Thesis Title Classical and Genetic Strategies for Screening Secondary Metabolite Production in Fungi

Author Miss Juangjun Jumpathong

Degree Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairperson
Prof. Dr. John F. Peberdy	Member
Asst. Prof. Dr. Puttinan Meepowpan	Member

ABSTRACT

A group of novel endophytic fungal strains was evaluated using biological, chemical and genetic screening approaches. The aim of this work was to study fungal type I polyketide synthase, and to isolate polyketide molecules or other secondary metabolites. Seventy-two endophytic fungi were screened for biosurfactant production by the drop collapse test, but no producing strains were found. Preliminary screening for the production of metabolites with antimicrobial activity was based on the agar well diffusion and paper disc diffusion methods. One hundred and twenty-five fungi were tested against well known type microorganisms; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Only eleven isolates showed antimicrobial activity against at least one of these five test organisms. It is possible that they might produce other useful

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

compounds. The results of pre-biological screening suggested that an investigation of the metabolites produced by the fungus, *Eupenicillium shearii* would be useful. Two endophytic fungi; *Gaeumannomyces amomi* BCC4066 and *Leiosphaerella amomi* BCC4065, and two new saprobic fungi; *Myrothecium pandanicola* and *Emarcea castanopsidicola* were also included for further investigation.

A genetic screening strategy, using degenerate primers encoding ketosynthase (KS) domains, was used to detect lovastatin-type PKSs. Thirty-three KS sequences were isolated from twenty-three different fungal strains associated with Thai medicinal plants and grasses. Phylogenetic analysis based on these sequences suggested that this primer detected a unique subclade of reducing type I PKS which encodes an uncharacterized functional enzyme system. This suggests a novel function for these PKSs. Alternatively, domains of these genes can be used to develop PCR primers which are useful in the exploration of these genes across fungal genera. Ten KS domain sequences were subjected to a study on the diversity of reducing type I PKS in novel ascomycetes fungi.

A pre-chemical screening study of the endophytic fungus *L. amomi,* selected by a qualitative genetic screening approach using BLASTp analysis of the amino acid sequences of clB128KSDI32, displayed about 52% identity to the lovastatin nonaketide synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb03. Thus, *L. amomi* was selected for cultivation in several media for lovastatin production. Fifty-six extracts were screened for lovastatin using preparative thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) but no equivalent molecule was apparent when compared with the standard lovastatin. Chemical investigations of potential strains were confirmed after culture of the fungi in different media.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Structure elucidation was analyzed by spectroscopy techniques. Metabolites in cell extracts from the endophyte *E. shearii* were investigated and three compounds were identified as *p*-hydroxyphenopyrrozin (**1**), phenopyrrozin (**2**), and kojic acid (**3**). A new stemphol derivative, stemphol 1-*O*-*β*-D-galactoside (**7**), together with four known metabolites, kojic acid, ergosterol (**4**), indole-3-carboxylic acid (**5**), and stemphol (**6**) have been isolated by fractionation from an ethyl acetate extract of the cultures of *G. amomi*. Linoleic acid (**8**), sitosterol (**9**), and *p*-hydroxybenzoic acid (**10**) were isolated from the saprobic fungus *E. castanopsidicola*. An extract of *M. pandanicola* gave a colorless oil compound. The structure was elucidated and assigned as 2,3-dihydro-5-methoxy-2-methylchromen-4-one (**11**). Finally, the endophytic fungus *L. amomi* was cultivated in LMA10 medium, and the selected fractions were combined and purified by HPLC. Linoleic acid (**8**), ergosterol (**9**) and an unidentified sterol were identified in the extracts. Endophytic fungi have been suggested as a "wellspring" of novel compounds which offer the potential for medical, agricultural, and industrial exploitation. Therefore, it is necessary and urgent for continued study of endophytes that may be good for future applications.

Keywords: endophytic fungi, fungal secondary metabolite, polyketide, polyketide synthase, stemphol galactoside

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	กลยุทธทั่วไปและกลยุทธทางพันธุศาสตร์สำหรับการคัดกรองการผลิตสารทุติยภูมิในฟังไจ
ผู้เขียน	นางสาวจวงจันทร์ จำปาทอง
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
	Prof. Dr. John F. Peberdy	กรรมการ
	ผศ. ดร. พุฒินันท์ มีเผ่าพันธ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

กลุ่มของเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดใหม่ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพ โดยใช้วิธีคัดกรองทางด้านชีววิทยา เคมีและอณูชีววิทยา จุดมุ่งหมายของการทำวิจัยเพื่อศึกษายีนในกลุ่ม PKS type I และแยกสารในกลุ่มโพลีคีไทค์หรือสารทุติยภูมิอื่นๆ เชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 72 ไอโซเลทถูกนำมาคัดกรองเพื่อหาความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ด้วยวิธี drop collapse ในการคัดกรองขั้นต้นเพื่อหาสารสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อนำเชื้อราจำนวน 125 ไอโซเลทมาทดสอบการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และยีสต์ *Candida albicans* โดยวิธี agar well diffusion และ paper disc diffusion มีเชื้อราเพียง 11 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านทานเชื้อจุลินทรีย์อย่างน้อยหนึ่งชนิดจาก 5 ชนิด อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อราสามารถสร้างสารที่มีประโยชน์ชนิดอื่นๆ ผลจากวิธีคัดกรองทางชีวภาพขั้นต้นบ่งชี้ไปสู่การศึกษาสารเมตาโบไลท์ที่ผลิตจากเชื้อราเอนโดไฟต์ *Eupenicillium shearii*, *Gaeumannomyces amomi* BCC4066, *Leiosphaerella amomi* BCC4065 และเชื้อราแซบโพรพ *Myrothecium pandanicola* และ *Emarcea castanopsidicola* MB500070

กลยุทธทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี PCR และใช้ Degenerate primer ซึ่งออกแบบโดยการแทรกชิ้นส่วนของโดเมน Ketosynthase (KS) ซึ่งเป็นโดเมนหนึ่งของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารโพลีคีไทค์ในกลุ่มของ Lovastatin จากการคัดกรอง ลำดับสายกรดอะมิโนจำนวน 33 สายที่แตกต่างกัน แยกได้จากเชื้อราที่แยกได้จากพืชสมุนไพรและหญ้าไทยจำนวน 23 ไอโซเลท และจากการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์ทาง Phylogenetic โดยใช้ลำดับสายกรดอะมิโนที่ได้จากการทดลอง แสดงให้เห็นว่า Primer สามารถตรวจสอบลักษณะเฉพาะของยีนใน Subclade ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ PK reducing type I ได้เป็นอย่างดีและพบ Subclade ใหม่ที่มีการแทรกระบบหน้าที่ของเอนไซม์ที่ไม่เคยมีการจำแนกลักษณะหรือชนิดมาก่อน การบ่งชี้นี้อาจบ่งบอกถึงหน้าที่ใหม่ของเอนไซม์ในกลุ่ม PK และอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งหากนำโดเมนของยีนเหล่านี้พัฒนาเป็น Primer สำหรับ PCR ซึ่งเป็นประโยชน์ในการค้นหายีนเหล่านี้ในเชื้อรากลุ่มอื่นๆ ต่อไป นอกจากนี้สายลำดับกรดอะมิโนจำนวน 10 สายที่แยกได้จากเชื้อราชนิดใหม่ในกลุ่ม Ascomycetes ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายของยีนในการสังเคราะห์เอนไซม์ PK reducing type I อีกด้วย

การศึกษาคัดกรองขั้นต้นทางเคมีของเชื้อราเอนโดไฟต์ *L. amomi* โดยเลือกจากคุณสมบัติที่ได้จากวิธีคัดกรองทางอณูชีววิทยา เช่น ผลการวิเคราะห์ Blastp ของสายลำดับกรดอะมิโนที่แยกได้จากโคลน B128KSDI32 แสดงค่าความเหมือนของยีนที่สังเคราะห์ Lovastatin nonaketide synthase ของเชื้อรา *Paracoccidioides brasiliensis* Pb03 ด้วยเหตุนี้ *L. amomi* จึงถูกนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สำหรับการผลิตสาร Lovastatin และเมตาโบไลท์ชนิดอื่นๆ สารสกัดจำนวน 56 ตัวอย่างถูกนำมาคัดกรองเพื่อตรวจหาสาร Lovastatin โดยใช้ วิธี TLC และ HPLC แต่ว่าไม่มีสารสกัดชนิดใดมีโมเลกุลเทียบเท่า Lovastatin มาตรฐานระดับวิเคราะห์ การศึกษาทางเคมีของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพได้รับการยืนยันหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารชนิดต่างๆ

การพิสูจน์โครงสร้างวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโทรสโคปีพบว่า สารเมตาโบไลต์ในสารสกัดจากเซลล์ของเชื้อราเอนโดไฟต์ *E. shearii* ได้พิสูจน์โครงสร้างและถูกจำแนกเป็น *p*-Hydroxyphenopyrrozin (**1**) Phenopyrrozin (**2**) และ Kojic acid (**3**) สารอนุพันธ์ Stemphol ชนิดใหม่คือ Stemphol 1-*O*-*β*-D-galactoside (**7**) รวมทั้งสารเมตาโบไลท์อีก 4 ชนิดได้แก่ Kojic acid, Ergosterol (**4**) Indole-3-carboxylic acid (**5**) และ Stemphol (**6**) ถูกแยกแบบลำดับขั้นจากสารสกัดเอทิลอะซีเทตจากส่วนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *G. amomi* นอกจากนี้ สารสกัดจากเชื้อราแซบโพรบ *E. castanopsidicola* ถูกนำมาแยกจนได้สาร Linoleic acid (**8**) Sitosterol (**9**) และ *p*-Hydroxybenzoic acid (**10**) ส่วนสารสกัดที่ได้จาก *M. pandanicola* ถูกนำมาแยกได้สารลักษณะคล้ายน้ำมัน ไม่มีสี โครงสร้างสารได้นำมาพิสูจน์และระบุชื่อสารคือ 2,3-Dihydro-5-methoxy-2-methylchromen-4-one (**11**) สุดท้ายเชื้อราเอนโดไฟต์ *L. amomi* ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ LMA10 และนำ fraction ที่ถูกเลือกมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC โดยจำแนกได้เป็น Linoleic acid, สาร Ergosterol และสารอนุพันธ์สเตียรอยด์ เชื้อราเอนโดไฟต์เปรียบเสมือนแหล่งของสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ๆ ซึ่งนำมาสู่การค้นหาสารที่ใช้ประโยชน์ได้ในทางการแพทย์ เกษตรและอุตสาหกรรมต่อไป อย่างไรก็ดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาเกี่ยวกับเอนโดไฟต์เป็นสิ่งจำเป็นและควรทำอย่างเร่งด่วน เนื่องจากเป็นการศึกษาซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์มากมายในอนาคต

คำสำคัญ: เชื้อราเอนโดไฟต์ สารทุติยภูมิจากเชื้อรา สารโพลีคีไทด์ เอนไซม์สังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ Stemphol galactoside

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved