**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** เอนไซม์ไฟเตสจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง

**ผู้เขียน** นางสาวดนึงกานต์ กลั่นบุศย์

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** รองศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี พีรพรพิศาล

## บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง รวมทั้งคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ชนิดนี้ โดยการใช้สาหร่าย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Synechococcus lividus* Copeland strain SKP50, *S. lividus* strain DSK74, *S. bigranulatus* Skuja strain SKP55 และ *Chroococcidiopsis thermalis* Geitler ที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนในภาคเหนือ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ซึ่งไม่มีแหล่งของฟอสฟอรัสที่มี 0.1% (w/v) calcium phytate โดยเลี้ยงที่ 50 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 6000 lux สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงส่วนที่เป็น intracellular enzyme ของ *S. lividus* strain SKP50, *S. lividus* strain DSK74, *S. bigranulatus* strain SKP55 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็น 1.83 , 1.68 และ 1.77 $mUml^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน ในขณะที่ *Chroococcidiopsis thermalis* มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็น 0.99 $mUml^{-1}$ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสจะพบในช่วงแรกของการเจริญของสาหร่ายและเริ่มลดลงเมื่อการเจริญสูงขึ้น และไม่พบในส่วนของน้ำเลี้ยงที่เป็น extra cellular enzyme หรือพบในปริมาณน้อยมาก ยังพบว่า *S. lividus* strain SKP50 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ 60 องศาเซลเซียส มีความคงตัวโดยสามารถทนอุณหภูมิได้ดีที่สุดคือ 60 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า *S. lividus* strain SKP50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่จำกัดแหล่งของฟอสฟอรัสที่มี 0.1% (w/v) calcium phytate ที่ pH 6.0 ส่วน *S. lividus* strain DSK74, *S. bigranulatus* strain SKP55 และ *Chroococcidiopsis thermalis* สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่ pH 9.0 สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงส่วนที่เป็น intracellular enzyme มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็น 4.74, 3.24, 4.47 และ 3.24 $mUml^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน สำหรับอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์คือที่ 50 องศาเซลเซียส สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงส่วนที่เป็น intracellular enzyme มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็น 4.56, 3.76, 4.42 และ 3.81 $mUml^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ Heterotrophic cultures เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มผลผลิตและผลิตสารบางชนิดจากสาหร่าย จึงได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการใช้แสงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยการเติมน้ำตาลกลูโคส 0.5% (w/v) และ casamino acid 0.02% (w/v) ลงในอาหารข้างต้น โดยทำการทดลองใน 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 มีการเติมแหล่งคาร์บอนคือ $Na_2CO_3$ ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง อีกชุดหนึ่งไม่เติมแหล่งคาร์บอน นำชุดการทดลองทั้งหมดมาเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 30 วัน โดยเก็บเอนไซม์ทุก 6 วัน พบว่าสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ แต่ไม่ดีเท่ากับอาหารที่จำกัดแหล่งของฟอสฟอรัสที่มี 0.1% (w/v) calcium phytate ภายใต้สภาวะที่มีแสง โดยพบว่า *S. lividus* strain DSK74 ที่ไม่มีการเติม $Na_2CO_3$ ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างเจริญได้ดีที่สุด สามารถตรวจพบกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงส่วนที่เป็น intracellular enzyme โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์เป็น 0.16 $mUml^{-1}$ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไฟเตสที่ตรวจพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นการพบไฟเตสครั้งแรกในสาหร่าย ซึ่งเป็นแนวทางที่บ่งบอกในความเป็นไปได้ว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตเอนไซม์นี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**Thesis Title** Phytase from Some Strains of Thermophilic Blue-Green Algae

**Author** Miss Khanuengkan Klanbut

**Degree** Master of Science (Biology)

**Thesis Advisor** Associate Professor Dr. Yuwadee Peerapornpisal

## ABSTRACT

The study on phytase from some strains of thermophilic blue-green algae including some properties of this enzyme by using four isolates i.e. *Synechococcus lividus* Copeland strain SKP50, *S. lividus* strain DSK74, *S. bigranulatus* Skuja and *Chroococcidiopsis thermalis* Geitler, isolated from the hot springs in northern Thailand, were cultivated at 50°C under illumination appoximately 6,000 lux in the phosphate-free medium containing 0.1% (w/v) calcium phytate as a sole phosphorus. The phytase activity was found in intracellular fraction of *Synechococcus lividus* strain SKP50, *S. lividus* strain DSK74 and *S. bigranulatus* SKP55 with the level at 1.83, 1.68 and 1.77 $mUml^{-1}$ respectively, after cultivation for 18 days, whilst 0.99 $mUml^{-1}$ was detected from *Chroococcidiopsis thermalis* at 20 days. Phytase activity was not found in culture broth. The intracellular phytase was found at the starting period of algal growth characteristics and decreased simultaneously with the increasing of growth. The phytase activity in culture broth was found in trace amount in all isolates. The crude intracellular phytase showed the optimal pH at 60°C and stable up 60°C.

The algae produced highest phytase when cultivated in BG11 medium containing 0.1% (w/v) calcium phytate, for *Synechococcus lividus* strain SKP50 had optimum pH at 6.0, *S. lividus* strain DSK74 *S. bigranulatus* and *Chroococcidiopsis thermalis* had optimum pH at 9.0 with the maximum level at 4.74, 3.24, 4.47 and 3.24 $mUml^{-1}$ respectively, after cultivation for 18 days. The

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

optimum temperature were 50°C with the maximum level at 4.56, 3.76, 4.42 and 3.81 $mUml^{-1}$ respectively, after cultivation for 18 days.

Heterotrophic cultures may provide an alternative means for the large-scale production of algal products. Four isolates of thermotolerant blue-green algae were cultivated for 30 days in darkness at 50°C in the phosphate-free medium containing 0.1% (w/v) calcium phytate supplemented with 0.5% (w/v) glucose and 0.02% (w/v) casamino acids and in the presence or absence of 1% (w/v) $Na_2CO_3$ every times that collected samples. The growth rate was considerably slower than that obtained under phototrophic conditions. The highest phytase activity was found in intracellular fraction of *Synechococcus lividus* strain DSK74 in the absence of 1% (w/v) $Na_2CO_3$ with the maximum level at 0.16 $mUml^{-1}$, after cultivation for 18 days.

However, This was the first detection from 4 strains of blue-green algae of phytase among algae. Which was the possible that this microbe was another way to produce this enzyme.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved