สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลน่า เพื่อผลิตเบต้าแคโรทีน

นางสาว สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537

ISBN 974-583-708-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17113623

OPTIMIZATION OF *Spirulina* spp. CULTURE FOR BETA-CAROTENE PRODUCTION

Miss Saranya Phunpruch

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-583-708-3

Thesis Title Optimization of Spirulina spp. Culture for Beta-carotene Production

By Miss Saranya Phunpruch

Department Biotechnology

Thesis Advisor Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D

Thesis Co-advisor Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D

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

Thavorn Vajrabhaya ..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D)

Thesis Committee

Sumate Tantratian ..... Chairman

(Sumate Tantratian, Ph.D)

Aran Incharoensakdi ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D)

Somkiat P. ..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D)

Boosya Bunnag ..... Member

(Assistant Professor Boosya Bunnag)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สรัญญา ฟันธัพฤกษ์ : สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลน่าเพื่อผลิตเบต้าแคโรทีน (OPTIMIZATION OF Spirulina spp. CULTURE FOR BETA-CAROTENE PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์, ผศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, 136 หน้า. ISBN 974-583-708-3

ทำการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดเบต้าแคโรทีนจากสาหร่ายไปรูไลน่า พบว่าเมทธานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดเบต้าแคโรทีน จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูไลน่าที่แยกมาจากบึงมักกะสันเพื่อผลิตเบต้าแคโรทีนในปริมาณสูง โดยนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซาร์รูคที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต ไดโปตัสเซียมซัลเฟต ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียม ซัลเฟต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ โซเดียมไนเตรต 1.25 กรัมต่อลิตร ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร โดยไม่จำเป็นต้องใส่ไดโปตัสเซียมซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาผลของเกลือต่อการเจริญและการผลิตเบต้าแคโรทีน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น การเจริญของสาหร่ายลดลงอย่างเด่นชัด ในขณะที่การผลิตเบต้าแคโรทีนสูงขึ้น สภาวะที่สาหร่ายผลิตเบต้าแคโรทีนในปริมาณสูง คือ การเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของเกลือจาก 20 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 30 กรัมต่อลิตร และการเติมเกลือให้มีความเข้มข้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงสาหร่ายให้เจริญเป็นเวลา 4 วัน นอกจากนี้เมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ 40 กรัมต่อลิตร ให้เคยชินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ 40 กรัมต่อลิตร ต่อไปอีก 1 สัปดาห์ จะทำให้สาหร่ายผลิตเบต้าแคโรทีนในปริมาณสูงขึ้นมาก การศึกษาความเข้มแสงและชนิดของแสงที่เหมาะสม พบว่าความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเบต้าแคโรทีนคือ 10,000 ลักซ์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มแสงเท่ากันทั้งในแสงสีแดง แสงสีน้ำเงินและแสงสีขาวพบว่าสาหร่ายผลิตเบต้าแคโรทีนในปริมาณสูงตามลำดับดังนี้ แสงสีแดง > แสงสีน้ำเงิน > แสงสีขาว จากการศึกษาตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายสไปรูไลน่าพบว่า นอร์ฟลูราซอนเป็นตัวยับยั้งอย่างแรง ไดฟีนิลามีนเป็นตัวยับยั้งอย่างปานกลาง และ 2,4-ไดไนโตรฟีนอลเป็นตัวยับยั้งอย่างอ่อน ผลของการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบริเวณกลางแจ้งสอดคล้องกับผลที่ได้ในระดับปฏิบัติการ โดยการเจริญและการผลิตเบต้าแคโรทีนขึ้นกับปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือ นำสาหร่ายที่ได้จากการขยายขนาดมาทำให้แห้ง พบว่าการทำให้แห้งโดยสูญญากาศที่อุณหภูมิต่ำเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการอบแห้ง ทำการแยกเบต้าแคโรทีนจากคาโรทีนอยด์พร้อมทั้งทำให้บริสุทธิ์โดยนำไปผ่านคอลัมน์ซิลิกา จี-60 พบว่าสามารถแยกเบต้าแคโรทีนให้บริสุทธิ์ได้ผลผลิต 97% ของทั้งหมด ในการเก็บรักษาสาหร่ายสไปรูไลน่า พบว่าที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสสาหร่ายมีการสูญเสียเบต้าแคโรทีนน้อยที่สุด และการเติม 10% โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ช่วยป้องกันการสูญเสียเบต้าแคโรทีนได้เล็กน้อย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C426482 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: : BETA-CAROTENE / Spirulina
SARANYA PHUNPRUCH : OPTIMIZATION OF Spirulina spp. CULTURE FOR BETA-CAROTENE PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph.D., ASST. PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, 136 pp. ISBN 974-583-708-3

The best solvent for beta-carotene extraction of Spirulina was methanol. The optimal conditions for Spirulina isolated from Makkasan pond to produce high yield of beta-carotene were prepared by adjusting the components of Zarrouk medium to contain 1.25 g/l $NaNO_3$, 0.25 g/l K_2HPO_4, 0.1 g/l $MgSO_4$ and without K_2SO_4. An increase of NaCl concentrations in the medium resulted in an increased beta-carotene content whereas growth was obviously decreased. Conditions which yielded the highest beta-carotene content of Spirulina were changing NaCl content from 20 to 30 g/l, adding 40 g/l of NaCl after 4-day growth as well as cultivation of Zarrouk medium containing 40 g/l of NaCl after acclimation to this concentration for 1 week. The optimal light intensity to produce high yield of beta-carotene was found to be 10,000 lux. At the same photosynthetic photon flux density, beta-carotene content of Spirulina was the highest when grown under red light followed by those grown under blue light and white light, respectively. Norflurazon was a strong inhibitor for beta-carotene production whereas diphenylamine was a medium inhibitor and 2,4-dinitrophenol was a weak inhibitor for beta-carotene production. The results of pilot scale outdoor cultivation were similar to those in laboratory scale cultivation. Growth and beta-carotene content were dependent on other environmental factors such as light intensity, temperature and NaCl concentration. Spirulina acquired from pilot scale cultivation was dried. It was found that freeze drying was the best method of drying. Partial purification of beta-carotene was accomplished by only 1 successive run on Silica G-60 column with 97% yield. The optimal storage temperature for Spirulina with respect to beta-carotene loss was -70 °C and 10% sodium metabisulphite slightly protected Spirulina against beta-carotene loss.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Dr.Aran Incharoensakdi, for his excellent guidance, understanding, support, faithful and constant encouragement throughout this thesis. I would like to express my gratefulness to my co-advisor,Dr.Somkiat Piyatiratitivorakul for his useful suggestions and full encouragement.

My sincere gratitude is also extended to Dr.Sumate Tantratian and Assistant Professor Boosya Bunnag for serving as thesis committee, for their valuable comments and also useful suggestions.

My acknowledgement is also expressed to Dr.Piamsak Menasveta, Dr. Sanha Panichjayakul, Assistant Professor Suchana Wisessang, Dr.Prasat Kittikoop for their valuable comments and special thanks are expressed to Dr.Preeda Boonlong for the access to use Quantum sensor.

Sincere thanks are also expressed to Mr.Sorawit Powtongsook, Miss Busaya Apichaisathaienchote, Miss Duangrat Inthorn, Miss Chuta Pramual and all the friends and members of the Biochemistry Department for their assistance and friendship.

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

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT..... IV

ENGLISH ABSTRACT..... V

ACKNOWLEDGEMENT..... VI

CONTENT..... VII

LIST OF TABLES..... XII

LIST OF FIGURES..... XIII

ABBREVIATION.....XVIII

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS..... 17

1. Type of Solvents for Beta-carotene Extraction 19

1.1 Extraction with Methanol..... 19

1.2 Extraction with 90% Acetone..... 20

1.3 Extraction with Acetone:Methanol (4:6).. 20

1.4 Extraction with Dichloromethane..... 20

2. Effect of Environmental Factors on Spirulina Cultivation for High Beta-carotene Production 21

2.1 Effect of Cultivation Temperature on Growth and Beta-carotene Content..... 21

2.2 Effect of Initial pH on Growth and Beta-carotene Content..... 22

2.3 Effect of $NaNO_3$ on Growth and Beta-carotene Content..... 22

2.4 Effect of K_2SO_4 on Growth and Beta-carotene Content..... 22

2.5 Effect of K_2HPO_4 on Growth and Beta-carotene Content..... 23

2.6 Effect of $MgSO_4$ on Growth and Beta-carotene Content..... 23

2.7 Comparison of Growth and Beta-carotene Content between Cells Grown in Optimized and Zarrouk Medium..... 23

2.8 Effect of NaCl on Growth and Beta-carotene Content..... 24

2.8.1 Changing of NaCl Content from 1 to 20 and 40 g/l..... 24

2.8.2 Changing of NaCl Content from 20 to 30 and 40 g/l..... 24

2.9 Effect of Adding NaCl on Growth and Beta-carotene Content after 4-day Cultivation 25

2.10 Effect of NaCl on Growth and Beta-carotene Content after Acclimation to NaCl at Various Concentrations..... 25

2.11 Effect of Light Intensity on Growth and Beta-carotene Content..... 25

2.12 Effect of Light Quality on Growth and Beta-carotene Content..... 26

3. Effect of Inhibitors on Growth and Beta-carotene Content..... 26

3.1 Effect of Norflurazon on Growth and Beta-carotene Content..... 26

3.2 Effect of Diphenylamine on Growth and Beta-carotene Content..... 27

3.3 Effect of 2,4-Dinitrophenol on Growth and Beta-carotene Content..... 27

4. The Pilot Scale Production of Spirulina..... 27

5. Effect of Method of Drying on Beta-carotene Loss..... 28

6. Partial Purification of Beta-carotene..... 32

7. Effect of Storage Temperature on Beta-carotene Loss..... 32

CHAPTER III RESULTS..... 33

1. Type of Solvents for Beta-carotene Extraction 34

2. Effect of Environmental Factors on Spirulina Cultivation for Beta-carotene Production.... 34

2.1 Effect of Cultivation Temperature on Growth and Beta-carotene Content..... 34

2.2 Effect of Initial pH on Growth and Beta-carotene Content..... 36

2.3 Effect of $NaNO_3$ on Growth and Beta-carotene Content..... 42

2.4 Effect of K_2SO_4 on Growth and Beta-carotene Content..... 42

2.5 Effect of K_2HPO_4 on Growth and Beta-carotene Content..... 47

2.6 Effect of $MgSO_4$ on Growth and Beta-carotene Content..... 47

2.7 Comparison of Growth and Beta-carotene Content between Cells Grown in Optimized and Zarrouk Medium..... 50

2.8 Effect of NaCl on Growth and Beta-carotene Content..... 50

2.9 Effect of Adding NaCl on Growth and Beta-carotene Content after 4-day Cultivation 55

2.10 Effect of NaCl on Growth and Beta-carotene after Acclimation to NaCl at Various Concentrations..... 60

2.11 Effect of Light Intensity on Growth and Beta-carotene Content..... 60

2.12 Effect of Light Quality on Growth and Beta-carotene Content..... 63

3. Effect of Inhibitors on Growth and Beta-carotene Content..... 69

3.1 Effect of Norflurazon on Growth and Beta-carotene Content..... 69

3.2 Effect of Diphenylamine on Growth and Beta-carotene Content..... 69

3.3 Effect of 2,4-Dinitrophenol on Growth and Beta-carotene Content..... 72

4. The Piolt Scale Production of Spirulina..... 72

5. Effect of Method of Drying on Beta-carotene Loss..... 77

6. Partial Purification of Beta-carotene..... 85

7. Effect of Storage Temperature on Beta-carotene Loss..... 90

CHAPTER IV DISCUSSION..... 94

CHAPTER V SUMMARY..... 117

REFERENCES..... 120

APPENDIX..... 131

BIOGRAPHY..... 136

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	End group designation of carotenes.....	3
Table 2	Efficiency of beta-carotene purification.....	90

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	The arrangement of isoprenoid unit.....	2
Figure 2	Structure of lycopene.....	2
Figure 3	Structure of beta-carotene.....	4
Figure 4	Cultivation of *Spirulina* in 4 l flask containing 2 l of medium.....	29
Figure 5	Cultivation of *Spirulina* in 15 l jar containing 10 l of medium.....	30
Figure 6	The outdoor cultivation of *Spirulina* on pilot scale with 500 l of medium.....	31
Figure 7	*Spirulina* from Makkasan pond (x200).....	33
Figure 8	Beta-carotene extraction efficiency by various solvents.....	35
Figure 9	Growth of *Spirulina* in Zarrouk medium under various cultivation temperatures for 5 days..	37
Figure 10	Effect of cultivation temperature on beta-carotene content of *Spirulina* at day 4.....	38
Figure 11	Growth of *Spirulina* in Zarrouk medium under various initial pH for 1 week.....	39
Figure 12	The change of pH during *Spirulina* cultivation for 1 week.....	40
Figure 13	Effect of initial pH on beta-carotene content of *Spirulina* at day 7.....	41

Figure 14 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various $NaNO_3$ concentrations for 1 week..... 43

Figure 15 Effect of $NaNO_3$ on beta-carotene content of Spirulina at day 7..... 44

Figure 16 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various K_2SO_4 concentrations for 1 week..... 45

Figure 17 Effect of K_2SO_4 on beta-carotene content of Spirulina at day 7..... 46

Figure 18 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various K_2HPO_4 concentrations for 1 week..... 48

Figure 19 Effect of K_2HPO_4 on beta-carotene content of Spirulina at day 7..... 49

Figure 20 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various $MgSO_4$ concentrations for 1 week..... 51

Figure 21 Effect of $MgSO_4$ on beta-carotene content of Spirulina at day 7..... 52

Figure 22 Comparison of growth between Spirulina grown in optimized and Zarrouk medium for 9 days... 53

Figure 23 Comparison of beta-carotene content between Spirulina grown in optimized and Zarrouk medium for 9 days..... 54

Figure 24 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various level of NaCl for 1 week 56

Figure 25 Effect of NaCl on beta-carotene content of Spirulina at day 7.....

A) Changing of NaCl content from 1 to 20 and 40 g/l.....

B) Changing of NaCl content from 20 to 30 and 40 g/l..... 57

Figure 26 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various NaCl contents after 4-day cultivation..... 58

Figure 27 Effect of adding various NaCl contents after 4-day cultivation on beta-carotene content of Spirulina at day 7..... 59

Figure 28 Growth of Spirulina in Zarrouk medium after acclimation to NaCl at various concentrations for 1 week..... 61

Figure 29 Effect of NaCl on beta-carotene content after acclimation to NaCl at various concentrations at day 7..... 62

Figure 30 Growth of Spirulina in Zarrouk medium under various light intensities for 15 days..... 64

Figure 31 Effect of light intensities on beta-carotene content of Spirulina at day 12..... 65

Figure 32 Optical characteristics of the red and blue lights..... 66

Figure 33 Growth of Spirulina in Zarrouk medium under white, red and blue light at photosynthetic photon flux density of 70 μmol photon m^{-2} s^{-1} for 7 days..... 67

Figure 34 Effect of light quality on beta-carotene content of Spirulina at Photosynthetic photon flux density of 70 μmol photon m^{-2} s^{-1} at day 7..... 68

Figure 35 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various concentrations of norflurazon for 4 days..... 70

Figure 36 Effect of norflurazon on beta-carotene content of Spirulina at day 4..... 71

Figure 37 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various concentrations of diphenylamine for 4 days..... 73

Figure 38 Effect of diphenylamine on beta-carotene content of Spirulina at day 4..... 74

Figure 39 Growth of Spirulina in Zarrouk medium containing various concentrations of 2,4-dinitrophenol for 4 days..... 75

Figure 40 Effect of 2,4-dinitrophenol on beta-carotene content of Spirulina at day 4..... 76

Figure 41 Growth of the outdoor cultivation of Spirulina in Zarrouk medium containing 1 and 30 g/l of NaCl for 2 weeks..... 78

Figure 42 Beta-carotene content of Spirulina in Zarrouk medium containing 1 and 30 g/l of NaCl for 2 weeks..... 79

Figure 43 pH profile of medium during 14 days of the outdoor cultivation..... 80

Figure 44 Light intensity between 8 a.m. and 6 p.m. during 14 days of the outdoor cultivation from April 24 to May 8, 1993..... 81

Figure 45 Comparison of air temperature and medium temperature between 8 a.m. and 6 p.m. during 14 days of the outdoor cultivation from April 24 to May 8, 1993..... 82

Figure 46 Effect of method of drying on beta-carotene loss..... 83

Figure 47 Moisture content of Spirulina after various methods of drying..... 84

Figure 48 HPLC chromatogram of carotenoids in hexane using Novapak C_{18} column..... 86

Figure 49 HPLC chromatogram of beta-carotene in hexane using Novapak C_{18} column..... 87

Figure 50 HPLC chromatogram of xanthophylls in hexane using Novapak C_{18} column..... 88

Figure 51 Absorption spectra of carotenoids,beta-carotene and xanthophylls in hexane..... 89

Figure 52 Effect of storage temperature on beta-carotene loss..... 92

Figure 53 Effect of antioxidant on beta-carotene loss.. 93

ABBREVIATION

^{o}C	degree celcius
l	litre
ml	millilitre
μl	microlitre
g	gramme
mg	milligramme
M	molar
μM	micromolar
mm	millimetre
cm	centimetre
μm	micrometre
nm	nanometre
min	minute
rpm	revolution per minute
W	watt
OD	optical density
lux	photometric (light density)