การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* spp. สำหรับนำมาใช้ในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน

Selection of Blue Green Algae *Oscillatoria* spp. for C-phycocyanin Production

กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ แพรพรรณ เกตุเรืองรอง และสุเปญญา จิตตพันธ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

วัชรี กัลยาลัง

ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ปทุมธานี 12120

เทพปัญญา เจริญรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักและวิศวกรรมชีวเคมี หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย 12120

บทคัดย่อ

ซี-ไฟโคไซยานินเป็นองค์ประกอบหลักของไฟโคบิลิโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยซี-ไฟโคไซยานินเป็นสารที่มีคุณลักษณะเป็นสารสีน้ำเงิน ต้านการเกิดออกซิเดชั่น ต้านการอักเสบ และป้องกันตับจากการถูกทำลาย จึงมีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และเภสัชกรรม ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการคัดเลือกสาหร่ายที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตซี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Oscillatoria* spp. จำนวน 7 สายพันธุ์ โดยใช้อาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เป็น 2 เท่า (เพิ่มจาก 1.5 กรัมต่อลิตร เป็น 3.0 กรัมต่อลิตร) ซึ่งการเพาะเลี้ยงดำเนินการบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิดแสงขาวแบบเย็นที่มีกำลังไฟขนาด 36 วัตต์ ผลการทดลองที่ได้พบว่า *Oscillatoria* sp. BG 00205 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 17.31 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *Oscillatoria* sp. BG 00305 ให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.258 ต่อวัน อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตซี-ไฟโคไซยานินมากที่สุด คือ *Oscillatoria okeni* TISTR 8549 ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงถึง 0.162 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์

สัดส่วนของซี-ไฟโคไซยานินในเซลล์สูงถึง 91.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ อัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 8.10 มิลลิกรัมต่อลิตร.วัน และอัตราการผลิตซีไฟโคไซยานินจำเพาะเท่ากับ 4.55 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์.วัน

คำสำคัญ: ซี-ไฟโคไซยานิน ไฟโคบิลิโปรตีน *Oscillatoria* spp. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

Abstract

C-phycocyanin (C-PC) is a major phycobiliprotein produced by blue green algae. The coloration, antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective characteristics of C-PC make it attract to food, cosmetic, and pharmaceutical industries. In this present study, seven strains of *Oscillatoria* spp. were screened for a suitable C-PC producer using BG-11 medium with elevated $NaNO_3$ concentration 2 times (from 1.5 g/L to 3.0 g/L). The cultivation was carried out on 150 rpm rotary shaker at 25ºC and 12-h light/12-h dark cycles under 36 W cool white fluorescent lamp. The maximum cell dry weight was 17.31 g/L, which obtained from *Oscillatoria* sp. BG 00205 while the highest specific growth rate was presented in *Oscillatoria* sp. BG 00305 (0.258 Day^{-1}). However, the most efficient strain of C-PC producer was *Oscillatoria okeni* TISTR 8549 since it showed highest value of C-PC accumulation, C-PC content in cell, C-PC production rate, and specific C-PC production rate with the value of 0.132 mg/ml, 91.01 mg/g_{cell}, 8.10 mg/L . Day, and 4.55 mg/g_{cell} . Day, respectively.

Keywords: C-phycocyanin, phycobiliprotein, *Oscillatoria* spp., bluegreen algae

1. บทนำ

ไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliprotein) จัดเป็นสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนที่ละลายน้ำ โดยสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม คือ ซี-ไฟโคไซยานินที่มีสีน้ำเงิน (C-PCs; C-Phycocyanins), ไฟโคอิริทริน (PEs; Phycoerythrins) ที่มีสีแดง และอัลโลไฟโคไซยานินที่ไม่มีสี (APCs; Allophycocyanins) สารในกลุ่มนี้พบได้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) สาหร่ายสีเหลืองทอง (Chrysophyta) และในสาหร่ายสีแดงหรือโรโดไฟต์ (Rhodophyta) [1] ด้วยคุณสมบัติที่น่าสนใจจากการมีสีสันของไฟโคบิลิโปรตีน ทำให้สารในกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้เป็นสีผสมในอาหารชนิดต่างๆ เช่น หมากฝรั่ง ลูกอม นมเปรี้ยว ไอศกรีม เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ หรือใช้เป็นสีในเครื่องสำอาง [2-4] และด้วยสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชั่น (antioxidant) ที่มีในซี-ไฟโคไซยานินเมื่อทดสอบในรูปการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับซูเปอร์ออกไซด์ (O^{2-}) หรือหมู่ไฮดรอกซี่ (OH^-) [5] จึงทำให้เครื่องสำอางที่มีส่วนประกอบของซี-ไฟโคไซยานินมีมูลค่าสูงขึ้น นอกจากคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีการนำซี-ไฟโคไซยานินมาใช้ประโยชน์อีกหลายด้าน เช่น ใช้เป็นสารต้านการอักเสบ (antiinflammation) [6] ใช้เป็นเครื่องหมายติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ เพื่อใช้ติดตามการมีชีวิตของเซลล์หรือติดฉลากสารชีวโมเลกุลในงานวิจัยทาง

ชีวภาพ [7, 8] ดังนั้น โปรตีนในกลุ่มไฟโคบิลินจึงเป็นสารที่มีมูลค่าสูง [9, 10]

ในปี ค.ศ. 2006 Soni และคณะ [11] ได้รายงานถึงการสกัดและทำให้ซี-ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria quadripunctulata* ซึ่งสาหร่ายสายพันธุ์ดังกล่าวมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน จึงมุ่งเน้นการคัดเลือกจากสาหร่ายสกุล *Oscillatoria* spp. โดยพิจารณาจากการเติบโตและการผลิตซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* spp. ที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* spp. ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oscillatoria obscura* TISTR 8245, *Oscillatoria okeni* TISTR 8549, *Oscillatoria subbrevis* TISTR 8310, *Oscillatoria* sp. TISTR 8491, *Oscillatoria* sp. BG 00105, *Oscillatoria* sp. BG 00205, และ *Oscillatoria* sp. BG 00305 โดยสายพันธุ์ที่มีรหัส TISTR ได้จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และสายพันธุ์ที่มีรหัส BG เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากโครงการวิจัย เรื่อง การคัดแยกและเก็บรักษาพันธุ์สาหร่ายเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการเรียนการสอน ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการส่งเสริมด้านวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี พ.ศ. 2552

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ อาหาร Blue Green 11 (BG-11) [12] ที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูป $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 2 เท่า โดยเพิ่มจาก 1.5 กรัมต่อลิตรเป็น 3 กรัมต่อลิตร (BG-11 2N) ซึ่งใน 1 ลิตร ประกอบด้วย $NaNO_3$ 3 กรัม, K_2HPO_3 0.04 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.075 กรัม, $CaCl_2.2H_2O$ 0.036 กรัม, กรดซิตริก 6.56×10^{-3} กรัม, เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต 6.0×10^{-3} กรัม, EDTA 1.04×10^{-3} กรัม, Na_2CO_3 0.02 กรัม และ Trace metal mix A5 1 มิลลิลิตร

Trace metal mix A5 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย H_3BO_3 2.86 กรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 1.81 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.222 กรัม, $NaMoO_4.2H_2O$ 0.39 กรัม, $CuSO_4.5H_2O$ 1 มิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้น 79 กรัมต่อลิตร) และ $Co(NO_3)_2.6H_2O$ 1 มิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้น 49.4 กรัมต่อลิตร)

2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำสายพันธุ์สาหร่ายที่เก็บรักษาในอาหารเหลว BG-11 2N มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รวบรวมตะกอนเซลล์ของแต่ละสายพันธุ์ให้ได้ 0.5 มิลลิลิตร ทำการเจือจางเซลล์ด้วยอาหาร BG-11 2N ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร ซึ่งส่วนใหญ่สาหร่ายที่ได้จะอยู่เป็นกลุ่มก้อนของเส้นสาย จึงต้องนำมาทำให้เส้นสายกระจายออกโดยใช้เครื่องกระจายเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Labsonic U, B.Braun; Germany) กำหนดค่าระดับกำลังของเครื่องเท่ากับ 50 วัตต์ ระยะเวลาการทำงาน 3 นาที สลับการทำงาน 5 วินาที และหยุดทำงาน 5 วินาที ใช้สารแขวนลอยเซลล์ที่ได้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ ทำการเติมเชื้อเริ่มต้นที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร BG-11 2N 200

มิลลิลิตร (แต่ละสายพันธุ์ทำ 3 ฟลาสก์) ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ให้แสงด้วยหลอดแสงขาวแบบเย็น (Cool White) ที่มีกำลังไฟขนาด 36 วัตต์ วันละ 12 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 32 วัน

นำกล้าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงไว้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ทำการปรับปริมาตรตะกอนเซลล์แต่ละสายพันธุ์ให้ได้ประมาณ 2.5 มิลลิลิตร เจือจางเซลล์ด้วยอาหาร BG-11 2N ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 40 มิลลิลิตร ทำการกระจายเซลล์โดยทำเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วในขั้นต้น สารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 6.25×10^{-2} มิลลิลิตรของตะกอนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ ซึ่งใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อในการศึกษาต่อไป

2.4 การศึกษาการเติบโตและการผลิตซี-ไฟโคไซยานินของ *Oscillatoria* spp.

การศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการโดยทำการเติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร BG-11 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 2.5×10^{-3} มิลลิลิตรของตะกอนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์หลังทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ให้แสงด้วยหลอดแสงขาวแบบเย็นที่มีกำลังไฟขนาด 36 วัตต์ วันละ 12 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน โดยสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 วัน โดยเก็บตัวอย่างทั้งฟลาสก์ เพื่อวัดความเข้มข้นของเซลล์ และความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน

2.5 วิธีการวิเคราะห์

การวัดความเข้มข้นเซลล์

การวัดความเข้มข้นของเซลล์ในงานวิจัยนี้จะวัดในรูปปริมาตรของตะกอนเซลล์ต่อปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์ โดยนำสารแขวนลอยเซลล์แต่ละฟลาสก์ปริมาตรทั้งหมด 25 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที วัดปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ได้ ซึ่งปริมาตรตะกอนเซลล์ที่วัดได้มาจากสารแขวนลอยเซลล์ 25 มิลลิลิตร เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้สำหรับวัดปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน

ทั้งนี้ พบว่าปริมาตรตะกอนเซลล์จะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้น จึงสามารถนำปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ได้มาคำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งได้ โดยความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาตรตะกอนเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งการดำเนินการดังกล่าวจะทำให้สามารถนำตะกอนเซลล์ไปสกัดซี-ไฟโคไซยานินในขั้นตอนการศึกษาการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน ของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้ การอบแห้งเซลล์จะทำลายซี-ไฟโคไซยานินไปบางส่วน ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณซี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่ายที่ผ่านการอบแห้งแล้วจึงให้ค่าที่ไม่ใช่ค่าที่แท้จริง

การเตรียมเซลล์สาหร่ายและการทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วยวิธีการแช่แข็ง-ละลายเพื่อสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

นำตะกอนเซลล์ที่ได้จากการวัดความเข้มข้นของเซลล์มาเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำสารแขวนลอยเซลล์แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำการแช่แข็ง-ละลายซ้ำๆ

จนเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์ โดยวิธีนี้ Soni และคณะ (2006) [11] ได้รายงานไว้ว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *O. quadripunctulata* ซึ่งในงานวิจัยนี้ดำเนินการแช่แข็ง-ละลายทั้งหมด 6 รอบ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซ-ยานิน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซ-ยานินในงานวิจัยนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Siegelman และคณะ (1978) [13] โดยนำสารแขวนลอยเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกอย่างสมบูรณ์แล้วมาปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร (เท่ากับปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์เริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงในแต่ละฟลาสก์) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสสีน้ำเงินด้านบนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 615 652 และ 730 นาโนเมตร ตามลำดับ แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน (C-PC) อัลโลไซโคไซยานิน (APC) และไฟโคอิริทริน (PE) โดยใช้สมการที่ 1 – สมการที่ 3

ตาราง 1 สมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาตรตะกอนเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์สาหร่าย	สมการเชิงเส้นตรง[1]	r^2
O. obscura TISTR 8245	DCW = 0.0730PCV + 0.0020	0.992
O. okeni TISTR 8549	DCW = 0.1254PCV - 0.0195	0.999
O. subbrevis TISTR 8310	DCW = 0.0603PCV - 0.0380	0.994
Oscillatoria sp. TISTR 8491	DCW = 0.1457PCV - 0.0386	0.999
Oscillatoria sp. BG 00105	DCW = 0.0734PCV - 0.0102	0.996
Oscillatoria sp. BG 00205	DCW = 0.2262PCV - 0.0985	0.992
Oscillatoria sp. BG 00305	DCW = 0.0842PCV - 0.0266	0.999

[1] DCW คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร และ PCV คือ ปริมาตรตะกอนเซลล์ มีหน่วยเป็น มิลลิลิตรต่อลิตร

$$C\text{-}PC(mg/ml) = [A_{615nm} - A_{730nm} - 0.47(A_{652nm} - A_{730nm})]5.34 \quad (1)$$

$$APC(mg/ml) = [A_{652nm} - A_{730nm} - 0.208(A_{615nm} - A_{730})]/5.09 \quad (2)$$

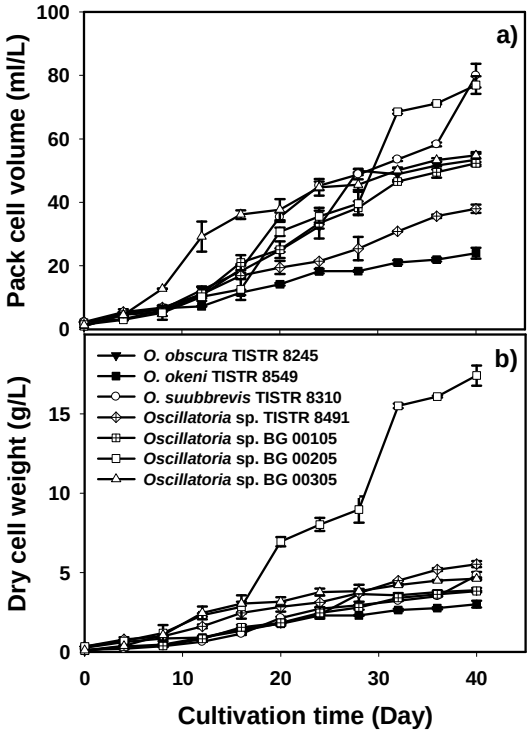
$$PE(mg/ml) = [A_{652nm} - 2.41(C\text{-}PC) - 0.849(APC)]/9.62 \quad (3)$$

3.ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การศึกษาการเติบโตของสาหร่าย *Oscillatoria* spp.

การเติบโตของสาหร่ายในกลุ่มที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน จะถูกจำกัดในสภาวะที่จำกัดไนโตรเจน ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงเพิ่มความเข้มข้นของ $NaNO_3$ จาก 1.5 กรัมต่อลิตร เป็น 3.0 กรัมต่อลิตร (เพิ่มเป็น 2 เท่า) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของเซลล์

สาหร่ายมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนหนึ่งเท่า (ข้อมูลจากการศึกษาขั้นต้น จึงไม่มีการแสดงในที่นี้) ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานของ Singh และคณะ (2009) ที่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ในองค์ประกอบของอาหารสูตร BG-11 นั้นมีส่วนส่งเสริมการเติบโตและการผลิตซี-ไฟโคไซยานินของ *Phormidium ceylanicum* [14]



รูปที่ 1 รูปแบบการเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* spp. ทั้ง 7 สายพันธุ์: a) วิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ในรูปปริมาตรของตะกอนเซลล์ และ b) วิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากรูปที่ 1 และตารางที่ 2 พบว่าสาหร่ายทั้ง 7 สายพันธุ์ มีการเติบโตอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 40 วันของการเพาะเลี้ยง ด้วยอัตราการเติบโตที่แตกต่างกันไป ซึ่งเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในรูปของปริมาตรตะกอนเซลล์ พบว่า *O. subbrevis* TISTR 8310 จะให้ค่าความเข้มข้นเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 79.94 มิลลิลิตรของตะกอนเซลล์ต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับ *Oscillatoria* sp. BG 00205 ที่ให้ค่าเท่ากับ 76.96 มิลลิลิตรของตะกอนเซลล์ต่อลิตร สำหรับอีก 5 สายพันธุ์ที่เหลือให้ค่าต่ำกว่า 55.00 มิลลิลิตรของตะกอนเซลล์ต่อลิตร อย่างไรตาม เมื่อพิจารณาการเติบโตของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์โดยอาศัยค่าความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า *Oscillatoria* sp. BG 00205 ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงที่สุดถึง 17.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่เหลือซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 3.01-5.53 กรัมต่อลิตร เท่านั้น จากผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างขององค์ประกอบที่เป็นน้ำของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากความหนาที่แตกต่างกันของชีทที่ห่อหุ้มเซลล์สาหร่ายซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำ

เมื่อพิจารณาอัตราการเติบโตจำเพาะของแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 2) พบว่า *Oscillatoria* sp. BG 00305 ให้ค่าสูงสุดถึง 0.258 วัน$^{-1}$ ซึ่งสูงกว่า *Oscillatoria* sp. BG 00205 (สายพันธุ์ที่ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด) ถึง 0.101 วัน$^{-1}$ ทั้งนี้ ถึงแม้ว่า *Oscillatoria* sp. BG 00305 จะให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุด แต่พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวจะหยุดการเติบโตที่ประมาณวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเพียง 4.59 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *Oscillatoria* sp. BG 00205 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 17.31 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าอัตราการเติบโตจำเพาะต่ำกว่า ก็ตาม ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า *Oscillatoria* sp. BG 00205 เป็นตัวเลือกที่ดีหากผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการ คือ เซลล์ อย่างไรก็ตาม

ตารางที่ 2 อัตราการเติบโตจำเพาะและความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดของสาหร่าย *Oscillatoria* spp. ทั้ง 7 สายพันธุ์

สายพันธุ์สาหร่าย	อัตราการเติบโตจำเพาะ ($วัน^{-1}$)[1]	ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด[2]	
		ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มล./ล.)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก./ล.)
***O. obscura* TISTR 8245**	0.099	53.38	3.89
***O. okeni* TISTR 8549**	0.066	23.97	2.99
***O. subbrevis* TISTR 8310**	0.148	79.94	4.78
***Oscillatoria* sp. TISTR 8491**	0.113	37.96	5.49
***Oscillatoria* sp. BG 00105**	0.170	52.34	3.83
***Oscillatoria* sp. BG 00205**	0.157	76.96	17.31
***Oscillatoria* sp. BG 00305**	0.258	54.80	4.59

[1] คำนวณโดยใช้ข้อมูลความเข้มข้นของเซลล์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง

[2] ในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ใน 2 รูปแบบ คือ ปริมาตรตะกอนเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง

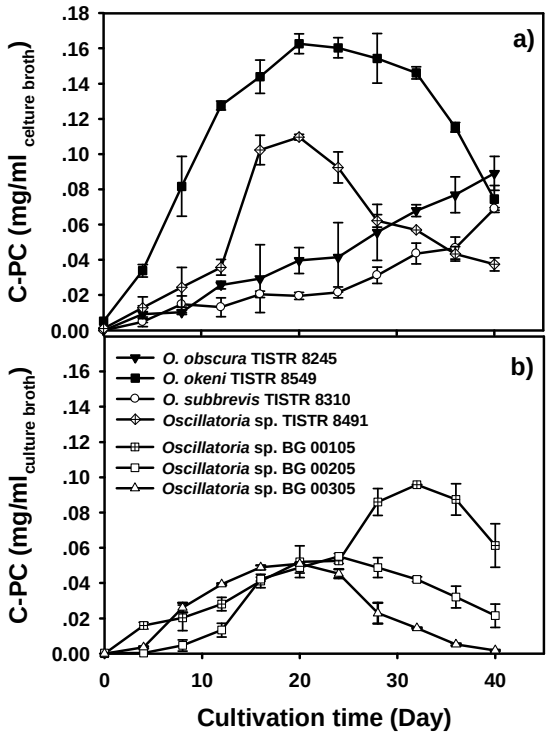
ในการทดลองนี้มุ่งเน้นที่การคัดเลือกสาหร่าย *Oscillatoria* spp. สำหรับนำมาใช้ในการผลิตซี-ไฟโค-ไซยานิน ดังนั้น จึงจำเป็นต้องพิจารณาความสามารถในการผลิตซี-ไฟโคไซยานินร่วมด้วย

3.2 การศึกษาการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน

เนื่องจากซี-ไฟโคไซยานินเป็นผลิตภัณฑ์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ การศึกษาปริมาณซี-ไฟโคไซ-ยานินที่สะสมอยู่ในเซลล์สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์จึงต้องผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้วิธีแช่แข็ง-ละลาย โดยพบว่าเซลล์สาหร่ายทุกสายพันธุ์จะแตกอย่างสมบูรณ์เมื่อผ่านการแช่แข็ง-ละลาย 6 รอบ โดยปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่สะสมในเซลล์สาหร่าย *Oscillatoria* spp. ทั้ง 7 สายพันธุ์ ในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงแสดงดังรูปที่ 2

จากรูปที่ 2 พบว่า *O. obscura* TISTR 8245 และ *O. subbrevis* TISTR 8310 มีการสะสมซี-ไฟโค-ไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีการสะสมซี-ไฟ-โคไซยานินสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งถือว่าใช้เวลามากในการสะสมซี-ไฟโคไซยานิน สำหรับ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 จะเริ่มสะสมซี-ไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.110 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นการสะสมซี-ไฟโคไซยานินจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเมื่อพิจารณาผลที่ได้พบว่าไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน เนื่องจากการเพิ่มขึ้นและลดลงของซีไฟ-โคไซยานินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การเก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่คลาดเคลื่อนจากช่วงเวลาที่ให้ค่าสูงสุดเพียงเล็กน้อยอาจทำให้ได้ผลผลิตซี-ไฟโคไซยานินลดลงมาก

เมื่อพิจารณารูปแบบการสะสมซี-ไฟโคไซยานิน ของ *Oscillatoria* sp. BG 00105 พบว่าการสะสมซี-ไฟโคไซยานินจะเป็นไปอย่างช้าๆ ในช่วง 24 วันแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นการสะสมจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.096 มิลลิกรัม



รูปที่ 2 ซี-ไฟโคไซยานินที่สาหร่ายผลิตขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง : a) *O. obscura* TISTR 8245, *O. okeni* TISTR 8549, *O. subbrevis* TISTR 8310, และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ b) *Oscillatoria* sp. BG 00105, *Oscillatoria* sp. BG 00205, และ *Oscillatoria* sp. BG 00305

ต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ ในวันที่ 32 ของการเพาะเลี้ยงหลังจากนั้นปริมาณซี-ไฟโคไซยานินจะลดลงอย่างต่อเนื่อง

สำหรับ *O. okeni* TISTR 8549, *Oscillatoria* sp. BG 00205 และ *Oscillatoria* sp. BG 00305 พบว่ามีรูป แบบการสะสมซี-ไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นและลดลงคล้ายกัน กล่าวคือจะสะสมซี-ไฟโคไซยานินสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับค่าสูงสุดและจะคงปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่สะสมค่อนข้างคงที่ในช่วงเวลาหนึ่งหลังจากนั้นจึงลดลง จากรูปแบบการสะสมซี-ไฟโคไซยานินลักษณะนี้จะลดความสูญเสียอันเนื่องมาจากความคลาดเคลื่อนของช่วงเวลาที่ทำการเก็บเกี่ยวลงได้ ทั้งนี้ พบว่า *O. okeni* TISTR 8549 จะสะสมซี-ไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง และสะสมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนให้ค่าสูงที่สุดประมาณ 0.144-0.162 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ ในช่วงวันที่ 16-32 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นการสะสมซีไฟโคไซยานินจึงลดลง โดย *Oscillatoria* sp. BG 0020, และ *Oscillatoria* sp. BG 00305 ให้ค่าซี-ไฟโคไซยานินสูงสุดใกล้เคียงกันประมาณ 0.053 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จาก *O. okeni* TISTR 8549

เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณซี-ไฟโคไซยานินที่สะสมสูงสุดในสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 3) พบว่า *O. okeni* TISTR 8549 มีการสะสมซี-ไฟโคไซยานินได้สูงสุดเท่ากับ 0.162 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ รองลงมา คือ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 ซึ่งมีการสะสมซี-ไฟโคไซยานินเท่ากับ 0.110 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ให้ค่าสูงกว่าปริมาณซี-ไฟโคไซยานินจาก *O. quadripunctulata* ที่เคยมีการรายงานโดย Soni และคณะ (2006) [11] ที่มีค่าประมาณ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ เท่านั้น ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาในแง่มุมของสัดส่วนของซี-ไฟโคไซยานินต่อหนึ่งกรัมเซลล์ พบว่า *O. okeni* TISTR 8549 ให้ค่าสูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 91.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์

เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานินและอัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานินจำเพาะ พบว่า *O. okeni* TISTR 8549 ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 8.10 มิลลิกรัม

ต่อลิตร.วัน และ 4.55 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์.วัน ตามลำดับ รองลงมาคือ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 5.50 มิลลิกรัมต่อลิตร.วัน และ 2.10 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์.วัน ตามลำดับ ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาปริมาณซี-ไฟ-โคไซยานินที่สะสมสูงสุดและสัดส่วนของซี-ไฟโคไซยานินต่อหนึ่งกรัมเซลล์ พบว่า *O. okeni* TISTR 8549ให้ค่าเท่ากับ 0.162 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์ และ 91.01 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าและใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าสาหร่ายสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ ใช้เวลาเพียง 20 วัน

สำหรับการสะสมอัลโลไฟโคไซยานินและไฟ-โคอิริทริน พบว่าสาหร่ายทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่นำมาศึกษามีการสะสมรงควัตถุทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าวน้อยมากจึงไม่มีการรายงานผลในบทความนี้ โดยสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากทุกสายพันธุ์จะให้สีน้ำเงินน้ำทะเลซึ่งเป็นสีของซี-ไฟโคไซยานิน

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงสุด สัดส่วนการสะสมซี-ไฟโคไซยานินในเซลล์ อัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน และอัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานินจำเพาะของสาหร่าย *Oscillatoria* spp. ทั้ง 7 สายพันธุ์

สายพันธุ์สาหร่าย	เวลาที่เพาะเลี้ยง (วัน)[1]	เซลล์ (ก./ล.)[2]	C-PC (มก./มล.)[3]	สัดส่วน C-PC ในเซลล์ ($มก._{C\text{-}PC}/ก._{เซลล์}$)[4]	อัตราการผลิต C-PC (มก./ล. วัน)[4]	อัตราการผลิต C-PC จำเพาะ (มก./ก. วัน)[4]
***O. obscura* TISTR 8245**	40	3.89	0.089	22.88	2.23	0.57
***O. okeni* TISTR 8549**	20	1.78	0.162	91.01	8.10	4.55
***O. subbrevis* TISTR 8310**	40	4.78	0.069	14.43	1.73	0.36
***Oscillatoria* sp. TISTR 8491**	20	2.62	0.110	41.98	5.50	2.10
***Oscillatoria* sp. BG 00105**	32	3.42	0.096	28.07	3.00	0.88
***Oscillatoria* sp. BG 00205**	24	8.03	0.055	6.85	2.29	0.29
***Oscillatoria* sp. BG 00305**	20	3.15	0.051	16.19	2.55	0.81

[1] ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงที่สุด

[2] ความเข้มข้นของเซลล์ในวันที่ให้ค่าความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงที่สุด

[3] ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงที่สุดของสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์

[4] คำนวณโดยอาศัยข้อมูลในวันที่ให้ค่าความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินสูงที่สุด

4. สรุป

การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความเหมาะสมในการผลิตซี-ไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ *Oscillatoria* spp. ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ในโครงการวิจัยนี้ได้พิจารณาโดยอาศัยตัวแปรหลายตัวแปรร่วมกัน ได้แก่ ความเข้มข้นของเซลล์ อัตราการเติบโตจำเพาะ (ตารางที่ 2) ความเข้มข้นของซีไฟโคไซยานิน สัดส่วนของซี-ไฟโคไซยานินในเซลล์ อัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน และอัตราการผลิตซีไฟโคไซยานินจำเพาะ (ตารางที่ 3) โดย *Oscillatoria* sp. BG

00305 ให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.258 ต่อวัน แต่ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 4.59 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *Oscillatoria* sp. BG 00205 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 17.31 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการเติบโตจำเพาะเพียง 0.157 ต่อวัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก *Oscillatoria* sp. BG 00205 มีการเติบโตด้วยอัตราการเติบโตสูงตลอดระยะเวลาวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่สาหร่ายอีก 6 สายพันธุ์ มีอัตราการเติบโตลดลงหลังจาก 16 - 20 วันของการเพาะเลี้ยง โดยสาหร่ายที่ให้อัตราการเติบโตจำเพาะและน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด คือ *O. okeni* TISTR 8549 ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 0.066 ต่อวัน และ 2.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความสามารถในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน พบว่า *O. okeni* TISTR 8549 ให้ค่าความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน สัดส่วนของซี-ไฟโคไซยานินในเซลล์ อัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน และอัตราการผลิตซี-ไฟโคไซยานินจำเพาะสูงที่สุด โดยมีค่าสูงกว่า *Oscillatoria* sp. BG 00205 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดถึง 2.95 13.29 3.54 และ 15.69 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ จากรูปแบบการสะสมซี-ไฟโคไซยานินในปริมาณมาก (0.144-0.162 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเซลล์) ในช่วงเวลานาน (วันที่ 16-32 ของการเพาะเลี้ยง) ทำให้การสูญเสียอันเนื่องมาจากความคลาดเคลื่อนของช่วงเวลาที่ทำการเก็บเกี่ยวน้อยลง ดังนั้น *O. okeni* TISTR 8549 จึงเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตซี-ไฟโคไซยานินมากที่สุดจากทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่นำมาศึกษา โดยเมื่อนำสารละลายซี-ไฟโคไซยานินสกัดหยาบที่ได้ *O. okeni* TISTR 8549 มาทำการหาค่าความบริสุทธิ์ (OD_{620}/OD_{280}) พบว่าให้ค่าประมาณ 1.45 ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ ที่เคยมีการรายงานก่อนหน้า คือ *Calothrix* sp., *Oscillatoria quadripunctulata* และ *Spirulina fusiformis* ที่ให้ค่าเท่ากับ 0.40 0.85 และ 0.95 ตามลำดับ [11, 15, 16] ซึ่งช่วยให้ซี-ไฟโคไซยานินที่ได้จาก *O. okeni* TISTR 8549 สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย

5.กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ปี 2552) ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยโครงการนี้ ขอขอบคุณ ดร.อาภารัตน์ มหาขันธ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ส่งเสริมบุคลากรในสังกัดให้ได้ทำงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Bermejo, R., Acién, F.G., Ibáñez, M.J., Fernández, J.M., Molina, E., and Alvarez-Pez, J.M. Expanded Bed Adsorption Chromatography for Recovery of Phycocyanins from the Microalga *Spirulina platensis*, J. Chromatogr B., Vol. 790, pp. 317–325, 2003.

[2] Dainippon Ink and Chemicals Inc., Japanese Patent. 06: 691, 1987.

[3] Batista, A.P., Raymundo, A., Souasa, I., Rheological Characterization of Coloured Oil-In-Water Food Emulsions with Lutein and Phycocyanin Added to the Oil and

Aqueous Phases, Food Hydrocolloids., Vol. 20, pp. 44-52, 2006.

[4] Arad, M.S. and Yaron A., Natural Pigment from Red Microalgae for Use in Foods and Cosmetics, Trends Food Science and Technology., Vol. 3, pp. 92–97, 1992.

[5] Beneditti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., and Canestrari, F., Antioxidant Properties of a Novel Phycocyanin Extract from the Blue green Alga *Aphanizomenon flosaquae*, Life Sci., Vol. 75, pp. 2354-2362, 2004.

[6] Reddy, C.M., Bhat, V.B., Kiranmai, G., Reddy, M.N., Reddanna, P., and Madyastha, K.M., Selective Inhibition of Cyclooxy-genase-2 by C-phocyanin, a Biliprotein from *Spirulina platensis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 3, pp. 599–603, 2000.

[7] Kronick, M.N. and Grossman, A.R., Immunoassay Techniques with Fluorescent Phycobiliprotein Conjugates, Clin., Chem. Vol. 29, pp. 1582–1586, 1983.

[8] Glazer, A.N., Phycobiliproteins, pp. 262-280, In Cohen, Z. (ed) Chemicals from Microalgae, Francis Ltd, UK, 1999.

[9] Pulz, O., Photobioreactors: Production System for Phototrophic Microorganism, Applied Microb. Biotech., Vol. 57, pp. 87–293, 2001.

[10] González, R., Rodriquez, S., Romay, C., Ancheta, O., González, A., Armesto, J., Remirez, D., and Merino, N., Anti-Inflammatory Activity of Phycocyanin Extract in Acetic Acid Induced Colitis in Rat, Pharmacol Res., Vol. 39, pp. 55-59, 1999.

[11] Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., and Madamwar, D., Extraction, Purification and Characterization of Phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* Isolated from the Rocky Shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India, Process Biochem., Vol. 41, pp. 2017–2023, 2006.

[12] Barsanti, L. and Gualtieri P., Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Taylor & Francis, Baca Raton FL, 217 p., 2006.

[13] Siegelman, H., Kycia, J.H., Algalbiliproteins, pp. 71-79, In Hellebust, J.A., Craigie, J.S. (eds), Handbook of Phycological Methods: Physiological Biochemistry Methods, Cambridge University, London, 1978.

[14] Singh, N.K., Parmar, A., and Madamwar, D., Optimization of medium components for Production of C-Phycocyanin from Phormedium ceylanicum and its Purification by Single Step Process, Biresource Tech., Vol. 100, pp. 1663-1669, 2009.

[15] Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E., and Busheva, M.Ch., Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*, J. Biotechnol., Vol. 102, pp. 55-59, 2003.

[16] Santiago-Santos, Ma.C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J., Cañizares-Villanueva, R.O., Extraction and Purification of Phycocyanin from *Calothrix* sp., Process Biochem., Vol. 39, pp. 2047–2052, 2004.