

ชนิดของถังปฏิกรณ์และสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นและสะสมสารแอสตาแซนตินจาก
สาหร่าย *Haematococcus pluvialis*

นางสาวอ้อยใจ ถิ่นปัญญาเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TYPE OF REACTOR AND APPROPRIATE CONDITIONS FOR INDUCTION
AND ACCUMULATION OF ASTAXANTHIN FROM *Haematococcus pluvialis*


Miss Oi-jai Limpanyalert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University


511894


Thesis Title TYPE OF REACTOR AND APPROPRIATE CONDITIONS FOR THE INDUCTION
AND ACCUMULATION OF ASTAXANTHIN FROM *Haematococcus pluvialis*
By Miss Oi-jai Limpanyalert
Field of Study Chemical Engineering
Advisor Associate Professor Prasert Pavasant, PhD.
Co-Advisor Sorawit Powtongsook, Ph.D.

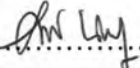
Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

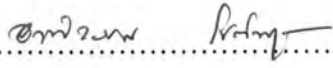
.....Dean of the Faculty of Engineering
(Associate Professor Boonsom Lerdhirunwong, Dr.Ing.)

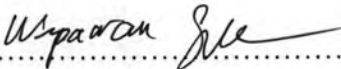
THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Sarawut Rimdusit, Ph.D.)

.....Advisor
(Associate Professor Prasert Pavasant, Ph.D.)

.....Co-Advisor
(Sorawit Powtongsook, Ph.D.)

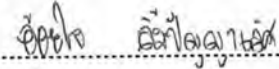
.....Examiner
(Assistant Professor Artiwan Shotipruk, Ph.D.)

.....External Examiner
(Wipawan Siangdung, Ph.D.)

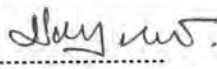
อ้อยใจ ลิ้มปัญญาเลิศ : ชนิดของถังปฏิกรณ์และสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นและสะสมสารแอสตาแซนตินจากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (Type of Reactor and Appropriate Conditions for Induction and Accumulation of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. ประเสริฐ ภาวนันต์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. สรวิศ เผ่าทองสุข, 93 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการผลิตสารสีแอสตาแซนตินจากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* NIESS144 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบเป่าอากาศทางด้านล่าง (bubble column photobioreactor) ขนาด 1.5 ลิตร โดยได้พิจารณาความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นลง 10 20 25 เท่า และพิจารณาความเข้มข้นของอาหารลง 5 10 15 เท่า จากความเข้มข้นสุดท้ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์เวเจเตทีฟ (vegetative cell) ตามลำดับ โดยทำการทดลองภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 0.65 2.73 4.83 และ 6.5 กิโลลักซ์ และแสงจากธรรมชาติในช่วง 70-150 กิโลลักซ์ พบว่า ภายใต้สภาวะแสงควบคุมจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ 6.5 กิโลลักซ์ โดยให้มีการพิจารณาความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นลง 10 เท่า ให้ปริมาณสารสีแอสตาแซนตินสูงสุดที่ 5.39 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 ของการทดลอง และที่สภาวะแสงเดียวกัน แต่ให้มีการพิจารณาอาหารลง 10 เท่า ได้ปริมาณสารแอสตาแซนตินที่ 3.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 6 ของการทดลอง และเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* ภายใต้สภาวะแสงจากธรรมชาติร่วมกับการพิจารณาความเข้มข้นของอาหารลง 10 เท่า จะให้ปริมาณสารสีแอสตาแซนตินสูงสุดที่ 2.24 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 14 ของการทดลอง ขณะที่การพิจารณาความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นลง 10 เท่าภายใต้แสงเดียวกัน ให้ปริมาณสารสีแอสตาแซนตินสูงสุดเพียง 1.56 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 14 ของการทดลอง นอกจากนี้ เมื่อทำการกระตุ้นสารสีแอสตาแซนตินในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยก (airlift photobioreactor) ขนาด 2.7 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีแอสตาแซนตินภายในห้องปฏิบัติการ ที่มีอัตราการให้ปริมาณอากาศเท่ากับในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบเป่าอากาศทางด้านล่างคือ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อวินาที (ความเข้มข้นสารอาหารและเซลล์ถูกพิจารณาลง 10 เท่าจากความเข้มข้นสุดท้ายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เวเจเตทีฟ) พบว่าได้ปริมาณสารสีแอสตาแซนตินสูงสุดที่ 2.1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งในวันที่ 16 ของการทดลอง จากการวิเคราะห์ผลกำไรสุทธิที่ได้จากการทดลองภายในห้องปฏิบัติการพบว่า การพิจารณาความเข้มข้นของเซลล์ลง 25 เท่า ร่วมกับแสง 2.73 กิโลลักซ์ ให้ผลตอบแทนสูงสุด


ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต 

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก 

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม 

4970694021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: PHOTOBIOREACTOR/ ALGAE/ CAROTENOID/ ANTIOXIDANT

OIJAI LIMPANYALERT: TYPE OF REACTOR AND APPROPRIATE CONDITIONS FOR INDUCTION AND ACCUMULATION OF ASTAXANTHIN FROM *Haematococcus pluvialis*. ADVISOR: ASSOC. PROF. PRASERT PAVASANT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: SORAWIT POWTONGSOOK, Ph.D., 93 pp

Vegetative *Haematococcus pluvialis* NIESS144 was investigated for their astaxanthin production. The determination of suitable conditions for the induction of astaxanthin was achieved in 1.5L bubble column photobioreactor. Parameters of interest included nutrient concentration (diluted 5X, 10X, 15X spent medium concentration), initial cell concentrations (diluted 10X, 20X, 25X initial cell concentration), light intensity and mode of illumination (indoor/outdoor). Outdoor experiments were subject to illumination at the light intensity range of 70-150 klux whereas Indoor experiments were with light intensities of 0.65, 2.73, 4.83 and 6.5 klux. Under outdoor condition, the maximum astaxanthin of 2.24% dry weight was found at 10X spent medium dilution after 14 days. Diluting initial cell concentration at outdoor condition could only produce, after 14 days, 1.56% by weight astaxanthin at 10X dilution of the final harvested cell concentration. For indoor experiments, fluorescent lamps were used as a light source. The maximum astaxanthin from indoor conditions was 5.39% by weight (dry) after 8 days at 10X dilution of the final harvested cell concentration and 6.5 klux light intensity whereas the dilution of spent medium concentration (10X) could only reach the maximum of 3.81% after 6 days at 6.5 klux. Induction in the 2.7L airlift photobioreactor was carried out at 10X dilution of the final spent medium concentration, 10X dilution of the final harvested cell concentration and 6.5 klux light intensity. The aeration was supplied to the airlift at the same rate as that in the bubble column photobioreactor (20 cm³/s). Astaxanthin at 2.16% dry weight was obtained in this airlift system after 16 days of operation. Simple economical calculation suggested that the most feasible condition was at 25X dilution of the final harvested cell concentration with the light intensity of 2.73 klux.

Department Chemical Engineering

Field of study Chemical Engineering

Academic year 2008

Student's signature

Advisor's signature

Co-advisor's signature

Oi-jai Limpnyalert




ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Prasert Pavasant, and my co-thesis advisor Sorawit Powtongsook, Ph. D. who made useful suggestion and guidance throughout the process of this research and for spending time discussing on various points.

I would like to thank Assistant Professor Dr. Sarawut Rimdusit, chairman of the committee. Ph. D., Assistant Professor Dr. Artiwan Shotipruk and Dr. Wipawan Siangdung, the member of thesis committee, for their useful comments

I wish to express my thankfulness to all members in the Biochemical Engineering Research Laboratory and Marine Biotechnology Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University for offering laboratory facilities in this research.

There are so many friends to mention from so little space to fill. I would like to give a deep thank to my friends for their friendship, kind assistance and support.

Finally, I would like to express my wholeheartedly thanks and the deepest appreciation to my father, my mother, my sisters, aor and au for their strong encourangment and financial support.

CONTENT

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENT	vii
LIST OF TABLE	ix
LIST OF FIGURES	x
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Motivation	1
1.2 Objectives	2
1.3 Scopes of this work	2
CHAPTER II BACKGROUNDS AND LITERATURE REVIEW	4
2.1 Astaxanthin	4
2.1.1 Chemical properties of astaxanthin	4
2.2.2 Sources of astaxanthin.....	5
2.2 <i>Haematococcus pluvialis</i>	7
2.2.1 Characteristics and reproduction of <i>Haematococcus pluvialis</i>	9
2.2.2 Life cycle of <i>Haematococcus pluvialis</i>	10
2.2.3 Astaxanthin in <i>Haematococcus pluvialis</i>	11
2.2.4 Physical changes during astaxanthin accumulation.....	14
2.3 Process for astaxanthin production	14
2.3.1 Cultivation of <i>Haematococcus pluvialis</i>	15
2.3.2 Induction of astaxanthin	15
2.4 Photobioreactor for the induction of accumulation of astaxanthin	18
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	32
3.1 Experimental set up	32
3.1.1 Set up of the bioreactor for astaxanthin production.....	32
3.1.2 Preparation of the bioreactor.....	33

	Page
3.2 Experimental procedure.....	33
3.3 Determination of growth.....	35
3.3.1 Determination of cell density	35
3.3.2 Determination of astaxanthin productivity	35
3.3.3.Determination of cell dry weight.....	35
3.4 Analytical measurement.....	36
3.4.1 Determination of chlorophyll and astaxanthin.....	36
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	44
4.1 Effect of initial cell concentration.....	44
4.1.1 Indoor experiments.....	44
4.1.2 Outdoor experiments	46
4.2 Effect of medium concentration	47
4.2.1 Indoor experiments	47
4.2.2 Outdoor experiment.....	48
4.3 Effect of light intensity	49
4.3.1 In diluted initial cell concentration.....	49
4.3.2 In diluted spent medium concentration.....	49
4.4 Astaxanthin production in airlift photobioreactor.....	50
4.5 Economical analysis of astaxanthin production for <i>H. pluvialis</i>	51
CHAPTER V CONCLUSION AND CONTRIBUTION.....	72
5.1 Conclusions	72
5.2 Contribution.....	73
5.3 Recommendation.....	73
REFERENCES.....	74
APPENDIX	83
A. List of publication.....	84
B. Calculation.....	85
BIOGRAPHY	93

LIST OF TABLE

	Page
Table 2.1 Properties of astaxanthin	4
Table 2.2 Biological sources of astaxanthin	8
Table 2.3 The optimum condition for green vegetative cells of <i>Haematococcus pluvialis</i>	19
Table 2.4 The optimum condition for red cells of <i>Haematococcus pluvialis</i>	20
Table 2.5 Effect of light intensity on the production of astaxanthin	21
Table 2.6 Effect of pH on the production of astaxanthin	24
Table 2.7 Effect of nitrogen deficiency on the production of astaxanthin.....	25
Table 2.8 Effect of phosphate deficiency on the production of astaxanthin	27
Table 2.9 Effect of salinity on the production of astaxanthin	28
Table 2.10 Advantages and disadvantages of open and closed systems.....	29
Table 2.11 Photobioreactor for the induction of astaxanthin.....	30
Table 3.1 The extinction coefficient and the wavelength of maximum absorption ...	36
Table 4.1 Maximum astaxanthin accumulation at various light intensities	51
Table 4.2 Effect of diluted initial cell concentration on astaxanthin concentration at outdoor condition	51
Table 4.3 Maximum astaxanthin accumulation in each of light intensity.....	51
Table 4.4 Economical analysis for astaxanthin production from diluted initial cell concentration in 1.5L bubble column photobioreactor.	53
Table 4.5 Economical analysis for astaxanthin production from diluting medium concentration in 1.5 L bubble column photobioreactor	54

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Four configurations of astaxanthin	5
Figure 2.2 Lift cycle of <i>Haematococcus pluvialis</i>	11
Figure 2.3 Carotenoid content in <i>Haematococcus pluvialis</i>	12
Figure 2.4 Astaxanthin pathways of <i>Haematococcus pluvialis</i>	13
Figure 3.1 Astaxanthin production in 1.5L bubble column photobioreactor at environmental condition (Outdoor experiments)	37
Figure 3.2 Astaxanthin production in 1.5L bubble column photobioreactor at control condition (Indoor experiments).....	38
Figure 3.3 Astaxanthin production in 2.7L airlift photobioreactor at control condition (Indoor experiments).....	39
Figure 3.4 <i>Haematococcus pluvialis</i>	40
Figure 3.5 Neubauer haemocytometer.....	41
Figure 3.6 Counting cell density	42
Figure 4.1 Cell concentration in the culture with dilution of final cell concentration (from the growth stage).....	58
Figure 4.2 Cell number in indoor experiments at 6.5 klux: DCC is control cell concentration	59
Figure 4.3 Effect of the dilution of initial cell concentration and light intensity on % dry weight at light intensity of 6.5 klux	59
Figure 4.4 Cell number from the first set of outdoor experiments with different initial cell densities	60
Figure 4.5 Cell number from the second set of outdoor experiments with different initial cell densities	61
Figure 4.6 Effect of initial cell concentration on %astaxanthin from the first set of outdoor experiments	62
Figure 4.7 Effect of initial cell concentration on %astaxanthin from the second set of outdoor experiments	62

	Page
Figure 4.8 Cell concentration from the experiments with various medium concentration at various light intensities	63
Figure 4.9 Cell number in indoor experiments at 6.5 klux: DMC is control medium concentration	64
Figure 4.10 Effect of medium concentration on % dry weight at 6.5klux.....	64
Figure 4.11 Cell number from the outdoor experiments with different medium concentration	65
Figure 4.12 Effect of medium concentration on % dry weight in outdoor experiments	66
Figure 4.13 Cell concentration and astaxanthin concentration at various cell dilution rate in 1.5L bubble column photobioreactor	67
Figure 4.14 Cell concentration and astaxanthin concentration at various medium dilution rates in 1.5L bubble column photobioreactor.....	68
Figure 4.15 Cell concentration in 2.7L airlift photobioreactor at 6.5 klux	69
Figure 4.16 Dead zone in airlift.....	69
Figure 4.17 Astaxanthin concentration in 2.7L airlift photobioreactor at 6.5 klux	70