การผลิตไฟโคไซยานินจาก *Aphanothece halophytica* และการทำให้บริสุทธิ์

นางสาว จันทรพร ทองเอกแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-051-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16185316

PRODUCTION AND PURIFICATION OF PHYCOCYANIN FROM *Aphanothece halophytica*

Miss Jantaporn Thongekkaw

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-051-3

Thesis Title	Production and Purification of Phycocyanin from *Aphanothece halophytica*
By	Miss Jantaporn Thongekkaw
Programme	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

Santi Thoongsuwan

.....Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Toongsuwan, Ph.D.)

Thesis committee

.....Chairman

(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

S. Cheevadhanarak

.....Member

(Assistant Professor Supapon Cheevadhanarak, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จันทรพร ทองเอกแก้ว : การผลิตไฟโคไซยานินจาก อะฟาโนทีค ฮาโลฟิทิกา และการทำให้บริสุทธิ์ (PRODUCTION AND PURIFICATION OF PHYCOCYANIN FROM *Aphanothece halophytica*) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์, 112 หน้า. ISBN 974-632-051-3

ทำการศึกษาวิธีการสกัดไฟโคไซยานินที่เหมาะสมจากสาหร่าย อะฟาโนทีค ฮาโลฟิทิกา พบว่าวิธีการย่อยด้วยไลโซไซม์เป็นวิธีที่ดีที่สุด จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย อะฟาโนทีค ฮาโลฟิทิกา เพื่อผลิตไฟโคไซยานินในปริมาณสูง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ เพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในสูตรอาหาร Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ โดยมีโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร การศึกษาความเข้มแสงที่เหมาะสม พบว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฟโคไซยานินคือ 1,500 ลักซ์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในแสงสีแดง สีเขียว และสีขาว พบว่า สาหร่ายผลิตไฟโคไซยานินในปริมาณสูงตามลำดับดังนี้ แสงสีแดง > แสงสีขาว > แสงสีเขียว เมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของคลอโรฟิลล์ และอุณหภูมิในการเลี้ยงสาหร่าย พบว่า ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของคลอโรฟิลล์เป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสาหร่ายจะสามารถผลิตไฟโคไซยานินได้สูงที่สุด การศึกษาการกลายพันธุ์สาหร่าย อะฟาโนทีค ฮาโลฟิทิกา ทั้งวิธีการฉายแสงอุลตราไวโอเลตหรือการเติมสารเคมีคือ เอ็น เมตทิล เอ็น ไนโตร เอ็น ไนโตรโซกัวนิดีน พบว่า ปริมาณไฟโคไซยานินไม่เพิ่มขึ้นจากเดิม การศึกษาการแยกสกัดไฟโคไซยานินและการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20 - 65% นำไปผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส เมื่อนำไฟโคไซยานินที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเจลที่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซีส พบว่า ประกอบด้วย 1 แบนด์ เมื่อวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย อะฟาโนทีค ฮาโลฟิทิกา ด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซีส พบว่า มีขนาดโมเลกุลประมาณ 17,000 ดาลตัน

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

##C526450 : MAJOR BIOTECNOLOGY
KEY WORD: PHYCOCYANIN / *Aphanothece halophytica* / BLUE GREEN ALGAE
JANTAPORN THONGEKKAW : PRODUCTION AND PURIFICATION OF PHYCOCYANIN FROM *Aphanothece halophytica*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph.D., 112 pp. ISBN 974-632-051-3

The best method for phycocyanin extraction of *Aphanothece halophytica* was lysozyme digestion. The suitable culture medium for *A. halophytica* to produce high content of phycocyanin was prepared by the component of Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium, containing 0.5 M NaCl and $NaNO_3$ as a N-source at 1.5 g/l. The optimal light intensity to produce high yield of phycocyanin was found to be 1,500 lux. Phycocyanin content of *A. halophytica* was the highest when grown under red light followed by those grown under white light and green light, respectively. The initial chlorophyll concentration of 100 µg/ml and the culture temperature of 30 ^{o}C were a condition to produce the highest phycocyanin content in *A. halophytica*. The results of mutation of *A. halophytica* either by irradiation with UV-Light or treated with N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine did not show increased phycocyanin content. 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. The analysis of the purified phycocyanin by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed only one band. The molecular weight of phycocyanin as analyzed by SDS-PAGE for *A. halophytica* was found to be 17,000 daltons.

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ **ลายมือชื่อนิสิต**

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**

ปีการศึกษา 2537 **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** -

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, 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 sincere gratitude is also extended to Dr.Sirirat Rengpipat , Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul and Dr. Supapon Cheevadhanarak for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

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, the greatest gratitude is expressed to my father, my mother and my two brothers for their unlimited love, support and understanding.

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT..... IV

ENGLISH ABSTRACT..... V

ACKNOWLEDGMENTS..... VI

CONTENTS..... VII

LIST OF TABLES..... XII

LIST OF FIGURES..... XIII

ABBREVIATION..... XVII

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS..... 13

1. Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium. 14

2. Methods for Phycocyanin Extraction..... 16

2.1 Extraction by Lysozyme Digestion..... 16

2.2 Extraction with Freeze Thaw Method..... 16

3. Determination of Dry Weight..... 17

4. Effect of Environmental Factors on *Aphanothece halophytica* Cultivation for High Phycocyanin Production..... 17

4.1 Effect of NaCl concentration..... 17

4.2 Effect of N-source..... 17

4.3 Effect of $NaNO_3$ concentration..... 18

4.4 Effect of Nitrate starvation..... 18

4.5 Effect of Light Intensity..... 18

4.6 Effect of Light Quality..... 19

4.7 Effect of Initial Chlorophyll Concentration..... 19

4.8 Effect of Cultivation Temperature.... 19

5. Effect of Mutagenesis on *Aphanothece halophytica* Cultivation for High Phycocyanin Production..... 20

5.1 Mutagenesis of *A. halophytica* by Irradiation with Ultraviolet Light..... 20

5.1.1 Determination of Survival Curve of Mutagenesis of *A. halophytica* by Irradiation with UV-Light..... 20

5.1.2 Selection for Mutants of *A. halophytica*..... 21

5.1.3 Growth and Phycocyanin Content from UV-mutated *A. halophytica*..... 21

5.2 Mutagenesis of *A. halophytica* by Chemical Method (NTG treatment)..... 22

5.2.1 Determination of Survival Curve of Mutagenesis of *A. halophytica* by Treated with NTG..... 22

5.2.2 Selection for Mutants of *A. halophytica* 23

5.2.3 Growth and Phycocyanin Content from NTG-mutated *A. halophytica*..... 23

6. Partial Purification of Phycocyanin from *Aphanothece halophytica*..... 24

6.1 Growth of *Aphanothece halophytica*..... 24

6.2 Ammonium Sulfate Precipitation..... 24

6.3 DEAE-cellulose Column Chromotography.... 25

6.4 Determination of Protein..... 25

6.5 Polyacrylamide Gel Electrophoresis..... 26

A) Stock Solution..... 27

B) Working Solution..... 27

C) Electrode Buffer for Normal Gel..... 27

D) Electrode Buffer for Denaturing Gel.. 28

E) Staining Solution..... 28

F) Destaining Solution..... 28

CHAPTER III RESULTS..... 29

1. Growth of *Aphanothece halophytica*..... 29

2. Methods for Phycocyanin Extraction..... 29

3. Effect of Environment Factors on *Aphanothece halophytica* Cultivation for High Phycocyanin Production..... 34

1. Effect of NaCl Concentration..... 34

2. Effect of N-source..... 38

3. Effect of $NaNO_3$ Concentration..... 38

4. Effect of Nitrate Starvation..... 39

5. Effect of Light Intensity..... 46

6. Effect of Light Quality..... 46

7. Effect of Initial Chlorophyll Concentration..... 52

8. Effect of Cultivation Temperature..... 52

4. Effect of Mutagenesis on *Aphanothece halophytica* Cultivation for High Phycocyanin Production..... 57

1. Mutagenesis of *A. halophytica* by Irradiation with Ultraviolet Light..... 57

1.1 Survival Curve of *A. halophytica* Mutated by Irradiation with UV-Light. 57

1.2 Selection for Mutants of *A. halophytica* 59

1.3 Effect of *A. halophytica* Mutants on Growth and Phycocyanin Content..... 62

2. Mutagenesis of *A. halophytica* by Chemical Method (NTG treatment)..... 66

2.1 Suvival Curve of Mutagenesis of *A. halophytica* by treated with NTG..... 66

2.2 Selection for Mutants of *A. halophytica* 66

2.3 Effect of *A. halophytica* Mutant on Growth and Phycocyanin Content..... 68

5. Partial Purification of Phycocyanin from *Aphanothece halophytica*..... 73

1. Ammonium Sulfate Precipitation..... 73

2. Partial Purification of Phycocyanin..... 73

2.1 DEAE-cellulose Column Chromatography. 75

2.2 Polyacrylamide Gel Electrophoresis... 75

2.3 Determination of Molecular Weight of Phycocyanin from *A. halophytica* by SDS-PAGE..... 82

CHAPTER IV DISCUSSION..... 85

CHAPTER V SUMMARY..... 99

REFERENCES..... 101

APPENDIX..... 108

BIOGRAPHY..... 112

LIST OF TABLES

Page

Table 1 Phycocyanin content at optimal conditions of *Aphanothece halophytica*..... 58

Table 2 Result of Ammonium Sulfate Precipitation..... 74

Table 3 Result of Partial Purification of Phycocyanin.. 80

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Chemical structure of phycocyanin.....	3
2	The nature and distribution of bilin prosthetic groups.....	8
3	Cultivation of *Aphanothece halophytica* in a 250 ml flask.....	15
4	*Aphanothece halophytica*.....	30
5	Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium.....	31
6	Relationship between OD_{650} and dry weight of *Aphanothece halophytica*.....	32
7	Phycocyanin content after lysozyme digestion and freeze thaw extraction from *Aphanothece halophytica*.....	33
8	Growth and phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at various time intervals.....	35
9	Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium containing various NaCl concentrations.....	36
10	Effect of NaCl concentration on phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at day 9..	37
11	Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium containing various N-sources.....	40

Figure Page

12 Effect of type of N-source on phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at day 9..... 41

13 Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium containing various $NaNO_3$ concentrations..... 42

14 Effect of $NaNO_3$ concentration on phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at day 9..... 43

15 Growth of *Aphanothece halophytica* under $NaNO_3$ starvation..... 44

16 Effect of $NaNO_3$ starvation on phycocyanin production in *Aphanothece halophytica*..... 45

17 Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium under various light intensities..... 47

18 Effect of light intensity on phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at day 8..... 48

19 Optical characteristics of the red and green filters..... 49

20 Growth of *Aphanothece halophytica* under red, white and green light..... 50

21 Effect of light quality on phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at day 8..... 51

22 Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium under various initial chlorophyll concentrations.... 53

Figure Page

23 Effect of initial chlorophyll concentration on phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at day 9..... 54

24 Growth of *Aphanothece halophytica* in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium at various cultivation temperatures..... 55

25 Effect of cultivation temperature on phycocyanin content of *Aphanothece halophytica* at day 5..... 56

26 Survival Curve of *Aphanothece halophytica* after irradiation with UV-Light in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium..... 60

27 Growth of normal and UV-Light mutated *Aphanothece halophytica* after subjecting to incubation with or without cycloserine on plate of Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium solidified with 1.5 % agar..... 61

28 Relationships between OD_{650} and dry weight of normal and UV-Light mutated *Aphanothece halophytica* 63

29 Comparison of growth between normal and UV-Light mutated *Aphanothece halophytica*..... 64

30 Comparison of phycocyanin content between normal and UV-Light mutated *Aphanothece halophytica*.... 65

31 Survival Curve of *Aphanothece halophytica* mutant after treatment by various NTG concentrations... 67

Figure Page

32 Growth of normal and NTG treatment mutated *Aphanothece halophytica* after subjecting to incubation with or without cycloserine on plate of Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium solidified with 1.5 % agar..... 69

33 Relationships between OD_{650} and dry weight of normal and NTG treatment mutated *Aphanothece halophytica*..... 70

34 Comparison of growth between normal and NTG treatment mutated *Aphanothece halophytica*..... 71

35 Comparison of phycocyanin content between normal and NTG treatment mutated *Aphanothece halophytica* 72

36 Chromatographic profile of DEAE-cellulose column I from *Aphanothece halophytica*..... 76

37 Rechromatography of the first DEAE-cellulose column from *Aphanothece halophytica*..... 78

38 Polyacrylamide gel electrophoresis of fractions from DEAE-cellulose column (I) and (II) from *Aphanothece halophytica*..... 81

39 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of fractions from 20-65% ammonium sulfate fraction, DEAE-cellulose column (I) and (II) from *Aphanothece halophytica*..... 83

40 Determination of the molecular weight of phycocyanin from *Aphanothece halophytica*..... 84

ABBREVIATION

^{o}C	Degree celcius
g	gramme
hr	hour
in^{2}	square inch
lb	pound
mg	miligram (10^{-3} gram)
ml	mililitre (10^{-3} litre)
mM	milimolar (10^{-3} molar)
M	Molar
μg	microgram (10^{-6} gram)
min	minute
nm	nanometre (10^{-9} metre)
OD	Optical density
rpm	revolution per minute
lux	Photometric = 1 lmm^{-2} = 0.0929 $lmft^{2}$ = 0.0929 foot candle = 0.001 Klux
$E^{1\%}_{1cm}$	The specific extinction coefficients
W	watt
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine