

ลักษณะสมบัติของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Aureobasidium pullulans*
ซึ่งสกัดแยกได้ในประเทศไทย

นายสีหนาท ประสงค์สุข



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1950-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED BY
Aureobasidium pullulans ISOLATED IN THAILAND**

Mr. Sehanat Prasongsuk



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Science**

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2004

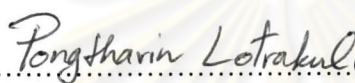
ISBN 974-53-1950-3


Thesis Title Characterization of exopolysaccharides produced by
 Aureobasidium pullulans isolated in Thailand
By Sehanat Prasongsuk
Field of Study Biological Science
Thesis Advisor Associate Professor Hunsa Punnapayak, Ph.D.
Thesis Co-advisors Professor Douglas E. Eveleigh, Ph.D.
 Associate Professor Mukda Kuhirun, A.M.


Accepted by the faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy

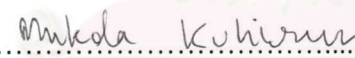

.....Dean, Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Thesis committee



.....Chairman
(Assistant Professor Pongtharin Lotrakul, Ph.D.)



.....Thesis Advisor
(Associate Professor Hunsa Punnapayak, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Professor Douglas E. Eveleigh, Ph.D.)


.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Mukda Kuhirun, A.M.)


.....Member
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)


.....Member
(Professor Michael P. Braverman, Ph.D.)

สีหนาท ประสงค์สุข: ลักษณะสมบัติของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Aureobasidium pullulans* ซึ่งคัดแยกได้ในประเทศไทย (CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY *Aureobasidium pullulans* ISOLATED IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม: Prof.Dr. Douglas E. Eveleigh และ รศ.มุกดา คูหิรัญ จำนวน 162 หน้า ISBN 974-53-1950-3.

การเก็บตัวอย่างจากแหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อราที่มีความหลากหลาย มีวัตถุประสงค์เพื่อหาชนิดสปีชีส์ *Aureobasidium* ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในประเทศไทย โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถคัดแยกได้จาก แหล่งที่อยู่อาศัยต่างๆ ตั้งแต่ใบพืชไปจนถึงพื้นผิวของผนังทาสี การจัดจำแนกเชื้อที่คัดแยกได้อาศัยลักษณะทาง สันฐานวิทยา การใช้สารอาหารของเชื้อ การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) และการหาลำดับเบส rDNA Internal Transcribe Spacer (ITS) เชื้อราที่คัดแยกมีลักษณะทางสันฐานวิทยาที่หลากหลาย สังเกตได้จาก ลักษณะ บลาสโตสปอร์ คลาโมโดสปอร์ และ เส้นใย โดยสายพันธุ์ที่พบมีความหลากหลายทั้งที่เป็นสปีชีส์และสปีชีส์ อื่นๆ ลำดับเบส ITS ของเชื้อราที่คัดแยกได้มีความเหมือนกันเป็นอย่างมากและมีความสัมพันธ์สอดคล้องกัน อย่างสูงกับลำดับ ITS ของ *A. pullulans* ใน GenBank ซึ่งทำการเทียบโดยใช้โปรแกรม BLAST แบบ แผนของการใช้สารอาหารของเชื้อทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีความสอดคล้องอย่างมาก กับ *A. pullulans* var. *pullulans* และสามารถผลิต EPS เป็นพอลิแซ็กคาไรด์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี anthrone carbohydrate analysis, pullulanase sensitivity, infrared analysis และ ¹³C-NMR spectroscopy เชื้อ 5 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ BK4, BK6, LB3, NRM2 และ SK3 การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนและ ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS พบว่า สายพันธุ์ NRM2 ให้ผลผลิต EPS สูงสุด (25 กรัมต่อลิตร) ใน วันที่ 7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ซูโครสและเปปโตเน) นอกจากนี้ยังพบว่า สายพันธุ์ BK6 ให้น้ำหนักโมเลกุล ของ EPS สูงสุด (2,450,000 ดาลตัน) รองลงมาคือสายพันธุ์ NRM2 (1,770,000 ดาลตัน) ภายหลังจากการผลิตได้ 3 วันซึ่งทำการวิเคราะห์โดยใช้ High performance size exclusion chromatography น้ำหนักโมเลกุล (ความหนืด) ของ EPS ในทุกสายพันธุ์ลดลงในช่วงท้ายของการผลิต เนื่องจาก *A. pullulans* ได้ผลิตเอนไซม์ที่ สามารถย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์แบบออกนอกเซลล์ ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส และ พอลิแซ็กคาไรเดส เมื่อทำการวิเคราะห์ เอนไซม์ดังกล่าวในเชื้อทุกสายพันธุ์ปรากฏว่าสามารถตรวจพบเอนไซม์ได้ในทั้งอาหารแข็งและเหลวที่มีแป้งเป็น องค์ประกอบ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ได้มีการกลายพันธุ์โดยวิธี NTG ให้เกิดสายพันธุ์กลายที่ไม่ผลิตอะไมเลส และตัวยับยั้งอะไมเลส acarbose เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักโมเลกุลของ EPS สูงขึ้น การย่อยสลาย EPS ในช่วงท้ายของการผลิตในสายพันธุ์กลายให้ผลไม่ต่างกับ สายพันธุ์เดิม ส่วนสายพันธุ์ NRM2 จะให้น้ำหนักโมเลกุลของ EPS สูงขึ้นในอาหารที่มี acarbose ในช่วง ท้ายของการผลิต จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของ EPS มีผลมาจากการผลิต แอลฟา-อะไมเลส ของเชื้อ

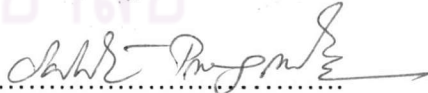
สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิติ.....
ปีการศึกษา...2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

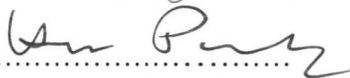
4373846023 : Biological Science


KEY WORDS : *Aureobasidium pullulans*, Exopolysaccharides, pullulan
SEHANAT PRASONGSUK: CHARACTERIZATION OF
EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY *Aureobasidium pullulans*
ISOLATED IN THAILAND.


THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D.,
THESIS CO-ADVISORS: PROF. DOUGLAS E. EVELEIGH, Ph.D.,
ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN, A.M., pp.162 ISBN 974-53-1950-3.

A variety of habitats were sampled for the presence of *Aureobasidium* black yeasts with the objective to find pullulan-producing strains in Thailand. *Aureobasidium* spp. were successfully isolated from distinct diverse habitats: from leaves to painted surfaces. Parameters for the identification of the isolates were a balance of morphology, nutritional parameters, exopolysaccharides (EPSs) production, and rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) sequencing. The isolates were polymorphic with blastospores, chlamydospores, and hyphae, typically black yet with color variant strains. Their ITS sequences were very similar to each other and showed strong correlation with the GenBank *A. pullulans*, alignment using the BLAST program. Nutritional assimilation patterns of all isolates corresponded well to *A. pullulans* var. *pullulans*. All isolates produced pullulan EPSs as deduced from anthrone carbohydrate analysis, pullulanase sensitivity, infrared analysis, and ¹³C-NMR spectroscopy. The five higher-yielding strains, BK4, BK6, LB3, NRM2 and SK3, were subjected to EPS optimization. Parameters for optimization included various carbon and nitrogen sources. The maximal EPS yield (25 g.l⁻¹) was obtained from strain NRM2 under the optimal conditions (sucrose and peptone) after 7 days. The higher-molecular weight EPSs were from strain BK6 (2,450,000 Da) and NRM2 (1,770,000 Da) after 3 days culture, as analyzed using high performance size exclusion chromatography. The molecular weight (and viscosities) of EPSs from all strains decreased in late culture presumably as a result of *A. pullulans* producing extracellular hydrolytic enzymes such as alpha-amylase and pullulanase. In assays for alpha-amylase and pullulanase, all *A. pullulans* strains were positive in both solid and liquid starch-based media. Alpha-amylase and pullulanase were also detected in the *A. pullulans* culture grown on sucrose as the sole carbon source. Culture on sucrose still resulted in synthesis of alpha-amylase and pullulanase. Two approaches have been considered to obtain the higher-molecular weight pullulan: preparation of an amylase-negative mutant, or the alternative use of an amylase inhibitor acarbose. The degradation of late culture EPSs from the alpha-amylase negative mutant was similar to that of the wild type. The EPS from strain NRM2 cultured in the presence of acarbose, in late culture showed higher molecular weight. This result implied that part of the reduction in the molecular weight of EPS was due to alpha-amylase.

