

ลักษณะสมบัติของ *Aureobasidium pullulans* ไอโซเลต บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับเบส
หลายตำแหน่ง และความสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาอะไมเลสแอกติวิตีกับแบบแผนพอลูลูแลน



นางสาวเพ็ญภา มานิตยโชติพิสิฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF *Aureobasidium pullulans* ISOLATES BASED ON
MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSES AND RELATIONSHIP BETWEEN ALPHA
AMYLASE ACTIVITIES AND PULLULAN PROFILES

Miss Pennapa Manitchotpisit

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biological Sciences

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

510050

Thesis Title CHARACTERIZATION OF *Aureobasidium pullulans* ISOLATES
 BASED ON THE MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSES AND
 RELATIONSHIP BETWEEN ALPHA AMYLASE ACTIVITIES AND
 PULLULAN PROFILES

By Miss Pennapa Manitchotpisit

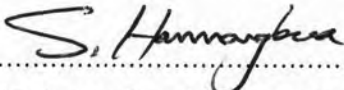
Field of Study Biological Sciences Program

Advisor Associate Professor Hunsa Punnapayak, Ph.D.

Co-Advisor Professor Timothy D. Leathers, Ph.D.

Co-Advisor Assistant Professor Pongtharin Lotrakul, Ph.D.

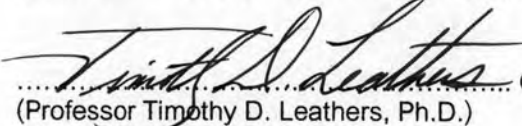
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree


.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

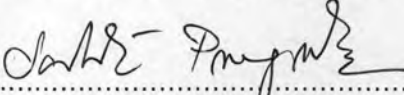

..... Chairman
(Associate Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

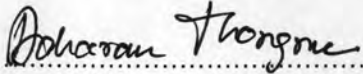

..... Advisor
(Associate Professor Hunsa Punnapayak, Ph.D.)


..... Co-Advisor
(Professor Timothy D. Leathers, Ph.D.)


..... Co-Advisor
(Assistant Professor Pongtharin Lotrakul, Ph.D.)



..... Examiner
(Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.)



..... Examiner
(Sehanat Prasongsuk, Ph.D.)

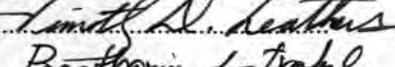

..... External Examiner
(Assistant Professor Acharawan Thongmee, Ph.D.)


เพ็ญมา มานิตยโชติพิสิฐ: ลักษณะสมบัติของ *Aureobasidium pullulans* ไอโซเลต บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับเบสหลายตำแหน่ง และความสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาอะไมเลสแอกติวิตี้กับแบบแผนพุลลูแลน (CHARACTERIZATION OF *Aureobasidium pullulans* ISOLATES BASED ON MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSES AND RELATIONSHIP BETWEEN ALPHA AMYLASE ACTIVITIES AND PULLULAN PROFILES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. พรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: PROF. TIMOTHY D. LEATHERS, Ph.D., ผศ. ดร. พงศ์อาริน โฉมดีตระกูล, 170 หน้า.

สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* เป็นแหล่งสำคัญของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์พุลลูแลนและเอนไซม์ไโซลานเนส ในอุตสาหกรรม *A. pullulans* สายพันธุ์เมืองร้อนได้รับการคัดแยกจากหลากหลายแหล่งการศึกษาในครั้งนี้มีสายพันธุ์จำนวนทั้งสิ้น 53 สายพันธุ์ ได้แก่ 45 สายพันธุ์ใหม่จาก 15 จังหวัดในประเทศไทย 1 สายพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา และอีก 7 สายพันธุ์เปรียบเทียบ สายพันธุ์เหล่านี้ถูกจัดแยกประเภทโดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสหลายตำแหน่ง จำนวนทั้งสิ้น 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS IGS1 EF-1 α BT2 และ RPB2 บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ระบบพันธุ์ สายพันธุ์เหล่านี้ได้ถูกจัดแยกเป็น 12 กลุ่ม ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงความหลากหลายภายในราชนิคมนี้ นอกจากนี้ยังได้ทำการประเมินลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยา การผลิตพุลลูแลน และแอกติวิตี้ของไโซลานเนส เพื่อที่จะบ่งชี้ลักษณะเฉพาะพิเศษของสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่ม ผลการศึกษาแสดงถึงความแตกต่างของสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อบางกลุ่มแสดงให้เห็นว่ามีการผลิตพุลลูแลน และ/หรือแอกติวิตี้ของเอนไซม์ไโซลานเนสในระดับสูง นอกจากนี้ยังมีสองสายพันธุ์ใหม่ที่ได้รับบ่งชี้ว่าอาจเป็นอีกชนิดหนึ่งแต่ยังมีความใกล้เคียงกับ *A. pullulans* เป็นอย่างมาก เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาอะไมเลสแอกติวิตี้กับแบบแผนพุลลูแลน เชื้อจำนวน 5 สายพันธุ์ได้ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตพุลลูแลน ระหว่างทำการเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ถูกจัดเก็บเพื่อประเมินแอกติวิตี้ของแอลฟาอะไมเลสและพุลลูแลนเนส และประเมินแบบแผนของพุลลูแลน ได้แก่ ความไวต่อแอลฟาอะไมเลส ความไวต่อพุลลูแลนเนส น้ำหนักโมเลกุล และความหนืด ผลผลิตพุลลูแลนในแต่ละสายพันธุ์สูงขึ้นตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของพุลลูแลนกลับลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามอะไมเลสแอกติวิตี้ของแต่ละสายพันธุ์กลับมีระดับต่ำเป็นอย่างมาก ระดับของอะไมเลสที่ต่ำมากอาจสามารถย่อยสลายโครงสร้างของ maltotetraose ของพุลลูแลน และทำให้น้ำหนักของโมเลกุลลดลง อาจเป็นไปได้ว่ามีเอนไซม์อื่นที่ยังไม่ทราบลักษณะสมบัติหรือปัจจัยอื่นที่มีผลกับน้ำหนักโมเลกุลของพุลลูแลน นอกจากนี้อนุমানยีนแอลฟาอะไมเลสของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL Y-12974 ได้รับการคัดแยกลักษณะสมบัติ ลำดับเบสจีโนมของยีนแอลฟาอะไมเลสอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วย 2,247 เบส รวม 7 อินทรอน และ 8 เอกซอน อนุমানเอ็มอาร์เอ็นเอมีความยาว 1,878 เบส ถอดรหัสเป็นอะไมเลสจำนวน 625 กรดอะมิโน การวิเคราะห์โดย Southern blot ชี้ให้เห็นว่ายีนนี้มีอยู่เพียงหนึ่งสำเนาในจีโนม และสุดท้ายแอลฟาอะไมเลสเอ็มอาร์เอ็นเอได้รับการตรวจสอบโดย reverse transcription-PCR ที่แสดงให้เห็นว่ามีแอลฟาอะไมเลสเอ็มอาร์เอ็นเอคงอยู่ภายในเซลล์ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ชีวภาพ.....ลายมือชื่อผลิต.....

ปีการศึกษา.....2551.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4773862423 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCES

KEY WORDS: *AUREOBASIDIUM PULLULANS* / PULLULAN / ALPHA AMYLASE

PENNAPA MANITCHOTPISIT: CHARACTERIZATION OF *Aureobasidium pullulans* ISOLATES BASED ON MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSES AND RELATIONSHIP BETWEEN ALPHA AMYLASE ACTIVITIES AND PULLULAN PROFILES. ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., CO-ADVISORS: PROF. TIMOTHY D. LEATHERS, Ph.D., ASST. PROF. PONGTHARIN LOTRAKUL, Ph.D., 170 pp.

The fungus *Aureobasidium pullulans* is the major source of the commercial polysaccharide, pullulan, and also produces xylanase (EC 3.2.1.8). Tropical isolates of *A. pullulans* were isolated from various habitats. A total of 53 isolates used in this study included 45 new isolates from 15 provinces in Thailand, 1 new isolate from the U.S., and 7 comparative strains. These isolates were classified using multilocus sequence analyses from 5 loci including the rRNA ITS region, the rRNA IGS1 region, *EF-1 α* , *BT2*, and *RPB2*. Based on the phylogenetic analyses, isolates were classified into 12 clades indicating a vast diversity within the species. Moreover, morphological characteristics, pullulan production, and xylanase activity were determined for all isolates in an attempt to identify specific characteristics of each clade. The results showed different colors on different culture media, and some clades interestingly exhibited high levels of pullulan production and/or xylanase activity. Moreover, two new isolates were identified as a distinct species closely related to *A. pullulans*. To study the relationship between the activities of α -amylase and pullulan profiles, 5 representative strains were selected and grown in pullulan production medium. During cultivation, each culture broth was collected to assay the α -amylase and pullulanase activities and determine the pullulan profiles, including α -amylase sensitivity, pullulanase sensitivity, molecular weight, and viscosity. Pullulan yields gradually increased over time in individual strains while the molecular weight of pullulan decreased. However, the amylase activity of each strain was very low. It is possible that very low levels of amylase hydrolyze the minor maltotetraose structure of pullulan and cause the reduction of molecular weight, although it is also possible that other as yet uncharacterized enzymes or other factors play a role. Furthermore, the putative α -amylase gene of *A. pullulans* NRRL Y-12974 was characterized. The complete α -amylase gDNA contains 2,247-bp including 7 introns and 8 exons. The putative mRNA was 1,878-bp long encoding an α -amylase of 625 amino acid residues. Southern blot analysis indicated that there was only one copy of this gene in the genome. Finally, α -amylase mRNA was detected using reverse transcription-PCR, which indicated that there was α -amylase mRNA remaining in the cell during cultivation.

Field of Study: Biological Sciences.....Student's Signature: *Pennapa Manitchotpisit*
Academic Year: 2008.....Advisor's Signature: *Hunsa Punnapayak*
Co-Advisor's Signature: *Timothy D. Leathers*
Co-Advisor's Signature: *Pongtharin Lotrakul*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express the greatest appreciation to my advisor, Associate Prof. Dr. Hunsa Punnapayak, for his instruction, guidance, and support throughout this dissertation. My deepest gratitude goes to my co-advisors, Professor Dr. Timothy D. Leathers for his excellent supervision, encouragement, and unlimited generous help and support, as well as to Assistant Prof. Dr. Pongtharin Lotrakul for his wonderful comments, creative ideas, and for dedicating his precious time to help me throughout this work.

My deepest gratitude is also expressed to Dr. Stephen W. Peterson, Dr. Cletus P. Kurtzman, Dr. Christopher D. Skory, and Dr. Xin-Liang Li at National Center for Agricultural Utilization Research, ARS, USDA, Peoria, IL, USA, for their kind assistance, valuable suggestions and comments, and technical support. I am highly grateful to Professor Dr. Douglas E. Eveleigh at Rutgers University, NJ, USA, Assistant Prof. Dr. Patamaporn Sukplang at Rangsit University, and Dr. Lily Eurwilaichitr at National Center for Genetic Engineering and Biotechnology for providing helpful suggestions and generous comments. I would also like to offer special thanks to Dr. Thidarat Nimchua for her help and encouragement, as well as to Miss Pacharawan Deenam for providing her *Aureobasidium pullulans* isolates and sharing morphological techniques.

My grateful appreciation is also extended to Associate Prof. Dr. Kumthorn Thirakhupt, Assistant Prof. Dr. Acharawan Thongmee, Assistant Prof. Dr. Teerapong Buaboocha, and Dr. Sehanat Prasongsuk for their kind suggestions, many useful comments and for serving as the thesis committee.

I am most grateful for the kind assistance provided by all the researchers, technicians, and staff at USDA, Peoria, IL, USA. Thank you for allowing me to do this memorable work. Sincere appreciation to all staff members and friends from the Biological Sciences Ph.D. Program and the Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their assistance and friendship. Thanks also to my colleagues at the Plant Biomass Utilization Research Unit at the Department of Botany for their support. Finally, I would like to acknowledge the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. grant, Thailand Research Fund, for financial support.

CONTENTS

| | Page |
|---|------|
| ABSTRACT (THAI)..... | iv |
| ABSTRACT (ENGLISH) | v |
| ACKNOWLEDGEMENTS..... | vi |
| CONTENTS..... | vii |
| LIST OF TABLES..... | x |
| LIST OF FIGURES..... | xi |
| Chapter | |
| I INTRODUCTION..... | 1 |
| II LITERATURE REVIEWS..... | 5 |
| 2.1 <i>Aureobasidium pullulans</i> | 5 |
| 2.1.1 Taxonomy..... | 5 |
| 2.1.2 Morphology..... | 6 |
| 2.1.3 Ecology..... | 9 |
| 2.1.4 Classification..... | 10 |
| 2.1.5 Applications..... | 12 |
| 2.2 Pullulan..... | 17 |
| 2.2.1 Chemical structure..... | 17 |
| 2.2.2 Chemical analyses..... | 19 |
| 2.2.3 Physiological function..... | 20 |
| 2.2.4 Biosynthesis..... | 20 |
| 2.2.5 Biodegradation..... | 23 |
| 2.2.6 Production..... | 25 |
| 2.2.7 Properties and Applications..... | 28 |
| III MATERIALS AND METHODS..... | 29 |
| 3.1 Multilocus phylogenetic analyses and phenotypic characterization of tropical isolates of <i>Aureobasidium pullulans</i> | |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.1.1 | <i>Aureobasidium</i> isolates..... | 29 |
| 3.1.2 | Phylogenetic analyses..... | 29 |
| 3.1.2.1 | Total DNA isolation..... | 29 |
| 3.1.2.2 | DNA amplification and sequencing..... | 29 |
| 3.1.2.3 | Phylogenetic analyses..... | 30 |
| 3.1.3 | Phenotypic analyses..... | 34 |
| 3.1.3.1 | Morphological characteristics..... | 34 |
| 3.1.3.2 | Xylanase activity..... | 34 |
| 3.1.3.3 | EPS production..... | 35 |
| 3.1.3.4 | NMR spectra..... | 35 |
| 3.2 | Relationship between α -amylase activity and pullulan profiles | |
| 3.2.1 | EPS analyses..... | 37 |
| 3.2.1.1 | α -amylase sensitivity test and pullulanase sensitivity test..... | 37 |
| 3.2.1.2 | Molecular weight determination..... | 38 |
| 3.2.1.3 | Viscosity measurement..... | 38 |
| 3.2.2 | Assay for α -amylase and pullulanase activities..... | 38 |
| 3.2.2.1 | α -amylase screening..... | 38 |
| 3.2.2.2 | Assay for α -amylase and pullulanase activities..... | 39 |
| 3.2.2.3 | Zymogram analysis..... | 39 |
| 3.2.3 | α -amylase gene analyses..... | 40 |
| 3.2.3.1 | Genomic DNA sequence analysis..... | 40 |
| 3.2.3.2 | Southern blot hybridization..... | 43 |
| 3.2.3.3 | Detection of α -amylase mRNA..... | 44 |

IV RESULTS

- 4.1 Multilocus phylogenetic analyses and phenotypic characterization of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.1.1 | <i>Aureobasidium</i> isolates..... | 45 |
| 4.1.2 | Phylogenetic analyses..... | 46 |
| 4.1.3 | Phenotypic analyses..... | 64 |
| 4.2 | Relationship between α -amylase activity and pullulan profiles | |
| 4.2.1 | EPS analyses and α -amylase activity..... | 73 |
| 4.2.2 | Other assays for α -amylase and pullulanase..... | 83 |
| 4.2.2.1 | Pullulanase and α -amylase sensitivity tests... 83 | |
| 4.2.2.2 | α -amylase screening..... | 85 |
| 4.2.2.3 | Zymogram analysis..... | 86 |
| 4.2.3 | α -amylase gene analyses..... | 88 |
| 4.2.3.1 | Genomic DNA sequence analysis..... | 88 |
| 4.2.3.2 | Southern blot hybridization..... | 97 |
| 4.2.3.3 | Detection of α -amylase mRNA..... | 98 |
| V | DISCUSSION AND CONCLUSION..... | 99 |
| 5.1 | Multilocus phylogenetic analyses and phenotypic characterization of tropical isolates of <i>Aureobasidium pullulans</i> | |
| 5.1.1 | <i>Aureobasidium</i> isolates..... | 99 |
| 5.1.2 | Phylogenetic analyses..... | 99 |
| 5.1.3 | Phenotypic analyses..... | 101 |
| 5.2 | Relationship between α -amylase activity and pullulan profiles | |
| 5.2.1 | Growth and extracellular polysaccharide production.. | 105 |
| 5.2.2 | Characteristics of extracellular polysaccharides..... | 107 |
| 5.2.3 | Production of α -amylase..... | 110 |
| 5.2.4 | α -amylase gene analyses..... | 111 |
| | REFERENCES..... | 114 |
| | APPENDICES..... | 132 |
| | VITA..... | 170 |

LIST OF TABLES

| Table | Page |
|---|------|
| 3.1 Primers used for PCR and sequencing reactions in this study..... | 32 |
| 3.2 Primers used for amplification of α -amylase gDNA and mRNA of <i>A. pullulans</i> | 42 |
| 4.1 <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates and other strains used in this study..... | 47 |
| 4.2 Collection sites of <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates and other strains used in this study..... | 50 |
| 4.3 Summary of tree statistics from parsimony analyses of 5 loci in <i>Aureobasidium pullulans</i> | 53 |
| 4.4 Clades of <i>Aureobasidium pullulans</i> and a closely related species with their phenotypes according to multilocus phylogenetic trees..... | 61 |
| 4.5 The α -amylase activity (U/ml) of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 grown in modified PM at day 2, 4, 6, and 8..... | 82 |
| 4.6 The α -amylase and pullulanase sensitivities..... | 83 |
| 4.7 Width of the clear zones of <i>A. pullulans</i> on 1.0% (w/v) starch agar flooded with iodine | 84 |

LIST OF FIGURES

| Figure | Page |
|--------|---|
| 2.1 | Polymorphic forms of <i>Pullularia pullulans</i> (<i>Aureobasidium pullulans</i>)..... 7 |
| 2.2 | The life cycle of <i>Pullularia pullulans</i> (<i>Aureobasidium pullulans</i>).....8 |
| 2.3 | Schematic illustration of polysaccharide layers on the outer surface of <i>Aureobasidium pullulans</i> cell wall..... 13 |
| 2.4 | The primary (major) structure of pullulan..... 18 |
| 2.5 | The secondary (minor) structure of pullulan..... 19 |
| 2.6 | Possible pathway of pullulan biosynthesis and enzymes involved..... 22 |
| 2.7 | Proposed pathway of pullulan biosynthesis.....23 |
| 3.1 | Flow chart of the experiments performed in the study of relationship between α -amylase activity and pullulan profiles.....37 |
| 3.2 | Map of alpha-amylase genome walking of <i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL Y-12974..... 42 |
| 4.1 | Maximum parsimony tree of the ITS region DNA from <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates.....54 |
| 4.2 | Maximum parsimony tree of the IGS1 region DNA from <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates.....55 |
| 4.3 | Maximum parsimony tree of the <i>EF-1α</i> region DNA from <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates.....56 |
| 4.4 | Maximum parsimony tree of the <i>BT2</i> region DNA from <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates.....57 |
| 4.5 | Maximum parsimony tree of the <i>RPB2</i> region DNA from <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates.....58 |
| 4.6 | Maximum parsimony tree of the combined data from <i>BT2</i> , <i>RPB2</i> , <i>EF-1α</i> and ITS region DNA from <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates..... 59 |
| 4.7 | Maximum parsimony tree of the combined data from IGS1, <i>BT2</i> , <i>RPB2</i> , <i>EF-1α</i> and ITS region DNA from <i>Aureobasidium pullulans</i> isolates..... 60 |
| 4.8 | Representatives of colonial morphology of <i>Aureobasidium pullulans</i> and its allies on YMA at day 7.....67 |

| Figure | Page |
|--------|---|
| 4.9 | Representatives of colonial morphology of <i>Aureobasidium pullulans</i> and its allies on MEA at day 7..... 68 |
| 4.10 | Representative microscopic morphology..... 69 |
| 4.11 | Possible natural plasmid found in total DNA isolation from <i>A. pullulans</i> 70 |
| 4.12 | Color rings of colonies of <i>Aureobasidium pullulans</i> isolate CU 13 in clade 8.. 70 |
| 4.13 | ¹ H-NMR spectra of exopolysaccharides (EPS) of <i>Aureobasidium pullulans</i> 71 |
| 4.14 | Analysis of xylanase activity on SDS-PAGE loaded on precast 8 – 16% gels.. 72 |
| 4.15 | Growth curve of <i>A. pullulans</i> cultured in standard PM (5.0% sucrose and 0.1% N-sources) at day 0, 2, 4, 6, and 8..... 76 |
| 4.16 | Growth curve of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 cultured in modified PM at day 0, 2, 4, 6, and 8..... 76 |
| 4.17 | pH measurement of culture supernatants of <i>A. pullulans</i> grown in standard PM (5.0% sucrose and 0.1% N-sources) at day 0, 2, 4, 6, and 8..... 77 |
| 4.18 | pH measurement of culture supernatants of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 grown in modified PM at day 0, 2, 4, 6, and 8..... 77 |
| 4.19 | EPS yield (g/L) of <i>A. pullulans</i> cultured in standard PM (5.0% sucrose and 0.1% N-sources) at day 2, 4, 6, and 8..... 78 |
| 4.20 | EPS yield (g/L) of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 cultured in modified PM at Day 2, 4, 6, and 8..... 78 |
| 4.21 | EPS yield (g EPS dry weight / g cell dry weight) of <i>A. pullulans</i> cultured in standard PM (5.0% sucrose and 0.1% N-sources) at day 2, 4, 6, and 8..... 79 |
| 4.22 | EPS yield (g EPS dry weight / g cell dry weight) of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 cultured in modified PM at day 2, 4, 6, and 8..... 79 |
| 4.23 | Molecular weight (kD) of EPS precipitated from culture supernatants of <i>A. pullulans</i> grown in standard PM (5.0% sucrose and 0.1% N-sources) at day 2, 4, 6, and 8..... 80 |
| 4.24 | Molecular weight (kD) of EPS precipitated from culture supernatants of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 grown in modified PM at day 2, 4, 6, and 8..... 80 |

| Figure | Page |
|--------|---|
| 4.25 | Viscosity (cP) of EPS precipitated from culture supernatants of <i>A. pullulans</i> grown in standard PM (5.0% sucrose and 0.1% N-sources) at day 2, 4, 6, and 8.....81 |
| 4.26 | Viscosity (cP) of EPS precipitated from culture supernatants of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 grown in modified PM at day 2, 4, 6, and 8.....81 |
| 4.27 | The α -amylase activity (U/ml) of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974 grown in modified PM at day 2, 4, 6, and 8.....82 |
| 4.28 | The α -amylase screening test of <i>A. pullulans</i> strains.....84 |
| 4.29 | Zymogram analysis of α -amylase activity.....86 |
| 4.30 | Predicted putative mRNA and the deduced amino acid sequences of α -amylase of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974.....87 |
| 4.31 | Alignment of the entire putative gDNA sequence and the putative mRNA of α -amylase of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974.....89 |
| 4.32 | Complete sequence of α -amylase genomic DNA of <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974.....93 |
| 4.33 | Percent identity of α -amylases amino acid sequences closely related to <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974.....94 |
| 4.34 | Alignment of amino acid sequences of several α -amylases closely related to <i>A. pullulans</i> NRRL Y-12974.....94 |
| 4.35 | Southern blot hybridization on positively charged nylon membrane.....97 |
| 4.36 | Amplification of (A) partial α -amylase and (B) partial 26S rDNA from mRNA and 1 st strand cDNA using RT-PCR and PCR.....98 |