12120, Thailand*
[3]*School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150, Thailand*

Heterologous expression system for bioactive molecule biosynthesis gene in well characterized host not only allows easy identification of its product structure but also facilitates large scale compound production. Here we developed expression system employing low protease producer host strain, *Aspergilus oryzae* U1638 and plasmid vector pPNGB. This vector contained a phleomysin selectable marker, an expression cassette containing glucose phosphate dehydrogenase (GPD) promoter, *trypC* terminator and a green fluorescent reporter protein located upstream of terminator to facilitate C-terminal fusion. We also demonstrated functional expression of *Xylaria* sp. BCC1067 polyketide synthase (PKS), PKSMT gene. Comparing to wild type strain, culture broth extract of transformant expressing PKSMT gene showed 2 extra peaks from HPLC analysis. Crude extract of transformant also exhibited anti-cancer activity against oral cavity cancer (KB) and breast cancer (MCF7) cell. Purification and identification of these two peaks are under investigation. Expression of other metabolite biosynthetic genes such as nonribosomal pepetide synthetase (NRPS) and hybrid PKS-NRPS will also be subjected for further study.

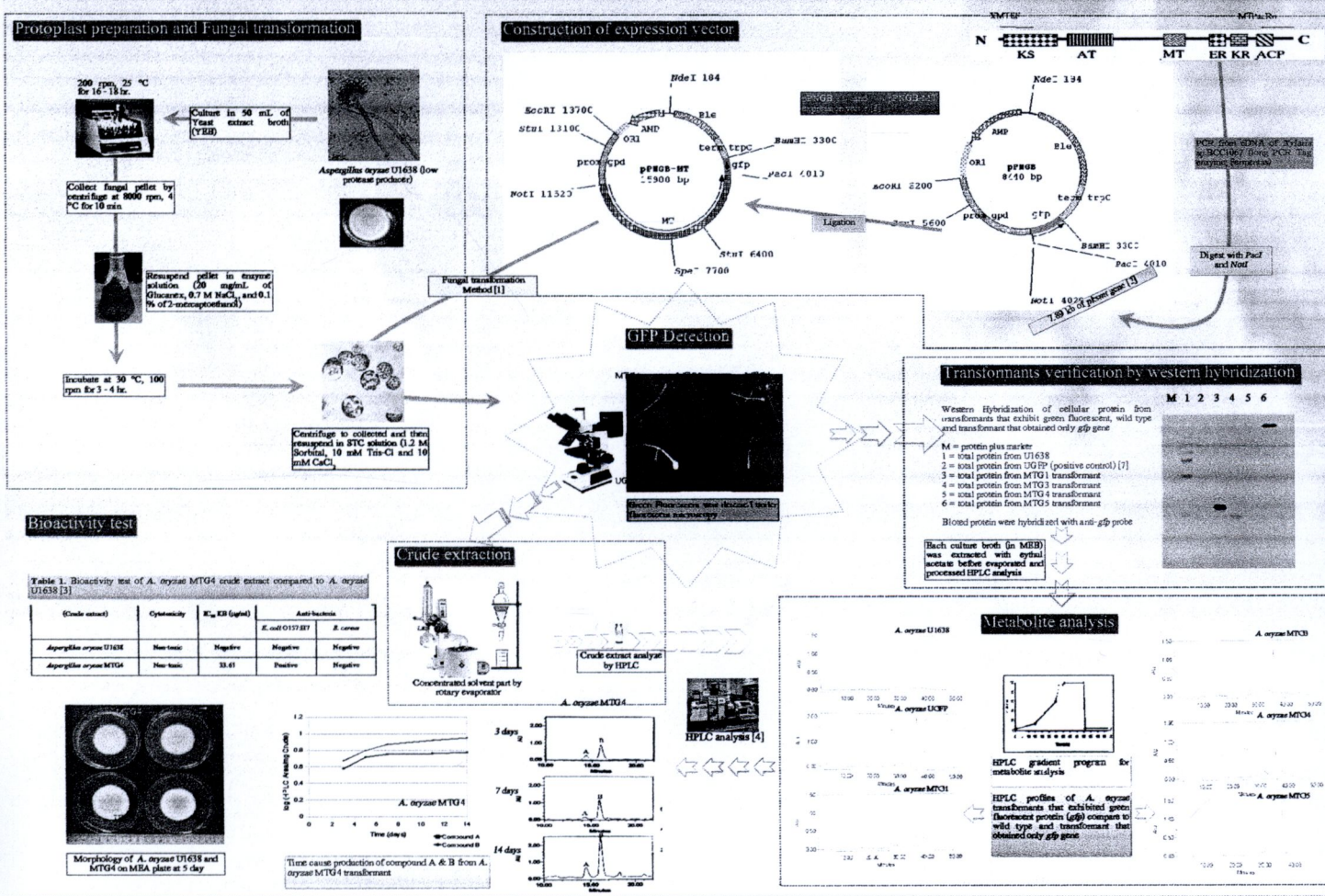

Table 1. Bioactivity test of *A. oryzae* MTG4 crude extract compared to *A. oryzae* U1638 [3]

(Crude extract)	Cytotoxicity	IC_{50} KB (µg/ml)	Anti-bacteria	
			E. coli O157:H7	*B. cereus*
Aspergillus oryzae U1638	Non-toxic	Negative	Negative	Negative
Aspergillus oryzae MTG4	Non-toxic	33.61	Positive	Negative

Summary

- The entry vector for filamentous fungal heterologous gene expression, pPNGB, was initially constructed by adding the cloning sites (*NotI* and *PacI*) into the GFP expression vector pUTGFP2.5 [7]. The *Tn5 B* cassette carrying a phleomycin resistance marker was placed at the position downstream of GFP's terminator.
- The polyketide biosynthesis gene, *pksmt* [2], was obtained by PCR amplification of *Xylaria* sp. BCC1067 cDNA using gene specific primers that contained additional restriction sites, *NotI* and *PacI*, at the 5' end reverse and forward primers, respectively.
- *NotI* and *PacI* digested fragments of *pksmt* were ligated into pPNGB and ligation mixture was transformed into *E. coli*. Colony PCR selection was performed to select the clone that contained plasmid with ligat insert. The resulting plasmid was subsequently named pPNGBMT.