Field of study....Biological Science....Student's signature.....

Academic year.....2004.....Advisor's signature.....

Co-Advisor's signature.....

Co-Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my thesis supervisor, Associate Professor Dr. Hunsa Punnapayak, for his excellent supervision, guidance, encouragement, and all of invaluable helpful suggestions for everything throughout my Ph.D study and my life. I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my thesis co-advisor, Professor Dr. Douglas E. Eveleigh for his excellent advice, invaluable suggestions, and encouragement throughout my Ph.D study, especially during my research at Rutgers. I would like to express my sincere appreciation to my thesis co-advisor, Associate Professor Mukda Kuhirun for her invaluable suggestions and encouragement. Warm thank is expressed to members of my thesis committee, Assistant Professor Dr. Pongtharin Lotrakul, Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawadi, Associate Professor Dr. Warawut Chulalaksananukul, for their useful suggestions and discussions of this work. I would like to express sincere appreciation to my external thesis committee, Dr. Michael Braverman, for his valuable suggestions, discussion and especially his kindness help during my study at Rutgers. I would like to sincerely thank to Professor Timothy D. Leathers for his useful suggestions and excellent polymer analyses. I would like to thank everyone at Department of Biochemistry and Microbiology, Rutgers University, NJ, USDA, Peoria, IL, USA, and the Plant Biomass Utilization Research Unit, CU.

Financial supports for this research were provided by the Royal Golden Jubilee (RGJ) Program, the Thailand Research Fund (4.S.CU/42/Q1) contract number PHD/0143/2542 and Eveleigh-Fenton fund (Rutgers University).

Thanks for all my friends especially my close friend, Mr. Sittipon Intarapat.

Finally, thank you for my beloved mom and my family for sending their emotional supports, sympathies, and warm loves to me always.

TABLE OF CONTENTS

| | Page |
|--|-------------|
| Thai abstract..... | iv |
| English abstract | v |
| Acknowledgements | vi |
| Table of contents | vii |
| List of Tables | ix |
| List of Figures | x |
| Chapter I Introduction..... | 1 |
| Chapter II Literature Review | 3 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | 3 |
| Taxonomy | 3 |
| Ecology..... | 5 |
| Morphology and life cycle..... | 7 |
| Physiology | 11 |
| Application aspects of <i>A. pullulans</i> | 12 |
| Chapter III Materials and Methods | 32 |
| Isolation of fungi..... | 32 |
| Fungal identification | 35 |
| Exopolysaccharide production..... | 37 |
| Analysis of EPS | 38 |
| Enzyme assays | 42 |
| Enhancement of molecular weight of EPS..... | 44 |

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

| | Page |
|---|-------------|
| Chapter IV Results | 46 |
| Isolation of fungi | 46 |
| Fungal identification | 50 |
| Exopolysaccharide production | 77 |
| Exopolysaccharide (EPS) analysis | 86 |
| Enzyme assays | 99 |
| Enhancement of molecular weight of EPS..... | 106 |
| Chapter V Discussion..... | 113 |
| Isolation of fungi | 113 |
| Fungal identification | 114 |
| Exopolysaccharide production | 117 |
| Exopolysaccharide (EPS) analysis | 119 |
| Enzyme assays | 122 |
| Enhancement of molecular weight of EPS..... | 125 |
| Chapter VI Conclusion..... | 127 |
| References..... | 130 |
| Appendices..... | 145 |
| Biography..... | 161 |

LIST OF TABLES

| Table | Page |
|--|------|
| 1 Pullulan yield in relation to <i>A. pullulans</i> strain and carbon source..... | 17 |
| 2 Pullulan yield in relation to <i>A. pullulans</i> strain and temperature..... | 20 |
| 3 Pullulan yield in relation to <i>A. pullulans</i> strain and fermentation method..... | 22 |
| 4 Leaves from plant species collected from five Thai provinces..... | 33 |
| 5 <i>Aureobasidium</i> spp. isolated from habitats and locations in Thailand..... | 48 |
| 6 Carbon assimilation pattern of <i>Aureobasidium</i> isolates from Thailand..... | 75 |
| 7 Nitrogen assimilation pattern of <i>Aureobasidium</i> isolates from Thailand | 76 |
| 8 Comparison of EPS production from <i>A. pullulans</i> isolates..... | 78 |
| 9 Morphological observation using bright-field microscope of <i>Aureobasidium</i> isolates during EPS production..... | 80 |
| 10 Total hexoses and pullulanase sensitivities of all EPSs..... | 87 |
| 11 Functional group of pullulan and EPS detected by IR spectra..... | 89 |
| 12 Comparison of chemical shift of ¹³ C-NMR spectra for all EPSs | 97 |
| 13 Molecular weight of EPSs from <i>A. pullulans</i> at day 3, 5, 7 of production period | 100 |
| 14 Viscosity of EPSs from <i>Aureobasidium</i> spp. at day 3, 5, 7 of production period | 101 |
| 15 Alpha-amylase and pullulanase activities of culture supernatant of <i>Aureobasidium</i> grown on starch (1%) medium | 103 |
| 16 Alpha-amylase and pullulanase activities of culture supernatant of <i>Aureobasidium</i> grown on sucrose (1%) medium | 103 |

LIST OF FIGURES

| Figure | Page |
|---|------|
| 1 Relationship of different morphological forms of <i>A. pullulans</i> | 9 |
| 2 Developmental stages of <i>A. pullulans</i> | 10 |
| 3 Chemical structure of pullulan | 13 |
| 4 (A) Model of pullulan synthesis and transport of pullulan across the cell membrane, (B) structure of probable lipid carrier molecule, dolichol phosphate..... | 15 |
| 5 Enzymatic degradation of pullulan | 27 |
| 6 Pullulan degradation by alpha-amylase | 27 |
| 7 Chemical structure of Poly (β -L-malic acid) | 31 |
| 8 Chemical structure of aureobasidin A..... | 31 |
| 9 NMR spectrophotometer (500 MHz Bruker Advance Spectrometer) | 40 |
| 10 High performance size-exclusion chromatography (HPSEC) | 41 |
| 11 Brookfield Digital Rheometer model DV-III+ | 42 |
| 12 Sampling sites in Thailand where <i>Aureobasidium</i> spp. were found | 47 |
| 13 Colony characteristic of <i>Aureobasidium</i> isolates from Bangkok area | 51 |
| 14 Colony characteristic of <i>Aureobasidium</i> isolates from Loburi area..... | 52 |
| 15 Colony characteristic of <i>Aureobasidium</i> isolates from Nakornratchasima area..... | 52 |
| 16 Colony characteristic of <i>Aureobasidium</i> isolates from Songkhla area | 52 |
| 17 Morphology of isolate BK1 | 53 |
| 18 Morphology of isolate BK2 | 54 |
| 19 Morphology of isolate BK3 | 55 |

LIST OF FIGURES (Cont.)

| Figure | Page |
|--|------|
| 20 Morphology of isolate BK4 | 56 |
| 21 Morphology of isolate BK5 | 57 |
| 22 Morphology of isolate BK6 | 58 |
| 23 Morphology of isolate BK7 | 59 |
| 24 Morphology of isolate LB1 | 60 |
| 25 Morphology of isolate LB2 | 61 |
| 26 Morphology of isolate LB3 | 62 |
| 27 Morphology of isolate NRM1 | 63 |
| 28 Morphology of isolate NRM2 | 64 |
| 29 Morphology of isolate SK1 | 65 |
| 30 Morphology of isolate SK2 | 66 |
| 31 Morphology of isolate SK3 | 67 |
| 32 PCR products of ITS region for all five Thai isolates on agarose gel electrophoresis..... | 69 |
| 33 BLAST results of Thai <i>Aureobasidium</i> isolates compared with other <i>A. pullulans</i> in GenBank | 70 |
| 34 Neighbor-joining tree of <i>A. pullulans</i> isolates based on ITS sequences | 71 |
| 35 Clustal W analysis of ITS1 sequences of <i>Aureobasidium</i> isolates | 72 |
| 36 Clustal W analysis of ITS 2 sequences of <i>Aureobasidium</i> isolates | 73 |
| 37 Effect of carbon upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> BK4..... | 81 |
| 38 Effect of nitrogen upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> BK4 | 81 |
| 39 Effect of carbon upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> BK6..... | 82 |

LIST OF FIGURES (Cont.)

| Figure | Page |
|---|-------------|
| 40 Effect of nitrogen upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> BK6 | 82 |
| 41 Effect of carbon upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> LB3 | 83 |
| 42 Effect of nitrogen upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> LB3..... | 83 |
| 43 Effect of carbon upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> NRM2 | 84 |
| 44 Effect of nitrogen upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> NRM2..... | 84 |
| 45 Effect of carbon upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> SK3 | 85 |
| 46 Effect of nitrogen upon EPS production by <i>Aureobasidium</i> SK3..... | 85 |
| 47 Infrared (IR) Spectra | 88 |
| 48 ¹³ C-NMR spectrum of pullulan (Showa Denko K.K., Japan)..... | 91 |
| 49 ¹³ C-NMR spectrum of EPS from <i>Aureobasidium</i> BK4 | 92 |
| 50 ¹³ C-NMR spectrum of EPS from <i>Aureobasidium</i> BK6 | 93 |
| 51 ¹³ C-NMR spectrum of EPS from <i>Aureobasidium</i> LB3..... | 94 |
| 52 ¹³ C-NMR spectrum of EPS from <i>Aureobasidium</i> NRM1 | 95 |
| 53 ¹³ C-NMR spectrum of EPS from <i>Aureobasidium</i> SK3..... | 96 |
| 54 Alpha-amylase/iodine screening of <i>Aureobasidium</i> strains..... | 102 |
| 55 Native electrophoresis gels of alpha-amylase activities of culture supernatant of <i>Aureobasidium</i> strains grown on starch and sucrose medium... | 105 |
| 56 Survival curve of <i>Aureobasidium</i> NRM2 treated with a range of concentrations of NTG (in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) incubated at 28°C for 30 min..... | 107 |
| 57 Alpha-amylase plates screening of amylase negative <i>Aureobasidium</i> strain NRM2..... | 108 |

LIST OF FIGURES (Cont.)

| Figure | | Page |
|---------------|---|-------------|
| 58 | Alpha-amylase plate screening of <i>Aureobasidium</i> ANM1 (amylase negative via NTG mutation) with no growth or alpha-amylase production | 108 |
| 59 | Molecular weight profiles of EPSs from <i>A. pullulans</i> NRM2 (without amylase inhibitor)..... | 110 |
| 60 | Molecular weight profiles of EPSs from an amylase negative mutant ANM1 . | 111 |
| 61 | Molecular weight profiles of EPSs from strain NRM2 in the presence of Acarbose..... | 112 |


 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย