การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอสตาแซนตินจาก *Haematococcus pluvialis* ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยวดยิ่ง

นางสาว ไปรยา ทานะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2968-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION OF ASTAXANTHIN FROM *Haematococcus pluvialis*

Miss Praiya Thana

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 2006

ISBN 974-14-2968-1

Copyright of Chulalongkorn University

490009

V

Thesis Title	OPTIMIZATION OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION OF ASTAXANTHIN FROM *Haematococcus pluvialis*
By	Miss Praiya Thana
Field of Study	Chemical Engineering
Thesis Advisor	Assistant Professor Artiwan Shotipruk, 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

(Professor Direk Lavansiri, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Seeroong Prichanont, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Artiwan Shotipruk, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Prasert Pavasant, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Joongjai Panpranot, PhD.)

ไปรยา ทานะ : การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอสตาแซนตินจาก *Haematococcus pluvialis* ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยวดยิ่ง (OPTIMIZATION OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION OF ASTAXANTHIN FROM *Haematococcus pluvialis*) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. อาทิวรรณ โชติพฤกษ์, 75 หน้า. ISBN 974-14-2968-1

งานวิจัยนี้ใช้การออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของสภาวะปฏิบัติการต่อการสกัดแอสตาแซนตินจาก *Haematococcus pluvialis* ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยวดยิ่ง โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ปฏิบัติการในช่วง 40-80 องศาเซลเซียส ความดันที่ใช้ปฏิบัติการในช่วง 300-500 บาร์ และเวลาในการสกัดในช่วง 1-4 ชั่วโมง ซึ่งผลการศึกษาพบว่าผลหลักของความดันที่ใช้ปฏิบัติการ ผลหลักของเวลาที่ใช้ในการสกัด และอันตรกิริยาระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ปฏิบัติการกับความดันที่ใช้ปฏิบัติการ มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อผลการสกัดแอสตาแซนติน โดยสภาวะการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอสตาแซนตินที่ได้จากแบบจำลอง คือ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ความดัน 640 บาร์ เวลาในการสกัด 2.9 ชั่วโมง และปริมาณสารสกัดแอสตาแซนตินมีค่าเท่ากับ 22.66 มิลลิกรัมต่อกรัม แต่เนื่องจากสภาวะการสกัดที่ได้อยู่นอกบริเวณที่ทำการศึกษา ส่งผลให้ไม่สามารถประมาณค่าสภาวะการสกัดจากแบบจำลองได้ ดังนั้นสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง คือ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความดัน 500 บาร์ เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง และปริมาณสารสกัดแอสตาแซนตินมีค่าเท่ากับ 23.04 มิลลิกรัมต่อกรัม สำหรับผลของสภาวะปฏิบัติการต่อความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดในรูปของ IC_{50} ซึ่งหมายถึงความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของ ABTS ลง 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอันตรกิริยาระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ปฏิบัติการกับความดันที่ใช้ปฏิบัติการเท่านั้นที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด จากการวิเคราะห์พื้นผิวผลตอบพบว่าสภาวะที่สารสกัดมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด คือ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดัน 354 บาร์ เวลาในการสกัด 2.68 ชั่วโมง และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.18 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการสกัด ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอสตาแซนตินด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยวดยิ่ง คือ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความดัน 500 บาร์ และเวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549.....

4670386421: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
KEY WORD: ASTAXANTHIN / *Haematococcus pluvialis* / CARBON DIOXIDE / SUPERCRITICAL / EXTRACTION / ANTIOXIDANT ACTIVITY

PRAIYA THANA: OPTIMIZATION OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION OF ASTAXANTHIN FROM *Haematococcus pluvialis*. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. ARTIWAN SHOTIPRUK, Ph.D., 75 pp. ISBN 974-14-2968-1.

In this study, experimental design was employed in order to investigate the effects of operating conditions on supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. The factors investigated were the operating temperature in range of 40-80 °C, the operating pressure in range of 300-500 bar, and the extraction time in range of 1-4 hours. The results showed that the main effect of operating pressure, the main effect of extraction time, and the interaction effect between operating temperature and operating pressure were significant factors for the astaxanthin yields. From the response surface model of the experimental data, an optimal condition for astaxanthin content was found to be at the temperature of 90 °C, the pressure of 640 bar, the extraction time of 2.9 hours and amount of astaxanthin extract of 22.66 mg/g. This condition was the extrapolated result and therefore would not be accurately predicted. Thus the optimal condition was proposed within the range of this experiment to be at the temperature of 70 °C, the pressure of 500 bar, and the extraction time of 4 hours, which yielded the amount of astaxanthin extract of 23.04 mg/g dry algae. For the effect of experimental conditions on antioxidant activity, IC_{50}, the concentration that gives a 50% reduction in the absorbance of the free radical ABTS, was used as a measure of the activity. The analysis of the results showed that interaction between operating temperature and operating pressure was the only significant factor affecting the extract antioxidant activity. The response surface analysis gave the conditions that yielded the minimum antioxidant activity of the extract. This condition was at the temperature of 50 °C, the pressure of 354 bar, and the extraction time of 2.68 hours, in which the IC_{50} was 2.18 mg/l. Therefore, the optimal condition recommended for SC-CO_2 extraction was at the temperature of 70 °C, the pressure of 500 bar, and the extraction time of 4 hours.

Department..... Chemical Engineering.....Student's Signature.....
Field of Study.....Chemical Engineering.....Advisor's Signature.....
Academic Year....2006.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor Asst. Prof. Artiwan Shotipruk for her invaluable guidance, encouragement, and support throughout the study period.

Thanks to all my thesis committee, Asst. Prof. Seeroong Prichanont, Assoc. Prof. Prasert Pavasant, and Asst. Prof. Joongjai Panpranot for their kind advice.

Financial support from Graduated School, Chulalongkorn University for thesis supported scholarship and Thailand Japan Technology Transfer Program (TJTTP) for the instrument.

Sincere thanks are given to all members of the Biochemical Engineering Research Laboratory and all my friends in the Department of Chemical Engineering for their assistances and warm collaborations.

Finally, I would like to express the highest gratitude to my grandparent, parents, and brother, who always give the affectionate encouragements to me. Their support, inspiration and encouragement helped me accomplish my goal.

CONTENTS

Page

ABSTRACT IN THAI iv

ABSTRACT IN ENGLISH v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

CHAPTER I INTRODUCTION

1.1 Rationale 1

1.2 Objectives 4

1.3 Working Scopes 4

1.4 Expected benefits 4

CHAPTER II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEWS

2.1 Microalgae *Haematococcus pluvialis* 5

2.2 Life cycle of *Haematococcus pluvialis* 6

2.3 Astaxanthin 7

2.4 Biosynthesis pathway of astaxanthin 8

2.5 Conventional extraction 8

2.6 Supercritical fluid extraction 9

2.7 Properties of supercritical fluid 11

2.7.1 Density Oxidation in supercritical water 11

2.7.2 Diffusivity 11

2.7.3 Viscosity 12

2.7.4 Polarity 12

2.7.5 Dielectric constant 13

2.8 Solubility in supercritical fluid 14

2.9 Experimental design and statistical data analysis 15

Literature review 18

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS

3.1 Materials.....27

3.2 Supercritical fluid extraction and astaxanthin analysis.....27

3.3 Soxhlet extraction.....28

3.4 Analysis of extract antioxidant activity.....29

3.5 Experimental design and statistical analysis.....30

CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Supercritical carbon dioxide extraction (SC-CO_2)
and design of experiment (DOE).....32

4.1.1 Statistical analysis of astaxanthin yields.....34

4.1.1.1 Main effect of operating pressure
to astaxanthin yields.....35

4.1.1.2 Main effect of extraction time
to astaxanthin yields.....35

4.1.1.3 Main effect of operating temperature
and pressure to astaxanthin yields.....36

4.1.2 Statistical analysis of extract antioxidant activities.....37

4.1.2.1 Interaction effects of operating condition
to extract antioxidant activity.....38

4.2 Optimal condition for SC-CO_2 extraction of *H. pluvialis* 39

4.2.1 Optimal condition of astaxanthin yields.....39

4.2.2 Optimal condition of extract antioxidant activity.....42

CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

5.1 Conclusions.....45

5.2 Recommendations.....46

REFERENCES.....47

APPENDICES.....51

APPENDIX A Data analysis.....52

APPENDIX B Statistical analysis.....56

APPENDIX C List of publication.....63

VITA.....75

LIST OF TABLES

Page

Table 2.1: Features of various solvents at the critical point.....10
Table 2.2: Comparison of the properties of supercritical CO_2 and those of ordinary gases and liquids.....10
Table 2.3: Permanent dipole moment of some supercritical fluids.....13
Table 2.4: Experimental matrix for the faced-centered design with 3 factors.....16
Table 2.5: Review of previous investigation on supercritical fluid extraction of carotenoids related compounds from natural materials.....19
Table 2.6: Review of previous investigation on supercritical fluid extraction of plant materials.....23
Table 3.1: Factors and levels tested for the designed experiment.....31
Table 4.1: Factors and levels tested for the designed experiment.....33
Table 4.2: Experimental matrix and all experimental results for the designed experiment (n=3).....33
Table 4.3: ANOVA Table for astaxanthin yields.....34
Table 4.4: ANOVA Table for extract antioxidant activity.....38
Table 4.5: Model summary for astaxanthin yields.....39
Table 4.6: ANOVA Table for optimal condition of astaxanthin yields.....39
Table 4.7: Coefficients for response surface equation for astaxanthin yields.....40
Table 4.8: Model summary for extract antioxidant activity 42
Table 4.9: ANOVA Table for optimal condition of extract antioxidant activity 42
Table 4.10: Coefficients for response surface equation for extract antioxidant activity 42

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1.1: The chemical structures of carotenoids in *H. pluvialis*.....1
Figure 2.1: *H. pluvialis* (a) vegetative cells and (b) cyst cells.....6
Figure 2.2: Life cycle of *Haematococcus* pluvialis.....6
Figure 2.3: Astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione).....7
Figure 2.4: Biosynthesis pathway of astaxanthin.....8
Figure 2.5: Phase diagram of supercritical carbon dioxide.....9
Figure 2.6: Diffusivities of solute in SC-CO_2 as a function of temperature and pressure.....12
Figure 2.7: Influence of pressure on the dielectric constant and density of SC-CO_2 at a constant temperature.....14
Figure 2.8: Variation of the solubility of naphthalene in supercritical fluid as a function of pressure and temperature.....15
Figure 2.9: Face-centered central composite design.....16
Figure 3.1: SFX 220 extraction system of supercritical carbon dioxide extraction...27
Figure 3.2: Soxhlet apparatus.....28
Figure 3.3: Spectrophotometer, Genesys 20 (Thermo spectronic, USA).....28
Figure 3.4: Formation of ABTS radical cation, $ABTS^{\bullet+}$.....29
Figure 3.5: Absorption spectra of ABTS radical cation, $ABTS^{\bullet+}$.....29
Figure 4.1: Main effect of operating pressure to astaxanthin yields.....35
Figure 4.2: Main effect of extraction time to astaxanthin yields.....36
Figure 4.3: Interaction effects between temperature and pressure to astaxanthin yields.....36
Figure 4.4: Density of pure carbon dioxide calculated by P-R EOS (Mamata, 2000).....37
Figure 4.5: Interaction effects between temperature and pressure to antioxidant activity of extract.....39
Figure 4.6: Response surface of astaxanthin yields.....40
Figure 4.7: Observed value vs. predicted value of astaxanthin yields model.....41
Figure 4.8: Response surface of extract antioxidant activity.....43
Figure 4.9: Observed value vs. predicted value of extract antioxidant activity model.....43