- *Aspergillus oryzae* U1638 protoplasts were prepared according to Cheevadhanaruk et al. (1990) [1] and were then transformed with pPNGBMT. Four phleomycin resistant transformants exhibiting gre fluorescence under fluorescent microscope were grown in liquid media under shaking condition and harvested at various time intervals for metabolite detection employing HPLC technique.
-The transformant *A. oryzae* MTG4 showed dual peaks at the retention time of 14 and 16 minutes as a result of the fusion protein of PKSMT and GFP, whereas only one positive band of the predicted molecul weight of about 300 kDa [PKSMT ~286 kDa and GFP ~26.86 kDa] was detected by western hybridization.
-- The transformant was subjected to further analysis of its metabolite chemical structures following the large scale cultivation.

Significant: Complete genome databases from the well-studied microorganisms help provide us the information on the diversity of compounds within which certain microorganisms are able to produce. T identification and production of these compounds can be achieved by using heterologous expression systems, which also make possible the biosynthesis of the novel compounds through genetic engineering.

Acknowledge

This work was financial supported by King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT). We thank Bioassay and Bioresource laboratories of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) for their kinding helps on bioactivity tests and chemical analysis, respectively.

References

1. [illegible] transformation of *Aspergillus oryzae* with a dominant [illegible], 19: 117 - 122.
2. Ayuthaya, [illegible], A. and et. al., (2005), 'Diversity of Type I Polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC1067', *FEMS Microbiology Letters*, 251: 125 - 136.
3. Tachaleat, A. and et. al., (2010), 'Heterologous gene expression vector of protein and/or metabolite production in Filamentous fungi', *Thailand patent*, THA-100300062, Jan 22, 2010.
4. Jirakkakul, J. and et. al., (2008), 'Identification of *nps* gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp. BCC1067', *Microbiology*, 154: 995 - 1006.
5. Fujii, I. and et. al., (2005), 'An Iterative Type I polyketide synthase *PKSN* catalyzes synthesis of the decalonedic alternapyrone with Regio-specific Oxa-Methylation', *Chemistry and Biology*, 12: 1301 - 1309.
6. Isaka, M. and et. al., (2000), 'Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC1067', *Planta Medica*, 66: 473 - 475.
7. Tachaleat, A., (2002), Production of Green Fluorescent Protein on *Aspergillus oryzae*, effect of protease activity, *M.Sci. in Biotechnology*, KMUTT, Thailand.