การคัดแยกและการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสไปรูลิน่า เพื่อผลิตไฟโคไซยานิน

นางสาว ดวงรัตน์ อินทร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-601-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017894

ISOLATION AND OPTIMIZATION OF SPIRULINA CULTURES FOR PHYCOCYANIN PRODUCTION

MISS DUANGRAT INTHORN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-601-8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Isolation and Optimization of Spirulina Cultures for Phycocyanin Production

By Miss Duangrat Inthorn

Department Biotechnology

Thesis Advisor Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph,D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Assistant Professor Suthep Thaniyavarn, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

..... Member

(Dr.Pongtep Antarikanonda, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Boosya Bunnag)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ดวงรัตน์ อินทร : การคัดแยกและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสไปรูลินา เพื่อผลิตไฟโคไซยานิน (ISOLATION AND OPTIMIZATION OF SPIRULINA CULTURES FOR PHYCOCYANIN PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์, 170 หน้า. ISBN 974-579-601-8

ทำการแยกสาหร่ายสไปรูลินาจากบ่อเลี้ยงเต่าวัดเบญจมบพิตรและบึงมักกะสัน โดยนำมากรองด้วยผ้ากรองขนาด 40 ไมครอนและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซาร์รูค นำสาหร่ายจากสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติมาทำการทดลองด้วยรวมเป็น 3 สายพันธุ์ ทำให้เป็นยูนิแอลกัล โดยวิธีซิงเกิลเซลไอโซเลชัน หาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้สาหร่ายสไปรูลินาสังเคราะห์ไฟโคไซยานินในปริมาณสูง โดยปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซาร์รูคที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนต โซเดียมไนเตรต ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต โซเดียมคลอไรด์ รวมทั้งศึกษาถึงความเข้มของแสงและชนิดของแสงที่เหมาะสมด้วย พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ โซเดียมไบคาร์บอเนต 8.4 กรัม/ลิตร โซเดียมไนเตรต 2.5 กรัม/ลิตร ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.185 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 1 กรัม/ลิตร ความเข้มแสงที่ 5000 ลักซ์ และทั้งในแสงสีเขียวและแสงสีแดงสาหร่ายสังเคราะห์ไฟโคไซยานินในปริมาณปริมาณที่สูงกว่าแสงขาว จากการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงระดับของโซเดียมไนเตรต พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มของโซเดียมไนเตรตจาก 0.33 กรัม/ลิตร เป็น 2.5 กรัม/ลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสไปรูลินาและปริมาณไฟโคไซยานิน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตจาก 2.5 กรัม/ลิตร เป็น 10 กรัม/ลิตร พบว่าไฟโคไซยานินมีปริมาณสูงขึ้น ทำการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาในสภาวะที่เหมาะสม แยกสกัดไฟโคไซยานินและทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20 - 65% นำไปผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลสและเซฟาเดกซ์-150 เมื่อนำไฟโคไซยานินที่ได้ไปตรวจด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟริซิส พบว่าประกอบด้วย 2 แบนด์ ซึ่งมีความเข้มของแบนด์ไม่เท่ากัน ซึ่งคาดว่าจะเป็นไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน นำไปตรวจสอบต่อไปโดยผ่านไฮดรอกซิลอะพาไทท์คอลัมน์ พบว่าสามารถแยกไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานินออกจากกัน โดยพบว่าสามารถแยกได้ไฟโคไซยานินที่บริสุทธิ์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่ามีขนาดโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 14,000 ดาลตัน ในสาหร่ายวัดเบญจฯ และ 13,000 ดาลตัน ในสาหร่ายจากสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติและบึงมักกะสัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวแผ่นเดียว

DUANGRAT INTHORN : ISOLATION AND OPTIMIZATION OF SPIRULINA CULTURES FOR PHYCOCYANIN PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph.D., 170 PP. ISBN 974-579-601-8

Spirulina from Wat Benjamaborpit pond (BP) and from Makkasan pond (MP) were isolated by a 40 µ nylon sieve and cultured in Zarrouk medium. Unialgal cultures were obtained from these 2 strains as well as the third strain donated by the National Inland Fisheries Institute (NIFI) by a technique of Single Cell Isolation. Optimization for high production of phycocyanin was done by varying concentrations of some components in the growth medium. Effects of light intensity and light quality on phycocyanin content were also studied. It was found that the optimal composition of growth medium as well as the intensity of light were the followings : $NaHCO_3$ 8.4 g/l, $NaNO_3$ 2.5 g/l, K_2HPO_4 0.185 g/l, NaCl 1 g/l and light intensity of 5000 lux. Both green and red light stimulated higher phycocyanin production than did white light. The effect of changing the level of $NaNO_3$ was also studied. It was found that adjusting content of $NaNO_3$ from low $NaNO_3$ (0.33 g/l) to that of Zarrouk medium (2.5 g/l) did not affect growth and phycocyanin content. However when the content of $NaNO_3$ was adjusted from that of Zarrouk medium (2.5 g/l) to higher content (10 g/l) phycocyanin was found to increase. Phycocyanin was partially purified by precipitating the crude extract with 20 - 65% ammonium sulfate and subjecting the 65% ammonium sulfate fraction to DEAE-cellulose column and Sephadex G-150 column. The analysis of the obtained phycocyanin by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis showed 2 bands with different band intensity which were assumed to be phycocyanin and allophycocyanin. Further separation by Hydroxylapatite column could separate phycocyanin from allophycocyanin. The molecular weight of phycocyanin subunit as analyzed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis was 14,000 daltons for Spirulina (BP) and 13,000 daltons for Spirulina (NIFI) and Spirulina (MP).

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ .....

ปีการศึกษา 2534 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my supervisor Dr. Aran Incharoensakdi , for his excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis.Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Dr. Suthep Thaniyavarn, Dr. Pongtep Antarikanonda and Assistant Professor Boosya Bunnag for serving as thesis committee, for their constructive comments and also for valuable suggestions.

My appreciation is also expressed to Dr.Suganya Soontaros, Dr. Vichien Rimpanichayakit ,Dr.Tipaporn Limpaseni and Mr.Visitporn Pheunphiphop for valuable comments and special thanks as well go to Dr.Preeda Boonlong for his valuable suggestions and for the access to use Quantum sensor.

I am most thankful to the National Inland Fisheries Institute for the donation of one strain of Spirulina and Miss Pissopa Kitjaharn for her support in helping to collect water samples.

Sincere thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their help in the laboratory and discussion with sincerity and friendships.

Finally, I would like to express my sincere gratitude to my father, my mother and my sisters for their unlimited love, understanding and encouragement. Without them , I would never come to this point.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGMENT..... vi

CONTENT..... vii

LIST OF TABLE..... xi

LIST OF FIGURE..... xii

ABBREVIATION..... xviii

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS..... 17

1. Collection of water samples..... 19

2. Collection and cultivation of Spirulina 19

2.1 Cultivation in a 50 ml flask.... 19

2.2 Cultivation in a 500 ml chamber. 20

3. Isolation of Spirulina..... 20

3.1 Purification of Spirulina..... 20

4. Growth of Spirulina in Zarrouk medium 22

5. Effect of $NaHCO_3$ content..... 25

6. Effect of $NaNO_3$..... 25

7. Effect of K_2HPO_4..... 25

8. Effect of NaCl..... 27

9. Effect of light intensity..... 27

10. Effect of light quality..... 27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. Effect of changing level of nitrate. 28
11.1 Adjusting content of $NaNO_3$ from low to that of Zarrouk medium.. 28
11.2 Adjusting content of $NaNO_3$ from that of Zarrouk to high content 28
12. Partial purification of phycocyanin 29
12.1 Growth of Spirulina..... 29
12.2 Ammonium sulfate precipitation.. 29
12.3 DEAE-cellulose column..... 31
12.4 Sephadex G-150 column..... 32
12.5 Hydroxylapatite column..... 32
13. Determination of protein..... 33
14. Determination of phycocyanin..... 34
15. Determination of dry weight..... 34
16. Polyacrylamide gel electrophoresis. 35
A) Stock solution..... 35
B) Working solution..... 36
C) Electrode buffer for normal gel.. 36
D) Electrode buffer for denaturing gel 36
E) Staining solution..... 37
F) Destaining solution..... 37

CHAPTER III RESULTS..... 39
1. Collection of samples..... 39
2. Isolation and purification of Spirulina 39
3. Optimization studies of Spirulina... 40
3.1 Effect of $NaHCO_3$..... 40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 Effect of $NaNO_3$..... 53
3.3 Effect of K_2HPO_4..... 53
3.4 Effect of NaCl..... 60
3.5 Effect of light intensity on phycocyanin content..... 60
3.6 Result of Spirulina grown under optimized condition versus Zarrouk condition..... 67
4. Comparative study of the effect of light quality on phycocyanin..... 67
4.1 Effect of red light compared with white light..... 74
4.2 Effect of green light compared with white light..... 74
5. Effect of changing level of $NaNO_3$.... 74
5.1 From low to Zarrouk medium..... 74
5.2 From Zarrouk medium to high content 74
6. Partial purification of phycocyanin... 80
6.1 Method for extraction of phyocyanin 80
6.2 Ammonium sulfate precipitation... 80
6.3 Partial purification of phycocyanin 87
6.4 Polyacrylamide gel electrophoresis 107
6.5 SDS-PAGE..... 117
6.6 Hydroxylapatite column..... 127

CHAPTER IV DISCUSSION..... 140
CHAPTER V SUMMARY..... 160

REFERENCES..... 162

APPENDIX..... 169

BIOGRAPHY..... 170

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

		Page
TABLE 1	Locations and characteristic of water samples.....	41
TABLE 2	Result of ammonium sulfate precipitation	88
TABLE 3	Result of partial purification of phycocyanin.....	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Chemical structure of phycocyanin.....	5
Figure 2	The nature and distribution of bilin prosthetic groups.....	7
Figure 3	Isolation dishes.....	21
Figure 4	Preparations of a fine capillary pipette	23
Figure 5	Isolation of a single cell by a capillary pipette.....	24
Figure 6	Cultivation of Spirulina in a 125 ml flask.....	26
Figure 7	Cultivation of Spirulina in 4 l flask.	30
Figure 8	Spirulina from Wat Benjamaborpit pond	44
Figure 9	Spirulina from the National Inland Fisheries Institute.....	45
Figure 10	Spirulina from Makkasan pond.....	46
Figure 11	Growth and phycocyanin contents of Spirulina (BP) at various time intervals	47
Figure 12	Growth and phycocyanin contents of Spirulina(NIFI) at various time intervals	48
Figure 13	Growth and phycocyanin contents of Spirulina (MP) at various time intervals	49
Figure 14	Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various $NaHCO_3$ concentrations	50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 15 Effect of $NaHCO_3$ concentration on phycocyanin at day 12 of three strains of Spirulina..... 52

Figure 16 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various $NaNO_3$ concentrations 54

Figure 17 Effect of $NaNO_3$ concentration on phycocyanin at day 12 of three strains of Spirulina..... 56

Figure 18 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various K_2HPO_4 concentrations 57

Figure 19 Effect of K_2HPO_4 concentration on phycocyanin at day 12 of three strains of Spirulina..... 59

Figure 20 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various NaCl concentrations 61

Figure 21 Effect of NaCl concentration on phycocyanin at day 12 of three strains of Spirulina..... 63

Figure 22 Growth of Spirulina in Zarrouk medium under various light intensities..... 64

Figure 23 Effect of light insities on phycocyanin at day 12 of three strains of Spirulina..... 66

Figure 24 Growth of Spirulina in Zarrouk medium and in optimized Zarrouk medium 68

Figure 25 Phycocyanin content of Spirulina in Zarrouk medium and in optimized Zarrouk medium 70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 26 Optical characteristics of the red and green filters..... 72

Figure 27 Growth of Spirulina in Zarrouk medium under red light and white light..... 75

Figure 28 Growth of Spirulina in Zarrouk medium under green light and white light.... 77

Figure 29 Effect of light quality on phycocyanin at day 12 of three strains of Spirulina 79

Figure 30 Growth of Spirulina (BP) in changing level of $NaNO_3$ concentrations..... 81

Figure 31 Growth of Spirulina (NIFI) in changing level of $NaNO_3$ concentrations..... 82

Figure 32 Growth of Spirulina (MP) in changing level of $NaNO_3$ concentrations..... 83

Figure 33 Effect of changing level of $NaNO_3$ on phycocyanin in Spirulina (BP)..... 84

Figure 34 Effect of changing level of $NaNO_3$ on phycocyanin in Spirulina (NIFI)..... 85

Figure 35 Effect of changing level of $NaNO_3$ on phycocyanin in Spirulina (MP)..... 86

Figure 36 Chromatographic profile of DEAE-cellulose column I from Spirulina (BP)..... 95

Figure 37 Rechromatography of the first DEAE-cellulose column from Spirulina (BP)..... 97

Figure 38 Chromatographic profile of Sephadex G-150 column from Spirulina (BP)..... 99

Figure 39 Chromatographic profile of DEAE-cellulose column I from Spirulina (NIFI)..... 101

Figure 40 Rechromatography of the first DEAE-cellulose column from Spirulina (NIFI)..... 103

Figure 41 Chromatographic profile of Sephadex G-150 column from Spirulina (NIFI)..... 105

Figure 42 Chromatographic profile of DEAE-cellulose column I from Spirulina (MP)..... 108

Figure 43 Rechromatography of the first DEAE-cellulose column from Spirulina (MP)..... 110

Figure 44 Chromatographic profile of Sephadex G-150 column from Spirulina (MP)..... 112

Figure 45 Polyacrylamide gel electrophoresis of phycocyanin from Spirulina (BP)..... 114

Figure 46 Polyacrylamide gel electrophoresis of phycocyanin from Spirulina (NIFI).... 115

Figure 47 Polyacrylamide gel electrophoresis of phycocyanin from Spirulina (MP)..... 116

Figure 48 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of phycocyanin from Spirulina (BP)... 118

Figure 49 Determination of the molecular weight of phycocyanin from Spirulina (BP)... 119

Figure 50 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of phycocyanin from Spirulina (NIFI).. 120

Figure 51 Determination of the molecular weight of phycocyanin from Spirulina (NIFI).. 121

Figure 52 Polyacrylamide gel electrophoresis of phycocyanin from Spirulina (MP)..... 122

Figure 53 Determination of the molecular weight of phycocyanin from Spirulina (MP)... 123

Figure 54 Absorption spectra of fraction of Spirulina (BP)..... 124

Figure 55 Absorbtion spectra of fraction of Spirulina (NIFI)..... 125

Figure 56 Absorbtion spectra of fraction of Spirulina (MP)..... 126

Figure 57 Absorption spectra of "Linablue" in 0.02 M phosphate buffer pH 7.5..... 128

Figure 58 Chromatographic profile on Hydroxylapatite column from Spirulina (BP)..... 129

Figure 59 Chromatographic profile on Hydroxylapatite column from Spirulina (NIFI)..... 131

Figure 60 Chromatographic profile on Hydroxylapatite column from Spirulina (MP)..... 133

Figure 61 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of peak fraction after Hydroxylapatite column..... 135

Figure 62 Absorption spectra of the two major biliproteins of Spirulina (BP) after Hydroxylapatite column..... 136

Figure 63 Absorption spectra of the two major biliproteins of Spirulina (NIFI) after Hydroxylapatite column..... 137

Figure 64 Absorption spectra of the two major biliproteins of Spirulina (MP) after Hydroxylapatite column..... 138

Figure 65 Absorption spectra of 65 % $(NH_4)_2SO_4$ fraction of Spirulina (BP)..... 155

Figure 66 Absorption spectra of 65 % $(NH_4)_2SO_4$ fraction of Spirulina (NIFI)..... 156

Figure 67 Absorption spectra of 65 % $(NH_4)_2SO_4$ fraction of Spirulina (MP)..... 157

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

°C	Degree celcius
hr	hour
l	litre
lb	pound
M	Molar
mg	milligram (10^{-3} gram)
min	minute
ml	millilitre (10^{-3} litre)
mM	millimolar (10^{-3} molar)
nm	nanogram (10^{-6} gram)
OD	Optical density
rpm	revolution per minute
μ	micron
lux	Photometric = 1 lmm^{-2} = 0.0929 $lmft^{2}$ = 0.0929 foot candle = 0.001 Klux
$\mu Es^{-1}m^{-2}$	1 $\mu mols^{-1}m^{-2}$ = 6.022 x 10^{17} photons $s^{-1}m^{-2}$ = 6.002 x 10^{17} quanta $s^{-1}m^{-2}$
PPFD	photosynthetic photon flux density
$E^{1\%}_{1cm}$	The specific extinction coefficients

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย