ผลของความเข้มแสงต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp.

Effect of light intensity on C-phycocyanin biosynthesis in *Arthrospira* sp. and *Synechocystis* sp.

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ[1*], กนกนันท์ เอกบรรพต[1], มะลิวัลย์ คุตะโค[1] และ ศรีภาพรรณ ธาระนาถ[1]

Rachanimuk Hiransuchalert[1*], Kanoknun Ekbunpot[1], Maliwan kutako[1] and Sripapan Tharanat[1]

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงปกติ (1 กิโลลักซ์) และสูง (4 กิโลลักซ์) เป็นเวลา 25 และ 40 วันตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองชนิดที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูงมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าภายใต้สภาวะความเข้มแสงปกติ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน 3 รูปแบบ คือสกัดด้วยสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 3 รอบ (1) 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 6 รอบ (2) และ 1M Tris-HCl และแช่แข็ง/ละลาย 6 รอบ (3) พบว่าการใช้สารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer แช่แข็ง/ละลาย 3 รอบให้ผลดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองชนิด โดยปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. มีมากกว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. นอกจากนี้ ซี-ไฟโคไซยานินมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองชนิดภายใต้สภาวะความเข้มแสงสูง การระบุชนิดและสกุลของตัวอย่างสาหร่ายทั้งสองชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของส่วน 16s-23sITS โดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในห้องสมุดยีนพบว่าสาหร่าย *Arthrospira* sp. มีความคล้ายคลึงกับ *Arthrospira platensis* (e-value = 0.0, identity = 100%) ส่วนสาหร่าย *Synechocystis* sp. คล้ายกับสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 (e-value = 0.0 identity = 99%)

คำสำคัญ: สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน / ความเข้มแสง / ซี-ไฟโคไซยานิน / การสกัด

ABSTRACT: The objective of this research was to determine effects of light intensity on c-phycocyanin biosynthesis of *Arthrospira* sp. *Synechocystis* sp. and cyanobacteria. Both species were cultured under different light intensities (1 klux and 4 klux) for 25 and 40 days respectively. The results suggested that both *Arthrospira* sp. and *Synechocystis* sp. cultured under the higher light intensity (4 klux) showed faster growth. Among 3 extraction methods; Na-phosphate buffer with 3 cycles of freeze-thaw, Na-phosphate buffer with 6 cycles of freeze-thaw and Tris-HCl buffer with 3 cycles of freeze-thaw, the highest concentration of c-phycocyanin found in both cyanobacteria extracts in Na-phosphate buffer with 3 cycles of freeze-thaw ($P<0.05$). The concentration of c-phycocyanin in *Arthrospira* sp. was higher than those *Synechocystis* sp.. Moreover, c-phycocyanin concentration of both *Arthrospira* sp.and *Synechocystis* sp. cultured under 4 klux of light intensity showed significantly decrease ($P<0.05$) compare to cultured under 1 klux of light intensity. The nucleotide blast of 16s-23sITS sequence showed that *Arthrospira* sp. was matched to *Arthrospira platensis* (e-value = 0.0, identity = 100%) and *Synechocystis* sp. was matched to *Synechocystis* sp. PCC 6803 (e-value = 0.0, identity = 99%).

Keywords: cyanobacteria / light intensity / C-Phycocyanin / extraction

บทนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอติกจัดอยู่ในดิวิชั่น Cyanophycophyta มีคุณลักษณะและคุณสมบัติหลายประการที่แตกต่างไปจากสาหร่ายพวกอื่นๆ เช่น รงควัตถุไม่ได้อยู่ในพลาสติดแต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ยังไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เปลี่ยนสีได้ สามารถเคลื่อนไหวได้โดยไม่ใช้หนวด หรือแฟลเจลลา เป็นต้น (กาญจนกาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการสะสมอาหารในรูปไกลโคเจนภายในเซลล์ประกอบด้วยรงควัตถุพวกคลอโรฟิลล์ ทำหน้าที่หลักในการสังเคราะห์แสง (วันเพ็ญ ภูติจันทร์, 2549) และไฟโคบิลิโปรตีนซึ่งยึดอยู่บริเวณผนังด้านนอกของไทลาคอยด์ ทำหน้าที่ในการเก็บแสงที่สาหร่ายได้รับเพื่อใช้สำหรับการสังเคราะห์แสง ไฟโคบิลิโปรตีนเป็นโมเลกุลที่ละลายน้ำได้ เกิดจากการรวมกันของซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) แอลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) ซี-ไฟโคอิริทริน (C-phycoerythrin) และไฟโคอิริโทรไซยานิน (Phycoerythocyanin)

ซี-ไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin) เป็นรงควัตถุสีน้ำเงินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของไฟโคบิลิโปรตีนที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิด จากการศึกษาพบว่าไฟโคไซยานินมีประโยชน์อย่างมากในทางอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม ด้วยคุณสมบัติของรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (วันเพ็ญ ภูติจันทร์, 2549) มีการนำรงควัตถุที่สาหร่ายผลิตไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเป็นสารแต่งสีจากธรรมชาติแทนการใช้สารแต่งสีสังเคราะห์มากมาย โดยใช้ผสมในยา เครื่องสำอางค์ ลิปสติก อายไลเนอร์ และอาหารบางชนิด (L eema et al., 2010) นอกจากคุณสมบัติที่ให้สีแล้ว ไฟโคไซยานินยังมีคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Patel et al., 2006) สารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และช่วยป้องกันเซลล์สมองถูกทำลาย (neuroprotective) (Romay et al., 1998)

ปริมาณไฟโคไซยานินตามธรรมชาติของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละชนิดมีปริมาณไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุของสาหร่าย ความเข้มแสง คุณภาพแสง และเงื่อนไขการเจริญเติบโต (Ajayan et al., 2012) เช่นในสาหร่าย *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* มีไฟโคไซยานินคิดเป็นร้อยละ 40 ของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ (Zhou et al., 2005) การสังเคราะห์พิกเมนต์กลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนของสาหร่ายจะตอบสนองได้ดีต่อการเหนี่ยวนำทางสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะคุณภาพแสง (Chorus and Bartram, 1999) โดย Kumar et al. (2011) พบว่าสภาวะของแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไฟโคบิลิโปรตีนของสาหร่าย *Spirulina platensis* ในการเลี้ยงแบบคราวเดียวคือที่ 2,000 lux และที่ 35 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาการตอบสนองของสาหร่าย *Spirulina* sp. ต่อความเข้มแสงและอุณหภูมิ พบว่าที่ความเข้มแสงสูง 500 $\mu E/m^2/s$ สาหร่ายผลิตไฟโคไซยานินและคลอโรฟิลล์ได้น้อยกว่าที่ความเข้มแสง 100 $\mu E/m^2/s$ (Chaiklahan et al., 2011) เช่นเดียวกับที่มีรายงานในสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* (Raps et al., 1983) การสกัดไฟโคไซยานินในปัจจุบันอาศัยหลักการทำลายผนังเซลล์เพื่อให้ไฟโคไซยานินซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อไทลาคอยด์จะถูกปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ โดยสามารถทำได้หลายวิธี แต่สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) การใช้แรงกล เช่น เครื่องบด คลื่นอัลตราโซนิก และการใช้แรงดันสูง (2) การทำลายทางกายภาพ เช่นความร้อน หรือการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย และ (3) การย่อยด้วยเอนไซม์หรือสารเคมี อย่างไรก็ตาม วิธีที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดไฟโคไซยานินในสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน (ราเชนทร์ ดวงศรี, 2552)

แม้ว่าไฟโคบิลิโปรตีนพบได้มากภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แต่ไฟโคไซยานินที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสังเคราะห์ตามธรรมชาติยังมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณความต้องการในการใช้ประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นเกี่ยวกับการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินภายใต้สภาวะความเข้มแสงที่ต่างกันเพื่อตรวจวัดปริมาณไฟ

โคไซยานินที่สาหร่ายผลิตขึ้น รวมถึงระบุชนิดและสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการศึกษานี้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ของส่วน 16s-23sITS

วิธีการศึกษา

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการศึกษา

สาหร่าย *Arthrospira* sp. ของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตจันทบุรี และ *Synechocystis* sp. ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถูกทำให้สาหร่ายบริสุทธิ์โดยหยดน้ำตัวอย่างที่มีสาหร่ายที่ต้องการลงบนสไลด์และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูดเซลล์ออกจากน้ำตัวอย่างใสในน้ำปลอดเชื้อเพื่อล้างสิ่งสกปรกออก (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2540) จากนั้นนำเซลล์สาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ใส่ในหลอดแก้วที่มีอาหารเหลวสูตร Zarrouk (ที่ความเค็ม 5 ppt) และ BG11 (ที่ความเค็ม 0 ppt) ตามลำดับ จำนวน 1 เซลล์/หลอด วางหลอดในที่มีแสงสว่างจนกว่าเซลล์จะเติบโตประมาณ 3-6 วัน นำกล้าพันธุ์ที่ได้ไปเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปริมาตรอาหาร 100 มล. ปริมาตรหัวเชื้อประมาณ 1-2 มล. (คำนวณความเข้มข้นเริ่มต้นของสาหร่ายด้วยค่าการดูดกลืนแสงให้ได้เท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 560 และ 730 นาโนเมตร ตามลำดับ) ที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงที่ความเข้มแสงจากหลอดแสงสีขาวฟลูออเรสเซนต์ 2 ระดับคือที่ 1 กิโลลักซ์และ 4 กิโลลักซ์ วัดค่าการดูดกลืนแสงทุกวันเพื่อดูการเจริญเติบโตและลักษณะของเซลล์สาหร่าย โดยทำการทดลองที่ความเข้มแสงละ 3 ซ้ำ

การสกัดซี-ไฟโคไซยานินเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด

สกัดซี-ไฟโคไซยานินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Patel et al. (2005) และ Soni et al. (2006) โดยชั่งสาหร่ายสดให้ได้น้ำหนักแน่นอนในช่วง 200-300 มก. ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifugal tube) ขนาด 45 มล. เก็บเซลล์สาหร่ายโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer (pH 7.0) หรือสารละลาย 1M Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาณ 10 มล. ผสมและนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สลับกับการละลายน้ำแข็งที่ 4 องศาเซลเซียส (ทำ 3 และ 6 รอบสำหรับสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer (pH 7.0) และ 3 รอบสำหรับสารละลาย 1M Tris-HCl (pH 8.0)) นำสารแขวนลอยที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ 13,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วนำของเหลวใสสีฟ้าที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 และ 652 นาโนเมตร คำนวณตามสูตรของ Bennett and Bogorad (1973) คำนวณปริมาณซี-ไฟโคไซยานินและค่าความบริสุทธิ์จากสมการ ปริมาณซี-ไฟโคไซยานิน (มก./มล.) = [A620 - 0.474 A652]/ 5.34 (Patel et al., 2005) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อรูปแบบการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

การระบุชนิดและสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการศึกษา

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดของสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. โดยใช้ Tri-reagent แล้วเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยชุดสำเร็จ iScript™ Select cDNA Synthesis เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบ (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของส่วน 16s-23sITS ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ตามงานวิจัยของ Premanandh et al. (2006) (CYB16sITSF: 5'-TgT ggC Tgg ATc ACC TCC TT-3' และ CYB23sITSR: 5'-TCT gTg TgC CTA ggT ATC CAC CgT T-3') ขนาดประมาณ 600 คู่เบส กำหนดสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสดังนี้ 94°C 3 นาที 1 รอบ, 94°C 45 วินาที 50°C 1 นาที 72°C 1 นาที 25 รอบ, 72°C 7 นาที 1 รอบ และใช้สภาวะสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.4 µM และ dNTPs 200 µM

ตรวจสอบผลผ่านอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.2-1.6% และดูผลภายใต้เครื่อง UV transilluminator หลังจากย้อมด้วย ethidium bromide (Sambrook and Russell, 2001) แยกชิ้น PCR Product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up เชื่อมต่อดีเอ็นเอบริสุทธิ์กับ pGEM®-T Easy Vector แล้วทรานสฟอร์มเข้าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 คัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอที่สนใจด้วย blue-white screening จากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอแล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี Automate DNA sequencing และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ในฐานข้อมูล BLAST*N* (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อจำแนกชนิดของสาหร่าย

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาผลของความเข้มแสงต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินภายใต้สภาวะความเข้มแสง 2 ระดับที่แตกต่างกันคือ 1 กิโลลักซ์ (ความเข้มแสงปกติ) และ 4 กิโลลักซ์ (ความเข้มแสงสูง) โดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์และเขย่าขวดวันละ 2 ครั้ง โดยผลการทดลองพบว่าสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp ที่เลี้ยงที่ความเข้มแสงสูงพบว่ามีสีซีดลงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงที่ความเข้มแสงปกติ ลักษณะทางกายภาพของสาหร่าย *Arthrospira* sp. จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีขนาดอยู่ในช่วง 200-500 ไมโครเมตร โดยสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติมีลักษณะเป็นเกลียว เซลล์มีสีเขียวเข้ม (Figure 1A and C) แต่เมื่อนำมาเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูงพบว่ามีลักษณะคลายเกลียว เห็นเป็นเส้นตรงเป็นส่วนใหญ่ และเซลล์มีสีเขียวซีด (Figure1B and C) ลักษณะทางกายภาพของสาหร่าย *Synechocystis* sp. จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีขนาดอยู่ในช่วง 1-2 ไมโครเมตร เซลล์มีลักษณะกลม (Figure 1D) แต่เมื่อนำมาเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูงพบว่าเซลล์มีสีเขียวซีด (Figure 1E and F) การเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ส่งผลให้สาหร่ายมีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันด้วย (Vonshak, 2002) ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina platensis* เมื่อเลี้ยงในสภาวะปกติเซลล์จะมีลักษณะเป็นเกลียว แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ได้รับรังสียูวีและสารเคมี สาหร่ายมีการคลายเกลียวเป็นเส้นตรง (Gao et al., 2007) โดยสาหร่ายเกิดการกลายพันธุ์บริเวณไตรโคม (trichrome) บางส่วนขณะเจริญเติบโต นอกจากนี้ งานวิจัยของ Nomsawai (1998) ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Spirulina platensis* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสงต่างกันพบว่าสาหร่ายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองเมื่อเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูง และเมื่อเปลี่ยนจากความเข้มแสงสูงมาต่ำพบว่าสีของสาหร่ายกลับไปเป็นสีเขียวเช่นเดิม ซึ่งสีที่เปลี่ยนไปภายใต้ความเข้มแสงสูงเกิดจากการลดลงของรงควัตถุ เช่น ไฟโคบิลิโซม และคลอโรฟิลล์เอ เปลี่ยนไปเป็นแคโรทีนอยด์ (Muller et al., 1999)

การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เมื่อเลี้ยงสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ภายใต้สภาวะความเข้มแสงต่างกัน วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกวันโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 และ 730 นาโนเมตรตามลำดับ และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญเติบโต พบว่าทั้งสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูงมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติ โดยสาหร่าย *Arthrospira* sp. ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติและความเข้มแสงสูงมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่วันที่ 22 และวันที่ 13 ตามลำดับ ส่วนสาหร่าย *Synechocystis* sp. เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติและความเข้มแสงสูงมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่วันที่ 35 และวันที่ 20 ตามลำดับ ในการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ความเข้มแสงต่างกัน พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูงมีการเจริญเติบโตเร็วกว่า แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าสาหร่าย

ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติ (Pandey and Tiwari, 2010; Ifeanyi et al., 2011) โดยความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นหากอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะปรับตัวโดยการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มความขุ่นของน้ำ แต่ในทางตรงกันข้ามหากความเข้มแสงที่สูงมากเกินไปอาจยับยั้งการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย (Van Liere and Mur, 1980)

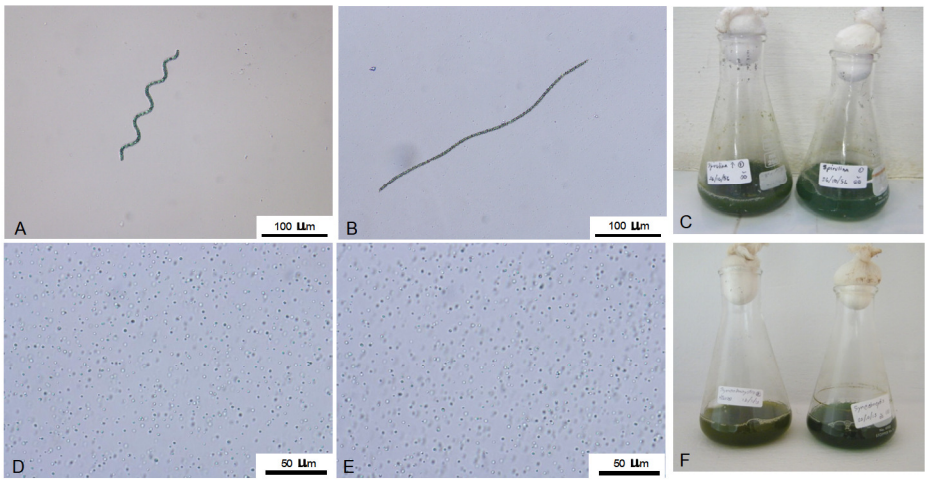

Figure 1 Morphological examination of *Arthrospira* sp. (A-C) and *Synechocystis* sp. (D-F) under light microscope. A, D and left flask = Cyanobacteria cultured under 1 klux of light intensity. B, E and right flask = Cyanobacteria cultured under 4 klux of light intensity.

ปริมาณสารสกัดซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการศึกษา

เก็บเซลล์สาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1 กิโลลักซ์ และ 4 กิโลลักซ์ ในวันที่ 17 และ 10 สำหรับสาหร่าย *Arthrospira* sp. และวันที่ 25 และ 12 สำหรับสาหร่าย *Synechocystis* sp. ตามลำดับ เนื่องจากเป็นระยะที่สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงแต่ละระดับมีการเจริญเติบโตแบบ Log phase ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีและนำมาสกัดซี-ไฟโคไซยานิน พบว่าปริมาณซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงสูงมีปริมาณน้อยกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1 กิโลลักซ์ และ 4 กิโลลักซ์ พบว่า วิธีการสกัดสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสง 1 กิโลลักซ์ ด้วยสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 3 รอบ ให้ผลดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.0698±0.003 mg/ml) ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดสาหร่ายภายใต้ความเข้มแสง 4 กิโลลักซ์ ด้วยสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 3 รอบ (0.0681±0.002 mg/ml) วิธีการสกัดด้วยสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 6 รอบ (0.0218±0.003 และ 0.0084±0.003 mg/ml ตามลำดับ) และวิธีการสกัดด้วยสารละลาย 1M Tris-HCl และแช่แข็ง/ละลาย 6 รอบ (0.0153±0.001 และ 0.0110±0.002 mg/ml ตามลำดับ) โดยความเข้มแสงมีผลต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (**Figure 2 A**)

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Synechocystis* sp. ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1 กิโลลักซ์ และ 4 กิโลลักซ์ พบว่า วิธีการสกัดสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 1 กิโลลักซ์ ด้วยสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 3 รอบ ให้ผลดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.0008±0.001 mg/ml) ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 4 กิโลลักซ์ ด้วยสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 3 รอบ (0.0005±0.0001 mg/ml), วิธีการสกัดด้วยสารละลาย 0.1M Na-phosphate buffer และแช่แข็ง/ละลาย 6 รอบ (0.0004±0.0001 และ 0.0002±0.0001 mg/ml ตามลำดับ) และวิธีการสกัดด้วยสารละลาย 1M Tris-HCl และแช่แข็ง/ละลาย 6 รอบ (0.0002±0.00006 และ 0.0002±0.00006 mg/ml ตามลำดับ) โดยความเข้มแสงมีผลต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Synechocystis* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นวิธีการสกัดด้วยสารละลาย 1M Tris-HCl และแช่แข็ง/ละลาย 6 รอบ (Figure 2 B)

ผลดังกล่าวข้างต้นบ่งชี้ว่า ความเข้มข้นของอนุมูลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีบทบาทสำคัญในการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เจือจางจะทำให้เซลล์สาหร่ายเต่งและแตกจากผลของการเกิด Osmotic shock (Viskari and Colyer, 2003) นอกจากนี้ สาหร่าย *Arthrospira* sp. มีปริมาณซี-ไฟโคไซยานินต่อน้ำหนักมากกว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. วิธีการสกัดซี-ไฟโคไซยานินโดยแช่ในบัฟเฟอร์และแช่แข็ง/ละลาย เป็นวิธีการทำให้ผนังเซลล์สาหร่ายถูกทำลายที่นุ่มนวลและให้ประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ เช่น การใช้คลื่นอัลตราโซนิก และไลโซไซม์ (Soni et al., 2006) ทั้งนี้ วิธีการสกัดในสารละลายร่วมกับแช่แข็ง/ละลายเพียงอย่างเดียว อาจไม่เหมาะสมสำหรับสาหร่ายที่มีเซลล์ขนาดเล็กและรูปร่างกลม

การศึกษาการปรับตัวของ *Microcystis aeruginosa* ต่อความเข้มแสง พบว่าที่ความเข้มแสงสูงสาหร่ายจะมีปริมาณไฟโคไซยานินต่ำ เนื่องจากมีความเข้มข้นของไฟโคบิลิโซม (PBS) ต่ำกว่าสาหร่ายที่เจริญในความเข้มแสงต่ำ สามารถสรุปได้ว่า สาหร่าย *M. aeruginosa* ปรับตัวต่อความเข้มแสงสูงโดยลดจำนวนไทลาคอยด์และ photosynethetic unit หรือไฟโคบิลิโซมต่อเซลล์ลง (Raps et al., 1983; Richmond, 2004) จากงานวิจัยนี้ พบว่าการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองชนิดที่ความเข้มแสง 4 กิโลลักซ์ ส่งผลให้สาหร่ายผลิตไฟโคไซยานินลดลง Kumar et al. (2011) สรุปว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการผลิตไฟโคบิลิโปรตีนคือที่ความเข้มแสงต่ำ เนื่องจากไฟโคบิลิโปรตีนมีค่าลดลงเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น และส่งผลต่อองค์ประกอบรงควัตถุอื่นๆ (Grossman et al., 1993)

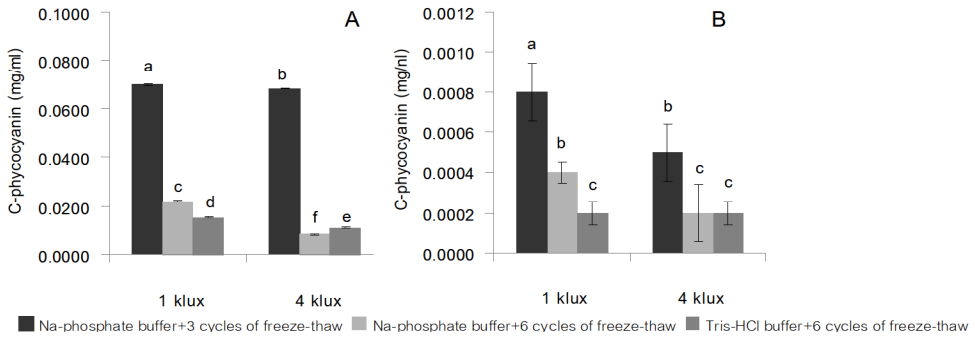

Figure 2 Concentration of c-phycocyanin of *Arthrospira* sp. (A) and *Synechocystis* sp. (B) cultured under 1 klux and 4 klux of light intensities using 0.1M Na-phosphate buffer with 3 cycles of freeze-thaw, 0.1M Na-phosphate buffer with 6 cycles of freeze-thaw and 1M Tris-HCl buffer with 3 cycles of freeze-thaw, respectively.

การระบุชนิดและสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการศึกษา

จากการหานิวคลีโอไทด์บางส่วนของส่วน 16s-23sITS ในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ขนาด 540 และ 530 คู่เบส ตามลำดับ (Figure 3 และ Figure 4) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของส่วน 16s-23sITS ในสาหร่าย *Arthrospira* sp. มีความคล้ายคลึงกับ *Arthrospira platensis* (e-value = 0.0, identity = 100%) ส่วนสาหร่าย *Synechocystis* sp. คล้ายกับสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 (e-value = 0.0 identity = 99%) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S-23S ribosomal DNA spacer ถูกใช้ในการจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดได้อย่างแม่นยำ เช่น *Synechococcus* sp., *Cyanobium* sp., *Cyanobacterium* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* sp., *Phormidium* sp. และอื่นๆ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อจำกัดของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในผลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในห้องสมุดยีนที่มียังไม่มาก ส่งผลให้การจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สามารถระบุได้ถึงสายพันธุ์เพียงไม่กี่ชนิด (Silva et al., 2014)

TGTGGCTGGATCACCTCCTTTTTAGGGAGACCTACTTCAGGACATCGTGCGATGATAATAATAGCCGAGTCTTGAGGTCATCCTTAGGTCGGATGGGGCGGTCAGAGAGCT
TTCAAACTTTAGGGTTCGTGTTATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGGATGGCCCACATCCACCCCAAA
CTGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTTGCACGGCAGAAGTCAGCGGTTCGAGTCCGCTTACCTCCACTCTCCTAGAATTAGGTGCTAGTTGGGGTGAGGTAG
TCTTGAATTGAGAAATTGAGAGTTGGTGACTGTACAGCTCCTAAGTCTGTAGATGTTAATCTAGGACTAGATAGCTGGACATAAGTTCCAGTCAGAACCTTGAAAACTGCA
TAGAGAAAAGCATAATGGTGTAGGAAAACGTCGTAAAGACAATTCCAATGTAGGTCAAGCTACAAAGGGCT***AACGGTGGATACCTAGGCACACAGA***

Figure 3 Nucleotide sequence of 16S-23S ITS of *Arthrospira* sp. (540 bp). The forward primer is boldfaced and underlined. The reverse primer is boldfaced, italicized and underlined.

TGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGAGACCTTTACCCCTTCATCTTGAAAGCAAAGTGCAAATAGAGAGAAGTTGGTCAACCAAAAGGTCGAGCAAGGGATTAACCGAGA
GGTTAAAGAGTAGAAGTCTTTCAAACTATTGCCTAGGCGAGGTAAAAGGCAAGGGCTATTAGCTCAGCTGGTTAGAGCGCACCCCTGGTAAGGGTGAGGTCTCTGGTTCAA
GTCCAGAATGGCCCACCTGACCAAAAAAGCCAAAGAGAAGGATAAACCCTTCAGCATCCTGTCTGATGAGAGTCAGAGGGAATGCTGGATGTAAGTCCAGTAAGGACCTTG
AAAACTGCATAAAGAAAAGAGAAAGCAGGGAAAATCTTGCTCTTCCTAACCGTTTTGATGTTAACCACAAGGCTTTTGGCTGAGTGTGAGACTGAAGGGCGGTGAAGGTAG
GGGGAAAGATGATCCTAGTTAGCAAAAAGAAGATCTTAAAAAGGTCAAGCTACAAAGGGCT***AACGGTGGATACCTAGGCACACAGA***

Figure 4 Nucleotide sequence of 16S-23S ITS of *Synechocystis* sp. (530 bp). The forward primer is boldfaced and underlined. The reverse primer is boldfaced, italicized and underlined.

สรุป

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการมาตรฐานสำหรับการสกัดซี-ไฟโคไซยานินจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละชนิด แต่โดยทั่วไปแล้วคือการทำลายผนังเซลล์ก่อนเพื่อให้สามารถแยกไฟโคไซยานินออกมาได้ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ร่วมกับการแช่แข็ง/ละลาย มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ดีกว่า นอกจากนี้ ความเข้มแสงที่แตกต่างกันส่งผลต่อการผลิตซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะความเข้มแตกต่างกันจะมีการเจริญเติบโตและปริมาณไฟโคไซยานินที่แตกต่างกัน ซึ่งที่ความเข้มแสงสูงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าที่ความเข้มแสงต่ำ แต่มีปริมาณไฟโคไซยานินน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อยู่ในความเข้มแสงต่ำ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน 16S-23S สามารถใช้ระบุชนิดและสกุลของสาหร่าย *Arthrospira* sp. ได้ แต่ไม่สามารถใช้ระบุถึงสกุลของสาหร่าย *Synechocystis* sp.

เอกสารอ้างอิง

กาญจนกาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ราเชนทร์ ดวงศรี. 2552. การสกัดและความคงตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูไลนา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีอาหาร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2549. วิทยาสาหร่าย. โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.

Ajayan, K. V., Selvaraju, M., and Thirugnanamoorthy, K. 2012. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in Spirulina platensis by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. Biomass and Bioenergy. 47:436-441.

Bennett, A. and Bogorad, L. 1973. Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga. Cell Biology. 58:419–435.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., and Bunnag, B. 2011. Separation and purification of phycocyanin from Spirulina sp. using a membrane process. Bioresource Technology. 102: 7159-7164.

Chorus, I. and Bartram, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences monitoring and management. St Edmundsbury Press, New York.