

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยระบบร่วม  
ของถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเชิงแสงในร่มและบ่อทางน้ำกลางแจ้ง

นาย ภาณุ พานิชการ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

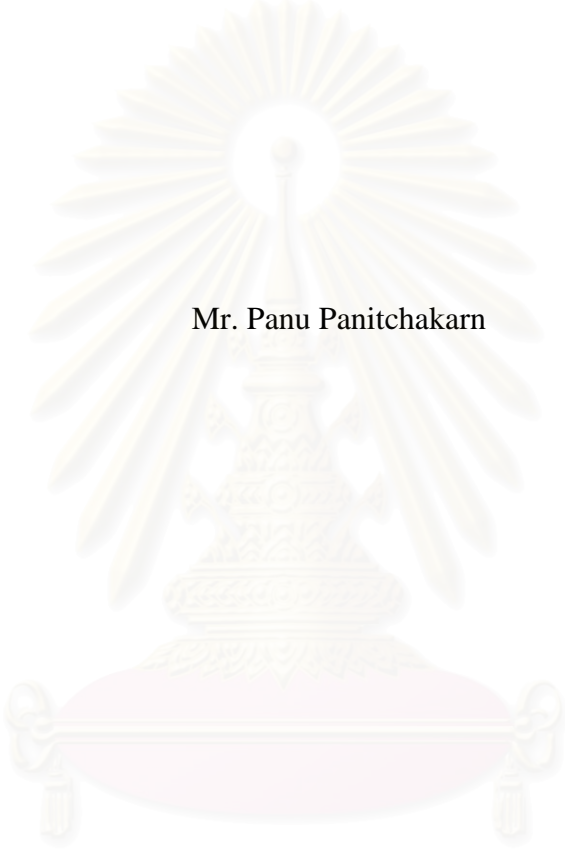
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMBINED SYSTEM OF INDOOR AIRLIFT PHOTOBIOREACTOR AND OUTDOOR  
RACEWAY POND FOR THE CULTIVATION OF *Haematococcus pluvialis*

Mr. Panu Panitchakarn



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Copyright of Chulalongkorn University



ภาณุ พานิชการ : การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยระบบร่วมของถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเชิงแสงในร่มและบ่อทางน้ำกลางแจ้ง. (COMBINED SYSTEM OF INDOOR AIRLIFT PHOTOBIOREACTOR AND OUTDOOR RACEWAY POND FOR THE CULTIVATION OF *Haematococcus pluvialis*) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.ประเสริฐ ภาวนันต์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: สรวิศ เผ่าทองสุข, 101 หน้า.

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* NEIS-144 ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกเซลล์สีเขียวจะถูกผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสง และขั้นตอนที่สองเซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของแอสตาแซนติน โดยทำการเพาะเลี้ยงในบ่อทางน้ำที่สภาวะกลางแจ้ง ซึ่งในขั้นตอนแรกเซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 3 และ 17 ลิตร มีค่าอัตราส่วนของพื้นที่ของไหลไหลลงต่อพื้นที่ของไหลไหลลง ( $A_L/A_T$ ) คือ 2.78 และ 3.2 และได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงที่สุดในงานวิจัยนี้คือ  $41 \times 10^4$  และ  $21 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับโดยใช้อาหารสูตร F1 ควบคุมพีเอชเท่ากับ 7 ให้แสงที่ความเข้มแสง 20 และ 30 ไมโคร โมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พ่นอากาศผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอัตราเร็ว 0.4 และ 1 เซนติเมตรต่อวินาที ตามลำดับ และสามารถทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* แบบกึ่งต่อเนื่องโดยเก็บเกี่ยวผลผลิตทุก ๆ 4 วัน และมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและค่าการผลิตคือ 0.179 ต่อวัน และ 5.25 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 3 ลิตร และ 0.268 ต่อวัน และ 4.75 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 17 ลิตร ซึ่งนำผลผลิตออกไปสู่ระบบบ่อทางน้ำในขั้นตอนที่สองเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของสารแอสตาแซนตินด้วยความเข้มแสงที่สูงคือ 35-65 ไมโคร โมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และความเข้มข้นของเกลือที่สูง 1-3% โดยน้ำหนัก การเหนี่ยวนำในการทดลองส่วนที่สองนี้ใช้เวลาประมาณ 8-9 วัน ซึ่งความเข้มแสงที่สูงขึ้นจะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการสะสมแอสตาแซนตินเร็วมากขึ้น แต่ผลของความเข้มข้นของเกลือในช่วงที่ศึกษานี้ไม่มีผลต่อการเข้าสู่ระยะซีซของเซลล์สาหร่าย

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี.....  
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี.....  
ปีการศึกษา 2549.....

ลายมือชื่อ..... ภาณุ พานิชการ.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... สรวิศ เผ่าทองสุข.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... สรวิศ เผ่าทองสุข.....



## 4870415121 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: *Haematococcus pluvialis* / AIRLIFT BIOREACTOR / ASTAXANTHIN  
PANU PANITCHAKARN: COMBINED SYSTEM OF INDOOR AIRLIFT  
PHOTOBIOREACTOR AND OUTDOOR RACEWAY POND FOR THE  
CULTIVATION OF *Haematococcus Pluvialis*. THESIS ADVISOR: ASSOC.  
PROF. PRASERT PAVASANT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: SORAWIT  
POWTONGSOOK, Ph.D., 101 pp.

The cultivation of *Haematococcus pluvialis* NEIS-144 under controlled conditions was carried out in a two-stage culture system. In the first stage, the cells were maintained in the growth stage in the airlift photobioreactor systems, whereas the second stage was the cultivation under stress conditions in the raceway pond to induce the accumulation of astaxanthin and the cells grew in cyst form. In the first stage, a comparison between the growth of the green vegetative cells was investigated in the airlift systems of two sizes, i.e. 3L with  $A_d/A_r$  of 2.78 and 17 L with  $A_d/A_r$  of 3.2. The two airlift photobioreactors gave the maximum cell density of  $41 \times 10^4$  and  $21 \times 10^4$  cell  $mL^{-1}$ , respectively. The optimal conditions for the cultivation of *H. pluvialis* in the 3 and 17 L airlift photobioreactor were: using F1 medium with pH of 7, illuminated with normal fluorescence lamps at 20 and 30  $\mu mol$  photon  $m^{-2} s^{-1}$  and aeration at 0.4 and 1  $cm s^{-1}$ , respectively. A semi-continuous culture of vegetative cells could be achieved where the harvest could be performed at every 4 days. The specific growth rate and productivity in these semi-continuous cultures were 0.179  $d^{-1}$  and 5.25 cell  $mL^{-1}d^{-1}$  and 0.268  $d^{-1}$  and 4.75 cell  $mL^{-1}d^{-1}$  in the 3 L and 17 L airlift photobioreactors, respectively. In the second stage, the harvested vegetative cultures were transferred to the high light-intensity at 35-60  $\mu mol$  photon  $m^{-2} s^{-1}$  and high salinity at 1-3%wt batch outdoor pond for the induction of astaxanthin. At this stage, *H. pluvialis* changed from green vegetative cells to non-motile and finally to cysts within 8-9 days. The astaxanthin formation in *H. pluvialis* seemed to be more rapid at high light intensity whilst the effect of salinity level on astaxanthin induction under the range of salinity employed in this work seemed to be insignificant.



Department Chemical Engineering  
Field of study Chemical Engineering  
Academic year 2006

Student's signature panu panitchakarn  
Advisor's signature Prasert Pavasant  
Co-adviser's signature Sorawit Powtongsook

## ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis will never have been completed without the help and support of many people and organizers who are gratefully acknowledged here. Firstly, I would like to express my sincere gratitude to Associate Professor Prasert Pavasant, my advisor, Sorawit powtfongsook, my co-advisor, or their suggestions, guidance, warm encouragement and generous supervision throughout my master program.

I would like to thank all friends and members in Marine Biotechnology Research Unit (at Chulalongkorn University) National Center of Genetic Engineering and Biotechnology and the Biotechnical Engineering Laboratories for their assistance and friendship.

I would like to thank The Marine Biotechnology Research Unit (at Chulalongkorn University) National Center of Genetic Engineering and Biotechnology for allowing me to setup the experimental apparatus and using the accessories.

Most off all, would like to express love and thanks to my family, for their precious love, inspiration and support that have propelled me to the completion of this work and all of the work to come in my life.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
<b>CHAPTER 1 INTRODUCTION</b>	
1.1 Motivation.....	1
1.2 Objectives.....	2
1.3 Scopes of this work.....	3
<b>CHAPTER 2 BACKGROUNDS AND LITERATURE REVIEWS</b>	
2.1 <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	4
2.1.1 Biological information.....	4
2.1.2 Life cycle of <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	6
2.2 Astaxanthin.....	7
2.2.1 Chemical Properties of Astaxanthin.....	8
2.2.2 Sources of Astaxanthin.....	9
2.3 Production of astaxanthin by <i>H. pluvialis</i> .....	12
2.3.1 Environmental growth factors for <i>H. pluvialis</i> .....	13
2.3.2 Effect of environment factors on astaxanthin accumulation in <i>H. pluvialis</i> .....	15
2.4 Culture Systems.....	17
2.4.1 Open systems.....	17
2.4.2 Close systems.....	18
2.5 Airlift photobioreactor systems.....	18
2.6 Airlift photobioreactor for the cultivation of <i>H. pluvialis</i> .....	20
2.7 Induction of astaxanthin .....	21

## CHAPTER 3 MATERIALS AND METHODS

3.1 Experimental setup.....	46
3.1.1 Growth experiment (in airlift photobioreactor).....	46
3.1.2 Astaxanthin production experiment (in design reactor).....	47
3.2 Preparation of Medium and inoculum.....	47
3.2.1 Preparation of the bioreactor.....	47
3.2.2 Experimental procedure for growth experiment.....	48
3.3 Astaxanthin production experiment.....	48
3.4 Determination of growth.....	49
3.4.1 Determination of cell density.....	49
3.4.2 Determination of dry weight .....	50
3.4.3 Determination of specific growth rate.....	50
3.4.4 Determination of Productivity .....	51
3.5 Error of measurement .....	51

## CHAPTER 4 RESULTS AND DISCUSSIONS

4.1 Cultivation of <i>H. pluvialis</i> in airlift photobioreactors.....	58
4.1.1 Effect of medium concentration on the cultivation in 3L airlift system.....	58
4.1.2 Effect of light intensity in small and large scale systems.....	59
4.1.3 Effect of pH in large scale system.....	60
4.1.4 Effect of aeration in large scale system.....	61
4.1.5 Comparison between overall performance of 17L and 3L airlift.....	62
4.1.6 Semi-continuous culture of <i>H.pluvialis</i> in airlift bioreactor....	63
4.2 Preliminary examination of astaxanthin production.....	64
4.2.1 Effect of light intensity on astaxanthin production.....	65
4.2.2 Effect of salt in astaxanthin production.....	65



**CHAPTER 5 CONCLUSIONS AND RECOMMENDATION**

5.1 Conclusions.....	79
5.2 Contributions.....	80
5.3 Recommendation.....	81
REFERENCES.....	82
APPENDIX.....	91
BIOGRAPHY.....	101



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

	Page
2.1 Biological sources of astaxanthin.....	22
2.2 Environmental growth factors on growth of <i>H. pluvialis</i> .....	23
2.3 Effect of environment factors on induction of astaxanthin.....	32
2.4 Advantages and disadvantages of open and closed algal cultivation systems...	42
2.5 Comparison of properties of different large scale algal culture system.....	43
3.1 Geometric details of airlift bioreactor.....	52
3.2 Geometric details of raceway pond.....	52
3.3 Formulation of F1 media.....	53
5.1 Comparison between the cultivation of <i>Haematococcus pluvialis</i> in airlift photobioreactors.....	81


  
 สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

	Page
2.1 Vegetative cells of <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	5
2.2 Accumulation of astaxanthin in cyst of <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	6
2.3 Life cycle of <i>Haematococcus pluvialis</i> .....	6
2.4 Structure of carotenoid.....	10
2.5 Pathway for astaxanthin biosynthesis in <i>H. pluvialis</i> .....	11
2.6 Type of bioreactor: (a) stirrer tank reactor, (b) bubble column, (c) airlift contactor.....	44
2.7 Two configurations of ALCs: (a) split cylinder internal loop ALC (b) and (c) concentric internal loop ALCs (d) external loop ALC.....	45
3.1 Experimental setup and schematic diagram of airlift photobioreactor.....	54
3.2 Experimental setup and schematic diagram of design reactor (in outdoor).....	55
3.3 (a) Side view of the cell counting chamber showing the cover glass and the space beneath it that holds a microalgae suspension.....	56
(b) Top view of the chamber. The chamber has two grids located in the center of the side.....	56
(c) An enlarged view of the grid. The microalgae in the squares 1, 2, 3 and 4 are used for cell count.....	56
3.4 Counting cell density.....	57
4.1 Effect of medium concentration on cell density of <i>H. pluvialis</i> in 3 L airlift photobioreactor.....	67
4.2 Effect of light intensity on cell density of <i>H. pluvialis</i> in 3 L airlift photo- bioreactor.....	68
4.3 Effect of light intensity on cell density of <i>H. pluvialis</i> in 17 L airlift photo- bioreactor.....	69
4.4 Effect of pH on cell density of <i>H. pluvialis</i> in 3 L airlift photobioreactor.....	70
4.5 Effect of pH on cell density of <i>H. pluvialis</i> in 17 L airlift photobioreactor.....	71
4.6 Effect of aeration on cell density of <i>H. pluvialis</i> in 3 L airlift photobioreactor....	72
4.7 Effect of aeration on cell density of <i>H. pluvialis</i> in 17 L airlift photobioreactor...73	73
4.8 Cultivation of <i>H. pluvialis</i> in 3 and 17 L of airlift photobioreactor: growth stage.....	74

4.9 Cultivation of <i>H.pluvialis</i> in 3 and 17 L of airlift photobioreactor at suitable condition.....	75
4.10 Cultivation of <i>H.pluvialis</i> in 3 L airlift photobioreactor under semi-continuous culture .....	75
4.11 Cultivation of <i>H.pluvialis</i> in 17 L airlift photobioreactor under semi-continuous culture .....	76
4.12 Cultivation of <i>H.pluvialis</i> in raceway pond: induce astaxanthin stage.....	76
4.13 Effect of light intensity on cell density during astaxanthin accumulation stage.....	77
4.14 Effect of salinity on cell density during astaxanthin accumulation stage.....	78



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# CHAPTER 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Motivation

Microalgae have a large biotechnological potential for productions of a variety of compounds such as carotenoids, pigments, pharmaceuticals, and other chemicals, as well as hydrogen, hydrocarbons, and biofuels [Borowitzka, 1997]. Among these algal products, astaxanthin attracts a great commercial interest due primarily to its versatile applications and high price (approximately 2,500-3,000 US\$/kg) [Lorenz and Cysewski, 2000]. *H. pluvialis* has been widely studied as one of the best sources of astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta$ '-carotene-4,4'-dione) pigment with potential effects of cancer prevention, enhancer of immune response, and a free radical quencher. *H. pluvialis* is reported to be capable of accumulating the most superior amount of astaxanthin [Harker et al., 1996a]. It is generally known that astaxanthin production by microalgal *H. pluvialis* has distinctive advantages over other methods (such as extraction from a shell of crustaceans etc.) in that (1) astaxanthin accumulated in *H. pluvialis* is mainly esterified forms with higher antioxidant activity than free form [Margalith, 1999; Lorenz and Cysewski, 2000]; (2) the amount of astaxanthin accumulation per unit cell mass is much higher than that in other strain [Lorenz and Cysewski, 2000 ; Boussiba and Vonshak, 1991]; (3) microalgae has much larger industrial potential than other microorganisms. *H. pluvialis* accumulates astaxanthin in the transition between green vegetative cell and cyst which is a resting stage of cells as a result of stress condition such as high salt concentration, high light intensity and depletion of nitrogen or phosphorus [Cordero et al., 1996; Fabregas et al., 1998; Orosa et al., 2005]. Since different culture conditions are required for the production of green vegetative cells of *H. pluvialis* and the accumulation of astaxanthin in the red aplanospores, a two-stage production process has been proposed [Kobayashi et al., 1991; Harker et al., 1996b].

Open systems are the oldest and simplest from the culturing pond. They have a number of advantages including minimal costs of construction and operation. However, this mode of cultivation possesses a number of drawbacks including low cell densities, potential contamination by other microorganisms and the inability to control the culture environment such as light irradiation and temperature. Since *H. pluvialis* is susceptible to easy contamination, slow growth and preference for low growth temperature [Harker et al., 1996b], outdoor cultivation practice has not been made possible.

Due to a large change in cell morphology and biochemical composition of *H. pluvialis* during outdoor culture, a new, faster methodology has been developed for their cultivation. Flat panel, bubble column, airlift and tubular photobioreactor have been extensively proposed as outdoor closed photobioreactors for the industrial production of microalgae [Tredici and Materassi, 1992; Richmond et al., 1993; Molina et al., 1997; Acien et al., 1998; Garcia et al., 1999]. Airlift bioreactors are being applied to a variety of biotechnological processes including the culture of *H. pluvialis*. The main advantages of airlift bioreactors are: simple construction, well defined fluid flow pattern and relatively high gas-liquid mass transfer rate. In addition, the mixing in airlift bioreactor could be obtained without causing too much shear force in liquid phase, which could inhibit the growth of algae. Recently, Kaewpintong [2004] studied the effects of the configurations and operating variables on the cultivation of vegetative cells *H. pluvialis* in a small scale airlift photobioreactor, and demonstrated that high productivity of semi-continuous culture. However, due to time constrain, this work was only limited to a small laboratory scale airlift of 3L. There is therefore a clear need for the investigation on the up-scale of such culture.

This work aims to continue the work of Kaewpintong [2004] and focuses on the cultivation of *H. pluvialis* for the production of astaxanthin in a larger airlift photobioreactors. Due to the difference in the culture requirements of the alga during the various stages of algal life cycle, it is essential to cultivate the microorganism under controlled conditions in a two-stage culture system. In the first stage, green vegetative cells are produced in airlift photobioreactor. In the second stage, the

harvest culture from the reactor is transferred to high light (outdoor) raceway pond under semi-batch condition for the accumulation of astaxanthin.

## 1.2 Objectives

- 1.2.1 To compare the performance of the 3L with 17L airlift photobioreactors in the cultivation of *H. Pluvialis*
- 1.2.2 To primary test for astaxanthin production from *H. pluvialis* in an outdoor raceway pond.

## 1.3 Scopes of this work

- 1.3.1 The 3L and 17L Air-lift photobioreactors have dimensions as stated in Table 3.2.
- 1.3.2 The ratio between the downcomer and riser cross section area ( $A_d/A_r$ ) are fixed at 2.78. (as proposed by Kaewpintong [2004])
- 1.3.3 The superficial gas velocity is approximately controlled at  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$  during the growth stage. (as proposed by Kaewpintong [2004])
- 1.3.4 The light intensity is approximately controlled at  $20 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$  during the growth stage. (as proposed by Kaewpintong [2004])
- 1.3.5 The raceway pond for the astaxanthin accumulation stage has dimensions as stated in Figure 3.2.

## CHAPTER 2

### BACKGROUNDS AND LITERATURE REVIEWS

#### 2.1 *Haematococcus pluvialis*

Before *Haematococcus* became commercially available, natural sources of astaxanthin included krill oil and meal, crawfish oil and *Phaffia* yeast. However, these sources have low astaxanthin concentrations ranging from 0.15% in the oils to 0.40% in *Phaffia* yeast. As a result, the quantities required in the feeds for efficient pigmentation requires a large amount of materials which leads to a bulky of quantity ash in the final feeds. By contrast, *Haematococcus* contains between 1.5–3.0% astaxanthin and has gained acceptance in aquaculture and other markets as a concentrated form of natural astaxanthin.

##### 2.1.1 Biological information

*Haematococcus pluvialis* is a fresh water unicellular alga. *H. pluvialis* reproduces asexually by division from a single cell into two and/or four motile cell [Droop, 1995]. Smith [1950] defined the taxonomy of *H. pluvialis* as follows:

Division	Chlorophyta
Class	Chlorophyceae
Order	Volvocales
Family	Chlamydomonadaceae
Genus	<i>Haematococcus</i>
Species	<i>Haematococcus pluvialis</i>

The cell morphology of *H. pluvialis* falls into one of the two forms: vegetative cell (Figure 2.1) and cyst (Figure 2.2). Under suitable growth condition, most cells remain in vegetative cell form that produces chlorophylls a and b and primary carotenoid,



especially  $\beta$ -carotene and lutein [rickette, 1970]. These cells are green, spherical or ellipsoid in shape, with a diameter of approximately 10-20  $\mu\text{m}$ .

The cells are enclosed by cell wall and are motile with two flagellates. Under stress conditions, such as depletion of nutrients, e.g. phosphate or nutrient, and/or light induction, the cells convert to cyst, which is still spherical in shape. Cysts lose flagella and their motility and form new thick cell wall. The volume of alga increases dramatically from 10-20  $\mu\text{m}$  to 40-50  $\mu\text{m}$  in diameter. Moreover, these cells produce secondary carotenoid such as echinenone, canthaxanthin and astaxanthin following a decrease in chlorophyll and primary carotenoids [Droop, 1955; Lee and Soh, 1991]. Growth rate of *H. pluvialis* in this stage decrease, cells begin the massive accumulation of astaxanthin. Astaxanthin deposition is firstly noticed around nucleus and proceeds radically until the entire protoplast is red [Lee and Soh, 1991]. Fully encysted cells contain up to 1.5-3% astaxanthin [Lorenz and Cysewski, 2000; Olaizola, 2000].

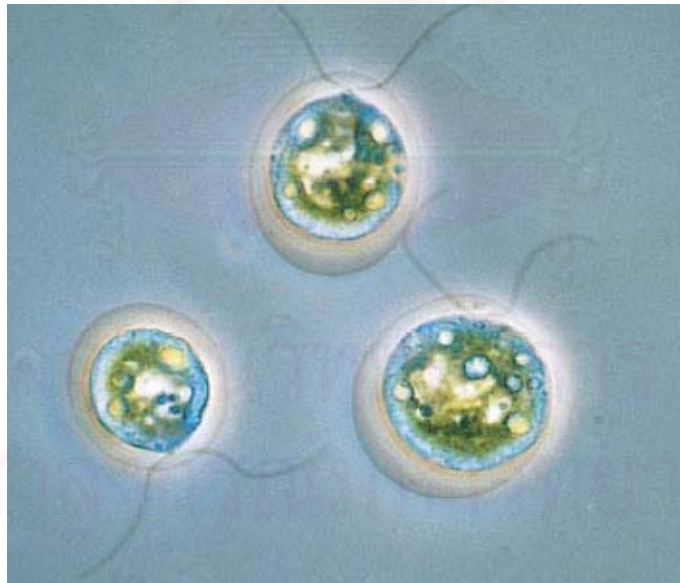


Figure 2.1 Vegetative cells of *Haematococcus pluvialis*  
[Lorenz and Cysewski, 2000]

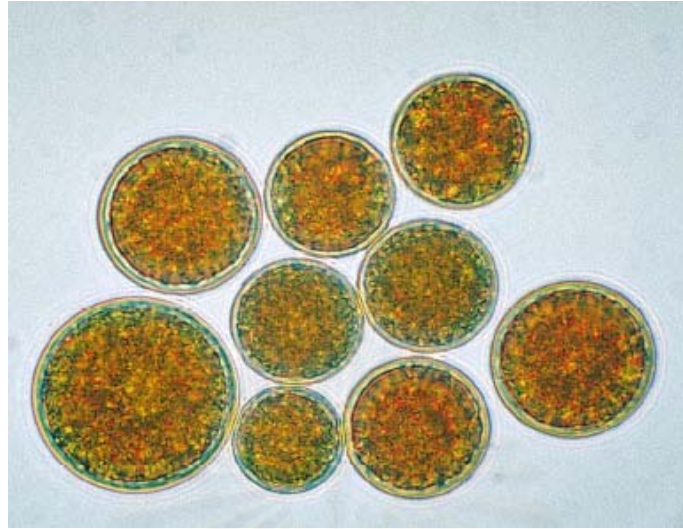


Figure 2.2 Accumulation of astaxanthin in cyst of *Haematococcus pluvialis*  
[Lorenz and Cysewski, 2000]

### 2.1.2 Life cycle of *Haematococcus pluvialis*

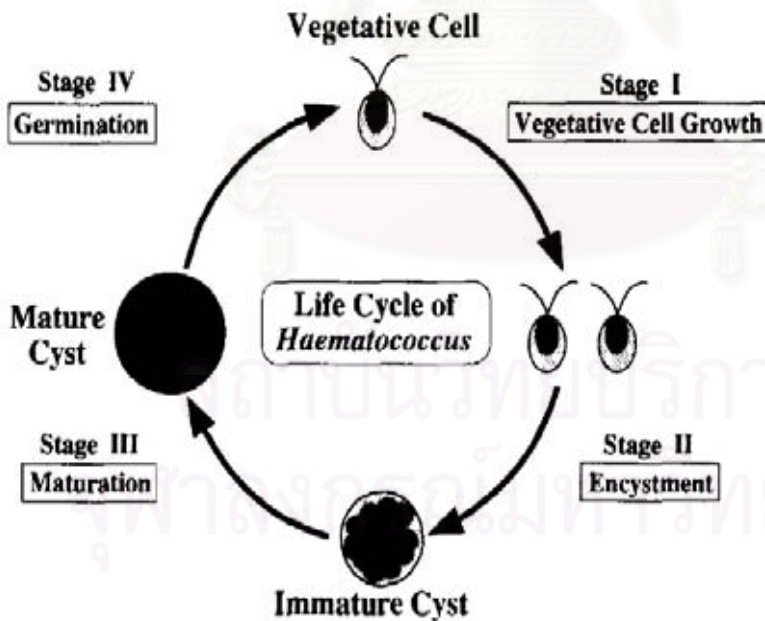


Figure 2.3 Life cycle of *Haematococcus pluvialis* [Kobayashi et al., 1997]

Life cycle of *H. pluvialis* is divided into four stages (Figure 2.3) as described below [Kobayashi et al., 1997]:

(i) Vegetative cell growth

At this stage, cells remain in a vegetative form. Ellipsoidal vegetative cells are capable of swimming with two flagella and are capable of increasing in number. These cells contain high level of chlorophyll and protein but very low carotenoid contents.

(ii) Encystment

At this stage, vegetative cells transform into immature cyst, which have brown spherical shape. During the encystment stage, chlorophyll and protein decrease whereas, the level of carotenoid biosynthesis and protein production increase.

(iii) Maturation

At this stage, immature cyst transform into mature, immotile cyst. The maturation of cyst cells is accompanied by enhanced carotenoid biosynthesis and accelerate protein degradation.

(iv) Germination

At this stage, chlorophyll and protein synthesis, and carotenoid degradation occur.

## 2.2 Astaxanthin

Carotenoids are a group of over 700 natural lipid soluble pigments that are primarily produced within phytoplankton, algae and plants. These pigments are responsible for the broad variety of colours seen in nature; the most conspicuous are the

brilliant yellow, orange and red colours of fruits, leaves and aquatic animals. Among all of the numerous classes of natural colours, the carotenoids are the most widespread and structurally diverse pigmenting agents.

Astaxanthin is the main carotenoid pigment found in aquatic animals and is present in many of our favorite seafoods including salmon, trout, red seabream, shrimp, lobster and fish eggs. It is also present in birds such as flamingoes and quails. In many of the aquatic animals in which it is found, astaxanthin has several essential biological functions including protection against oxidation of essential poly-unsaturated fatty acids, protection against UV light effects, immune response, pigmentation, communication, reproductive behavior and improved reproduction [Lorenz and Cysewski, 2000]. Some microorganisms are rich in astaxanthin, the Chlorophyte alga *Haematococcus pluvialis* is reported to accumulate the highest levels of astaxanthin in nature. Commercially grown *H. pluvialis* can accumulate 1.5-3% of astaxanthin [Lorenz and Cysewski, 2000; Olaizola, 2000].

### 2.2.1 Chemical Properties of Astaxanthin

Astaxanthin is closely related to other well-known carotenoids, such as  $\beta$ -carotene, zeaxanthin and lutein, thus they share many of metabolic and physiological functions attributed to carotenoids. The presence of the hydroxyl and keto endings (Figure 2.4) on each ionone ring, explains some unique features, such as the ability to be esterified, a higher anti-oxidant activity and a more polar configuration than other carotenoids. Free astaxanthin is particularly sensitive to oxidation. In nature, it is found either conjugated to proteins, such as in salmon muscle or lobster exoskeleton, or esterified with one or two fatty acids, which stabilize the molecule. In *H. pluvialis*, the esterified form predominates, mostly as astaxanthin monoester [Lorenz and Cysewski, 2000]. Various astaxanthin stereoisomers are found in nature that differ in the configuration of the two hydroxyl groups on the molecule (Figure 2.4). The 3S, 3'S stereoisomer is the main form found in *H. pluvialis* and in wild salmon [Turujman, 1997].



The astaxanthin molecule has two asymmetric carbons located at the 3 and 3' position of benzenoid rings on either end of molecule. There have three configurations of astaxanthin; free astaxanthin, astaxanthin monoesters and astaxanthin diesters (Figure 2.5).

### 2.2.2 Sources of Astaxanthin

There are two major sources of astaxanthin; chemical (synthetic) and biological (Natural) sources.

#### 1) Synthetic source

Synthetic astaxanthin is presently the principle source used for coloration in aquaculture industry with more than 95% of the market supply. However, synthetic astaxanthin is expensive, unnatural configurational and involves potentially harmful process [Lorenz and Cysewski, 2000].

#### 2) Natural source

##### a) Algae

Astaxanthin can be produced from other strains of algae such as *Ankistrodesmus branuii*, *Chlorella zofingiensis* and *Dunaliella salina*, *Euglena rubida* [Borowitzka and Borowitzka, 1989]. However, the quantity of astaxanthin generated from these microorganisms is relatively low and not suitable for mass production. The green alga, *H. pluvialis*, has received much attention due to its capacity to accumulate high amount of astaxanthin [Lorenz and Cysewski, 2000].

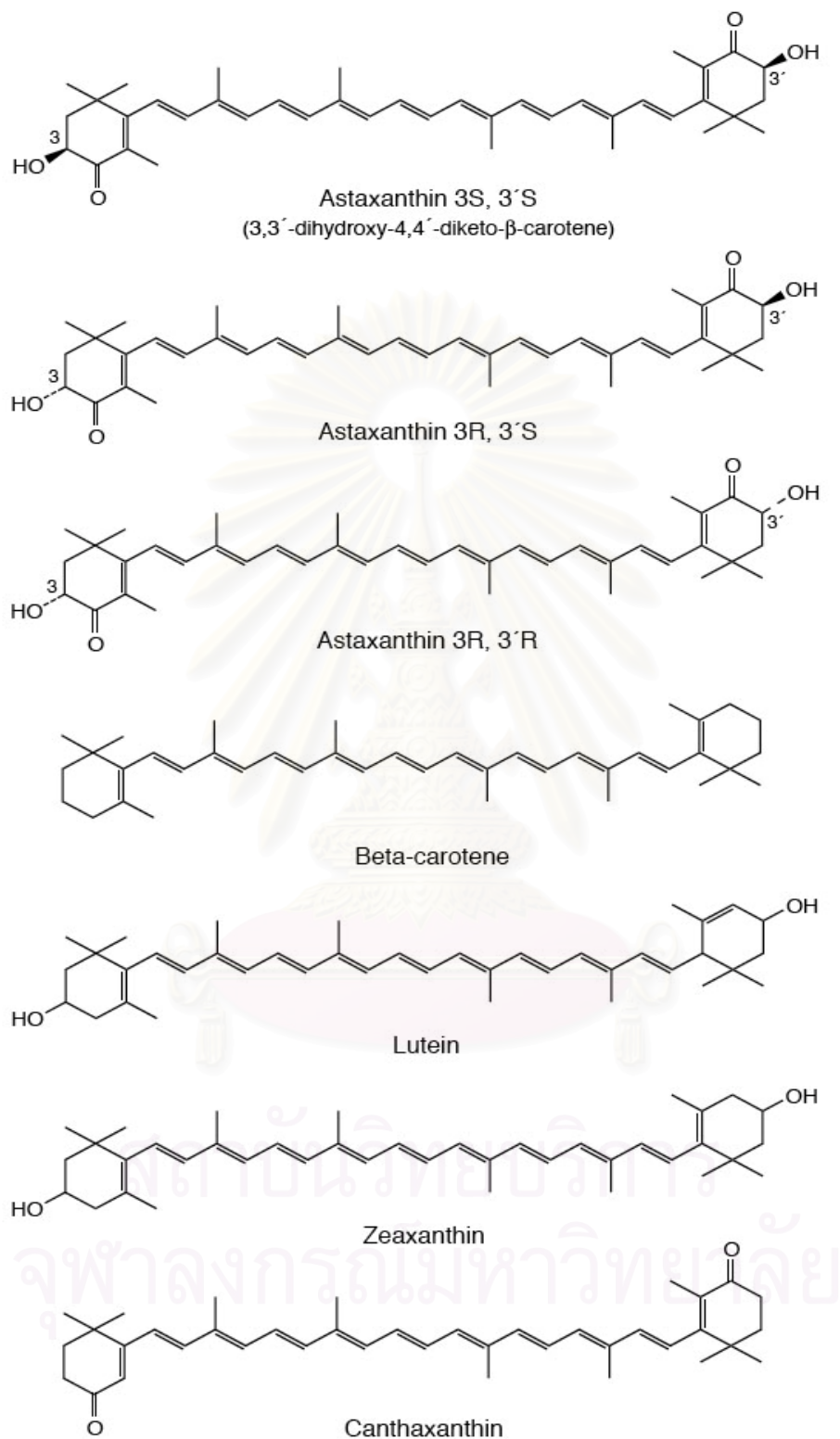


Figure 2.4 Structure of carotenoids

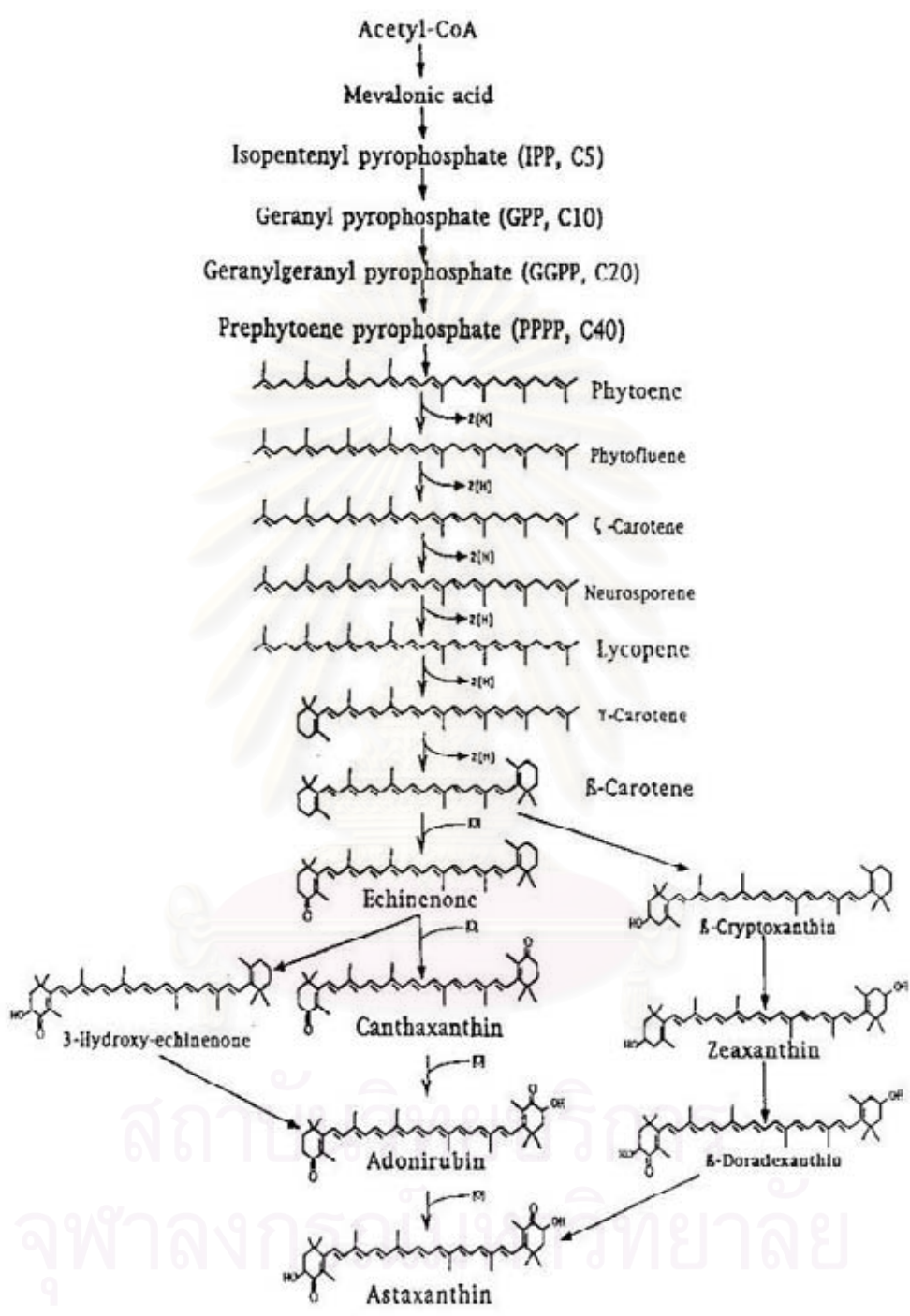


Figure 2.5 Pathway for astaxanthin biosynthesis in *H. pluvialis* [Steinbrenner and Linden., 2001]

#### b) Yeast

Yeast under genus *Phaffa* is characterized by synthesis of astaxanthin. However, its contents of astaxanthin is only 200 to 300  $\mu\text{g g yeast}^{-1}$  (0.02-0.03%). The content of astaxanthin depends on strain and method of culture.

#### c) Crustaceans by product

Crustacean wastes have been used as natural pigment sources for trout and salmon but they have relatively low contents of astaxanthin and high levels of moisture, ash and other nutrients, which cause several practical problems in feed formation that limits their usefulness in animal feed [Bubrick, 1991].

#### d) Other microorganisms

Some bacteria such as *Mycobacterium lacticola* and *Brevibacterium* sp. and fungi in genus *Peniophora* were also reported to be able to accumulate astaxanthin [Borowitzka and Borowitzka, 1989]. Carotenoid level of these microorganisms is low and growth is slow. Sources of astaxanthin produced by microorganisms are shown in Table 2.1.

### 2.3 Production of astaxanthin by *H. pluvialis*

It is reported that a morphological change of *H. pluvialis* from the green vegetative cells moving with flagella to red resting cyst without flagella enhances astaxanthin production, and that astaxanthin accumulation could be induced by high temperature, deficiency of nutrients [Fabregas et al., 2000], high light intensity [Kobayashi et al., 1992b], supplemental blue light [Park and Lee, 2000] and the addition of oxidative supplements to media [Kobayashi et al., 1993]. These results show that astaxanthin production by *H. pluvialis* was enhanced under conditions of stress. Since different culture conditions were required for the production of green vegetative cells of *Haematococcus* and the accumulation of astaxanthin in the red aplanospores, a two-stage



production process has generally been proposed [Kobayashi et al., 1991; Harker et al., 1996a; Olaizola, 2000]. These two steps are controlled by two different sets of conditions as detailed below.

### 2.3.1 Optimum environmental condition for *H. pluvialis* culture

Several physiological parameters such as light and temperature, as well as nutritional and other environmental factors could potentially affect the growth of *H. pluvialis*. Each factor is described below.

#### 1) Light

Light is an essential factor for the growth of a variety of organisms. According to literature (as summarized in Table 2.2), the optimal light intensities for the growth of *H. pluvialis* ranges between 2 and 24 kLux.

#### 2) Temperature

Temperature is one of the major factors controlling the rate of photosynthesis in all plants. In general, growth increases with temperature up to an optimum temperature then declines rapidly as the temperature exceeds its optimum. Table 2.2 showed that the optimum temperature for growth in *H. pluvialis* lies in the range of 15 and 27°C.

#### 3) pH

Table 2.2 shows that the optimum pH range for growth in *H. pluvialis* is between 6.5 and 8.

#### 4) Nutrients

Essential elements are usually divided into macronutrients and micronutrients. Macronutrients are required in relatively quantity. Examples of macronutrients are carbon, nitrogen, phosphate, calcium, etc. *H. pluvialis* was generally found to grow rapidly at high nitrogen and phosphate concentrations [Borowitzka, 1991; Borowitzka 1992]. Protor [1997] found that N-nitrate was more preferable to N-ammonium for the growth of *H. pluvialis*. Micronutrients are required in relatively low quantities, within the concentration range of  $\text{mg L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Examples of micronutrients needed for algal growth are iron, boron, manganese, copper and vitamin.

#### 5) Other conditions

Some microalgae can grow heterotrophically in the dark using organic substrates as carbon and energy sources. For example, many species in the genus *Haematococcus* can grow not only autotrophically using  $\text{CO}_2$  in the light, but also heterotrophically using organic carbons such as acetate, ethanol and glucose in the dark. However, exceptions have been reported in *H. pluvialis*, in which both the photoassimilation of  $\text{CO}_2$  and the oxidative assimilation proceed concomitantly under the mixotrophic condition. Recently, Tripathi et al. [1999] demonstrated that much higher cell densities and productivities can be achieved for *H. pluvialis* in bioreactors under heterotrophic ( $3 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ,  $0.25 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) and mixotrophic ( $4.2 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ,  $0.35 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) conditions than in conventional photoautotrophic ( $1.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ ,  $0.125 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) systems.

Note: The summary of Environment growth factors for *H. pluvialis* is given in Table 2.2.

### 2.3.2 Effect of environment factors on astaxanthin accumulation in *H. pluvialis*

Astaxanthin synthesis in cyst of *H. pluvialis* increases under oxidative stress caused by active oxygen species, intense light, drought, high salinity, and high temperatures. The summary of environment factors on Astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* is provided in Table 2.3.

#### 1) Light

Light is important for the regulation of carotenogenesis in a wide variety of organisms. Light is known to stimulate astaxanthin formation in *H. pluvialis* [Bussiba and Vonshak, 1991]. Goodwin and Jamikorn (1954) showed that low carotenoid content was obtained if *H. pluvialis* cultures were placed in the dark. The range of light intensity for the production of astaxanthin was found to be quite large. For instance, the optimum light intensities for astaxanthin accumulation of *H. pluvialis* ranged between 75 and 100 klux [Fan et al., 1994]. On the other hand, Kobayashi et al. (1992a) showed that the range in light intensity of as low as 3.4-14.05 klux could also result in the algal morphology changed from vegetative to cyst. This occurred simultaneously with the carotenoid formation. Note that carotenoid formation was more efficiently enhanced under blue light than under red light [Katsuda et al., 2004; Lababpour et al., 2005]. In the work by Kaewpintong (2004), cyst was already formed at the light intensity of as low as 7 klux. The difference in the reported light intensity for the induction of astaxanthin could be due to several other environmental conditions which were location specific, for instance, temperature, and the difference in the medium used in the cultivation.

#### 2) Temperature

Astaxanthin accumulation gradually increased with temperature. Optimal temperature for astaxanthin synthesis was reported to be higher than 30°C [Tjahjono et al., 1994; Fan et al., 1994].

### 3) Nutrients

The nutritional factors inducing astaxanthin synthesis in green algae are described below.

#### (i) Nitrogen and Carbon

In *H. pluvialis* cultures, nitrogen limitation is a key factor for the accumulation of astaxanthin [Kobayashi et al., 1991]. Acetate and glycine were demonstrated to stimulate astaxanthin formation in *H. pluvialis*.

#### (ii) Phosphorus

Phosphorus is one of the important nutrients for astaxanthin synthesis. Astaxanthin accumulation could be induced by altering phosphate content. Under the phosphate deficiency condition, *H. pluvialis* could accumulate high amount of astaxanthin [Harker et al., 1996a; Bussiba and Vonshak, 1991].

#### (iii) Iron

The astaxanthin formation of *H. pluvialis* was enhanced in Fe<sup>2+</sup> rich medium [Kobayashi et al., 1992a].

### 4) Salt stress

The accumulation of astaxanthin in cyst under salt stress condition was reported both in the dark [Kobayashi et al., 1997] and in the light [Spencer, 1989; Borowitzka, 1991; Bussiba and Vonshak, 1991; Cordero et al., 1996]. In addition Sarada et al. (2002) found that the age of the culture was crucial in triggering astaxanthin production in the salt stress induced culture. Cordero et al. (1996) demonstrated that *H. pluvialis* could

accumulate high amount of astaxanthin when they were subject to the solution with 0.2% sodium chloride.

## 2.4 Culture Systems

Several types of culture systems have been reported for the growth of microalgae. The selection of culture system depends on several factors, e.g. biology of the algae, energy, the cost of land, nutrient and the type of final product [Borowitzka et al., 1992]. In brief, culture systems can be categorized into two groups: open and close systems. Table 2.4 summarizes advantages and disadvantages of various types of culture systems.

### 2.4.1 Open systems

Open systems are the oldest and simplest form of culture systems for algal cultivation. In this system, algae are cultivated under conditions identical to the external environment. Since microalgae are very efficient in converting solar energy, many attempts have been made to cultivate them in this simple manner such as shallow open ponds. However, pure cultivation of microalgae has so far found only limited success.

Open systems for mass cultivation of microalgae have been succeeded for only a few species. These algae are usually achieved by maintaining extreme culture environments such as high salinity, high alkalinity and high nutrition. To date, only *Dunaliella*, *Spirulina* and *Chlorella* have been successfully mass cultured and marketed commercially [Lee and Soh, 1991]. However, Cynotech Corporation has reported commercial production of astaxanthin by *H. pluvialis* for reddening stage in open cultivation ponds, but detail has not been disclosed.

A few achievements in the cultivation of astaxanthin in open system were reported. This included the work of Harker et al. (1996b) who studied the cultivation of astaxanthin of *H. pluvialis* in 250 L open raceway pond and found that the culture was subject to high level of *Cyanobacteria* contamination and predation by protozoa, which



resulted in poor alga growth. In addition, the cultivation of *H. pluvialis* in 25,000 L raceway pond was achieved with an average growth rate of approximately  $0.14 \text{ d}^{-1}$ . This level was still far lower than those obtained in the closed system as elucidated in the next section.

#### 2.4.2 Close systems

Not all alga species are suitable for the culture in an open system, particularly those that are easily contaminated. Common close systems consist of flask and bioreactors such as stirred tank and airlift reactor etc. Flask is the simplest type and is the easiest to control the environmental conditions, which often show higher biomass productivity than other type of bioreactors [Kobayashi et al., 1992a; Kaewpintong et al., 2006]. However, this is only limited to small scale systems. Stirred tanks often involves high energy consumption and harsh environmental conditions, e.g. high shear stress, which could deteriorate the quality of the cells. Therefore, the assumptions that high cell concentration is necessary to achieve higher biomass productivity, and the need to maintain monoculture for microalgae that grow in mild culture conditions have led to the development of enclosed photobioreactor.

Previous studies on close systems of *H. pluvialis* [Bubrick, 1991] showed that *H. pluvialis* might be cultivated in close systems due to a decrease in contamination problems and the ease of control of factors that could affect cell growth and accumulation of astaxanthin. In addition, the highest growth rate was obtained from the work of Kobayashi et al. (1992a) who could achieve  $0.58 \text{ d}^{-1}$ . This was performed in a small flask, close system where the environmental condition could be well controlled.

#### 2.5 Airlift photobioreactor systems

For microbial culture, many bioreactor systems are available. Generally they may be classified into two types; (1) mechanically agitated systems such as stirred tank reactor, and (2) pneumatically agitated systems such as bubble column and airlift reactor

(Figure 2.6). Table 2.5 summarizes advantages and disadvantages of each type of bioreactor.

One of the most common types of aerobic bioreactor employed today is the stirred tank reactor. The agitator provides adequate heat and mass transfer, mixing, for several purposes, e.g. the uniformity of suspension (Figure 2.6).

Pneumatic reactors acquire the mixing from the aeration alone which helps lessen the shear effect caused by mechanical agitation. Airlift reactor is one example of this type of pneumatic reactors. Airlift reactors are a relatively new type of fermenter, offering several advantages for large-scale bioprocesses, for animal and plant cell culture in particular.

Airlift bioreactors can be divided into two main types on the basis of their structure (Fig. 2.7):

- (1) external loop vessels, where the circulation takes place through separate and distinct conduits,
- (2) baffled vessels or internal loop, where the addition of appropriate baffles creates the channels required for the circulation.

The design of airlift systems can be modified to permit variation in direction of circulation, extent of bubble disengagement from the fluid and flow rate of the various phases. All airlift bioreactors, regardless of the basic configuration (external loop or baffled vessel), comprise four distinct sections with different flow characteristics.

- (1) Riser- gas is injected at the base of this section; the flow is predominantly upwards.

- (2) Downcomer- parallel to the riser and connected to it at the bottom and at the top; the flow is downwards. The driving force of this recirculation is the difference in mean density or hydrostatic pressure between this section and the riser.

- (3) Base - in the vast majority of airlift designs, the bottom connection zone between the riser and downcomer is very simple and usually not considered as significant

factor affecting overall reactor behavior. However, the design of this section can influence gas holdup, liquid velocity and solid phase flow.

(4) Gas separator- this section is at the top of the fermenter, connecting the riser to the downcomer, allowing liquid recirculation and gas disengagement. A design that allows for gas residence time in the separator substantially longer than the time required by the bubbles to disengage will ensure that a minimal fraction of the gas will circulate in the fluid through the downcomer (Figure 2.7).

## 2.6 Airlift photobioreactor for the cultivation of *H. pluvialis*

The key factors for the efficiency of the process are the continuous production of green vegetative cells and the application of a separate induction process under conditions that could avoid cell death. A summary of previous studies on factors controlling the growth and factors controlling astaxanthin induction are given in Tables 2.2 and 2.3, respectively. It can be seen that most of the cultivation could only achieve a low level of growth rate, i.e. in the range of 0.09 to 0.32 d<sup>-1</sup>, and the productivity is showed in the range of 0.0003 to 1.3 x 10<sup>6</sup> cell L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. The cultivation in flask has been the most employed method, because the environmental conditions could be well controlled. The astaxanthin productivity is in the range of 0.02 to 9.6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. An increase in light intensity and nutrient stress methods are mostly used to induce astaxanthin.

Airlift bioreactors have been employed for the production of astaxanthin from *H. pluvialis* by Harker et al. (1996b). The mass cultivation of *H. pluvialis* in the 30 L airlift bioreactor was reported with the specific growth rate of approximate 0.1 d<sup>-1</sup>. However, this work concentrated more on astaxanthin induction by the presence of NaCl and therefore the condition of the reaction might not be suitable for the growth of the alga. On the other hand, Kaewpintong et al. (2006) reported that the F1 medium suggested by Fabregas et al. (1998) with a modified 12 µg L<sup>-1</sup> of vitamin B<sub>12</sub> operated with mixture of air and 1% (by volume) CO<sub>2</sub> at superficial gas velocity of 0.4 cm s<sup>-1</sup> provided the highest cell growth. The harvest of semi-continuous culture conditions was performed at every 4

days giving the specific growth rate and productivity in 3L airlift bioreactor with 1 kLux of light intensity at  $0.31 \text{ d}^{-1}$  and  $5.52 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectively. This is by far the highest reported growth rate in the bioreactor, not including those that performed the cultivation in flasks. Table 2.3 indicates that the highest productivity ( $0.875 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) was obtained from Kobayashi et al. (1998) who operated the cultivation in 200 mL flask under mixotrophic condition at  $20^\circ\text{C}$  and pH of 6.8. In this work, *H. pluvialis* was grown in basal medium and the cultures submitted to light intensity at 1.5 kLux to give the productivity at  $0.875 \times 10^6 \text{ cell mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$  but this was performed in a small flask where the environmental conditions could be well controlled.

## 2.7 Induction of astaxanthin

Often, astaxanthin has been achieved under salt stress, elevated temperature, and light, where the summary of environment factors on astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* is given in Table 2.3. The highest productivity of astaxanthin is obtained from the work of Fabragas et al. (2001) who could achieve  $9.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . This system was operated in a two-stage small scale system (70 mL test tube) and employed the high light intensity to induce astaxanthin. Zhang et al. (1999) also employed a two-stage system in the production of astaxanthin and reported that astaxanthin productivity in fed-batch condition of stirred tank reactor was  $3.22 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

Table 2.1 Biological sources of astaxanthin

Source	Astaxanthin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ of cell)	Astaxanthin (% dry cell)	Reference
<i>Bacteria: Brevibacterium</i>	30		Lorenz and Cysewski, 2000
<i>Mycobacterium</i>	30		Lorenz and Cysewski, 2000
Krill oil: Crawfish oil		0.15-0.4	Lorenz and Cysewski, 2000
<i>Yeast: Phaffia rhodozyma</i>	200-300	0.02-0.03	Borowizka et al., 1989
<i>Algae: Chlamydomonas</i>	<50		Harker et al., 1996
<i>Euglena rubida</i>	<50		Harker et al., 1996
<i>Haematococcus</i>		1.5-3	Lorenz and Cysewski, 2000

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Table 2.2 Environmental growth factors on growth of *H. pluvialis*.

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (●10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )						
Tjahjono et al., 1994	Flask		<u>2 step</u>	mixotropic		cool white													
			1. Basal+45mMSA											1.5	fluorescent	6.8	20	5.13	1.28
			2. Basal+45mMSA +450mMFe <sup>2+</sup>											8.6				5.22	1.30
Harker et al., 1996a	Stirred tank	250	1. Bold's Basal+	autotropic	1.75	cool white fluorescent		80			2.25		0.075						
			18uMFeso <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O											1.98	0.066				
			2. Bold's Basal+																
			36uMFeso <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O																
			3. Bold's Basal+																
			72uMFeso <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O																
	Stirred tank	250	1. Bold's Basal+	autotropic	1.75	cool white fluorescent		80			1.83		0.061						
			0.8uMK <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>											2.70	0.09				
			2. Bold's Basal+																
			1.4uM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>																
			3. Bold's Basal+																
			3.4uM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>																
Stirred tank	250	1. Bold's Basal+	autotropic	1.75	cool white fluorescent		80			2.81		0.093							
		2. Bold's Basal+											0.41	0.013					
		40uMKCl																	
		3. Bold's Basal+																	
		70uMKCl																	
		4. Bold's Basal+																	
100uMKCl	0.23	0.01																	
	0.18	0.006																	

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (●10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
Harker et al., 1996a	Stirred tank	250	1. Bold's Basal+	autotropic	1.75	cool white		80		22	0.33		0.011	
			2. Bold's Basal+			fluorescent					0.81	0.07		
			0.75uM NaNO <sub>3</sub>								0.90	0.030		
			1.5uM NaNO <sub>3</sub>								2.55	0.085		
			4. Bold's Basal+								2.4	0.080		
			3.0uM NaNO <sub>3</sub>											
		Stirred tank	250	1. Bold's Basal+	autotropic	1.75	cool white		80		22	2.90		0.09
	2. Bold's Basal+			fluorescent			1.20					0.04		
	40uMNaCl						1.10					0.03		
	3. Bold's Basal+						0.36					0.01		
	Airlift	300	2 step	autotropic	2.5	cool white				14-27	2.50	1.57	0.114	
1. Bold's Basal+			fluorescent											
	Flask	100	2 step	autotropic	1	white light				20±2	2.9		0.414	
Grunewald et al., 1997			1. Bold's basal											
			2. Bold's basal (no Nitrate)			1.75								lamp

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (•10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Chen et al., 1997	Stirred tank	3710		mixotrophic	8.5	fluorescent	100	400	7	25	0.7	1.52	0.088
	Stirred tank	3710		heterotrophic	85	lamp	100	400	7	25	1.45	0.50	0.181
Frabregas et al., 1998	Tube	70	2 step	Mixotrophic	2	day light	15 + CO <sub>2</sub>		8	25	3.77		0.775
			1. OHM			12Dark:12Light					fluorescent	1.20	0.240
			2. BBM								lamp	0.58	0.116
	Tube	70	1. Control	mixotrophic	2	day light	15 + CO <sub>2</sub>		7.2-7.8	25	6.25		0.446
			2. Control (no KMnO <sub>3</sub> )			12Dark:12Light					fluorescent	1.83	0.131
			3. Control (no MgSO <sub>4</sub> )								lamp	2.65	0.189
			4. Control (no KMn <sub>3</sub> -MgSO <sub>4</sub> )									1.58	0.113
	Tube	70	1. Control	mixotrophic	1.15	day light	15 + CO <sub>2</sub>		7.2-7.8	25	4.75		0.337
			2. Control (no KMnO <sub>3</sub> )								fluorescent	1.15	0.082
			3. Control (no MgSO <sub>4</sub> )								lamp	3.25	0.232
			4. Control (no KMn <sub>3</sub> -MgSO <sub>4</sub> )									1.28	0.091

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (●10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Kobayashi et al., 1998	Flask	200	Modified	mixotrophic	1.5	fluorescent			6.8	20	7.00		0.875
	Flask	200	Basal		4.5				7	20	3.20		0.388
Tripathi et al., 1999	Flask		KMI	heterotrophic	1.5					25±1	0.3		0.025
	Flask		1. BBM	autotrophic	1.5					25±1	0.15		0.0125
	Flask		1. MM2	mixotrophic	1.5					25±1	0.323		0.027
			2. KM2		1.5					25±1	0.42		0.035
Fabregas et al., 2001	Tube	70	OHM	2 step		cool white							
				1. mixotrophic (semicontinuous)	2	fluorescent lamp	15 + CO <sub>2</sub>	.2-7.8	25±1		control by		0.381
				2. mixotrophic (batch)	12		15 + CO <sub>2</sub>		25±1			0.446	
Hata et al., 2001	Flask	500	Basal	heterotrophic						25±1			0.87
	Flask	500	Basal+10mMSA	heterotrophic ( fed-batch)						25±1			0.667
Mirash et al., 2002	Glass column	600	BG-11		3.75					25	200	4.7	25
					17.5					25	20	1.5	2.5
						BG-11 (no Nitrogen)							

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (●10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Tripathi et al., 2002	Flask	100	1.Basal+ Calcium Nitrate	mixotrophic	5				6.5			0.06	0.015 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
					5			6.5			0.62	0.115 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	
					5		25	6.5		0.3	0.75 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>		
					5		6.5		0.78	0.195 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>			
					5		6.5		0.64	0.16 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>			
Choi et al., 2003	Bubble colimn	2000	FBBM	mixotrophic	2	fluorescent lamp	0.2+0.5%CO <sub>2</sub>		7		0.17		0.009
					4.5			7	25	0.2		0.011	
					7			7		0.16		0.008	
Katsuda et al., 2004	Flask	200	Basal	mixotrophic	0.15	blue LED			6.8				0.04
					0.4	blue LED		6.8			0.04		
					0.6	blue LED		6.8			0.03		
					0.15	red LED		6.8			0.036		
					0.4	red LED		6.8	20		0.44		
					0.6	red LED		6.8			0.04		
					0.15	fluorescent		6.8			0.03		
					0.4	fluorescent		6.8			0.56		
0.6	fluorescent		6.8			0.02							



Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (●10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Dong and Chao., 2004	Flask	250	BBM	mixotrophic	0.65-4.5 12Dark:12Light	top cool white fluorescent	110	110	7	23.8		5.7	1.14 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
Orosa et al., 2005	Aerate reactor	400	Bold's basal + ALGAL-1 + nitrate	mixotrophic	3.415	fluorescent lamp+LED			7	18	1.2		0.08
Garcia et al., 2005	Tubular	55,000	Inorganic free of acetrate	mixotrophic	2.5-100				8	20		7	0.41 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
	Bubble column	55,000		mixotrophic					8			20	1.4
Jeon et al., 2005	Flask	250	1.OHM +40mM sodium acetrate		4								0.133 g L <sup>-1</sup> Day <sup>-1</sup>
					6								0.144 g L <sup>-1</sup> Day <sup>-1</sup>
				mixotrophic	4	warm white fluorescent			25		0.104 g L <sup>-1</sup> Day <sup>-1</sup>		
					6						0.103 g L <sup>-1</sup> Day <sup>-1</sup>		
					5						0.130 g L <sup>-1</sup> Day <sup>-1</sup>		

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (•10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
Jeon et al., 2005	Flask		1.OHM +10mM sodium acetrate	mixotrophic	2.5	warm white fluorescent				25			0.062 gL <sup>-1</sup> Day <sup>-1</sup>	
			2.OHM +10mM sodium acetrate		7.5								0.210 gL <sup>-1</sup> Day <sup>-2</sup>	
			3.OHM +50mM sodium acetrate		2.5								0.096 gL <sup>-1</sup> Day <sup>-3</sup>	
			4.OHM +50mM sodium acetrate		7.5								0.210 gL <sup>-1</sup> Day <sup>-2</sup>	
			5.OHM +30mM sodium acetrate		1.5								0.840 gL <sup>-1</sup> Day <sup>-5</sup>	
			6.OHM +30mM sodium acetrate		8.5								0.243 gL <sup>-1</sup> Day <sup>-6</sup>	
			7.OHM +1.7mM sodium acetrate		5								0.7000 gL <sup>-1</sup> Day <sup>-7</sup>	
Kim et al., 2005	bubble column	2,000	MBBM	mixotrophic	11.03	fluorescent		6.5		23	76	10	1.73	
					11.03	fluorescent + flashing light		6.5			23	70	18	1.566
					3.28	flashing light		6.5			23	68	12	0.14

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (●10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
Kaewpintong et al., 2006	Flask	1,000	F1	autotropic		F					0.55			
			Hongkong									0.3		
			BG-11		1	luorescent	0.73		27±1	0.38				
			Basal							0.1				
			M1							0.03				
				M6							0.04			
	Flask	1,000	F1+4μg L <sup>-1</sup> B12	autotropic								0.059		
			F1+8μg L <sup>-1</sup> B12								0.06			
			F1+12μg L <sup>-1</sup> B12		1	fluorescent	0.73		27±1	0.081				
			F1+16μg L <sup>-1</sup> B12							0.082				
			F1+20μg L <sup>-1</sup> B12							0.083				
	Bubble column	3,000	F1	autotropic	1	fluorescent	0.73			27±1	0.42		0.151	
	Airlift	3,000	F1	autotropic	1	fluorescen	0.73			27±1	0.795		0.357	
	Airlift	3,000	F1	autotropic	1	fluorescen	0.73+0.5%CO <sub>2</sub>			27±1	0.44		0.140	
							0.73+1%CO <sub>2</sub>				0.8	0.376		
0.73+1.5%CO <sub>2</sub>										0.69	0.370			
0.73+2%CO <sub>2</sub>										0.32	0.083			

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Cell number (*10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )	Dry cell weight (g L <sup>-1</sup> )	Productivity of cell (●10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Kaewpintong et al., 2006	Airlift	3,000	F1	autotropic	0.6	fluorescen	0.73			27±1	0.55		0.19
					1						0.75		0.337
					2						0.7		0.28
					2.5						0.2		0.068
					3						0.1		0.02
	Airlift	3,000	F1+12μg L <sup>-1</sup> B12	autotropic	1	fluorescen	0.73+1%CO <sub>2</sub>			27±1		0.0552	

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2.3 Effect of environment factors on induction of astaxanthin.

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin
Kobayashi et al., 1991	Flask	200	1. Basal+SA	mixotrophic	8.6				6.8	20		5.5	0.687		Iron stress
			2. Basal+SA+ Fe <sup>2+</sup> 150um									13.5	1.687		
			3. Basal+SA+ Fe <sup>2+</sup> 300um									20.0	2.5		
			4. Basal+SA+ Fe <sup>2+</sup> 450um									23.7	2.962		
			5. Basal+SA+ Fe <sup>2+</sup> 600um									3.7	0.462		
	Flask	200	1. modified	mixotrophic	4.5				7	20		2.692	0.33		Acetrate stress
			2. modified + 20mMSA									15.00	1.87		
			3. modified + 40mMSA									12.923	1.615		
			4. modified + 60mMSA									8.462	1.057		
	Flask	200	1. modified	mixotrophic	4.5				7	20		2.692	0.336		Pyruvate stress
			2. modified + 10mPyruvate									3.846	0.490		
			3. modified + 20mPyruvate									9.231	1.153		

Note: The concentration of each astaxanthin form was calculated based on the proportion of the carotenoid composition.



Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin
Kobayashi et al., 1991			4. modified + 30mMPyruvate									20.385		11.153	
			5. modified + 40mMPyruvate									17.692		2.211	
			1. modified + 2. modified + 3mMPyruvate	mixotrophic	4.5							16.538		2.06	
			3. modified + 6mMPyruvate									17.692		2.211	
			4. modified + 9mMPyruvate									20.769		2.596	
			5. modified + 12mMPyruvate									21.538		2.692	
			1. modified + 2. modified + 3mM Mevalonate	mixotrophic	4.5							14.8	3.5	1.85	
			3. modified + 3mM [Isopentyl									18.2	5.6	2.275	
			4. modified + 12mM Pyruvate									15.3	4.4	1.912	
												20.6	0.8	2.575	

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin
Kobayashi et al., 1991			5. modified + 3mM molanate								17.7	2.3	2.215		
			6. modified + 3mM L-Leucine								11.2	2.4	1.4		Nutrient stress
			7. modified+ 3mM Dimethyl lacryrate								16.9	3.0	2.112		
Harker et al., 1996a	Stirred tank	250	1. Bold's Basal+ 18uMFeso <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	autotrophic	1.75	cool white fluorescent		80			5.13				-Iron stress
			2. Bold's Basal+ 36uMFeso <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O								3.03				
			3. Bold's Basal+ 72uMFeso <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O								0.68				
	Stirred tank	250	1. Bold's Basal+ 0.8uMK <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	autotrophic	1.75	cool white fluorescent		80			32.0				Phosphate stress
			2. Bold's Basal+ 1.4uM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>								19.8				
			3. Bold's Basal+ 3.4uM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>								19.5				

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin	
Harker et al., 1996a	Stirred tank		1. Bold's Basal+	autotrophic	1.75	cool white fluorescent		80			36.8			1.23	Salt stress	
			2. Bold's Basal+ 40uMKCl								16.6		0.54			
			3. Bold's Basal+ 70uMKCl								5.8		0.19			
			4. Bold's Basal+ 100uMKCl								1.8		0.06			
	Stirred tank			1. Bold's Basal+	autotrophic	1.75		80		22		11.7			0.39	-Nitrate stress
				2. Bold's Basal+ 0.75uM NaNO <sub>3</sub>								10.8		0.36		
				3. Bold's Basal+ 1.5uM NaNO <sub>3</sub>								16.4		0.57		
				4. Bold's Basal+ 3.0uM NaNO <sub>3</sub>								11.8		0.39		
				5. Bold's Basal+ 6.0uM NaNO <sub>3</sub>								9.7		0.32		
	Stirred tank			1. Bold's Basal+	mixotrophic	1.75		80		22					1.45	Salt stress
				2. Bold's Basal+ 40uMNaCl										1.71		
				3. Bold's Basal+ 70uMNaCl										1.47		
			3. Bold's Basal+ 100uMNaCl										0.67			

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin	
Cordero et al., 1996			1. Control	mixotrophic	1.3			80		22	6.7			13.4	-Salts tress	
			2. Control + 0.025 g/l SA		12Dark: 12Light							13.6				2.72
			3. Control + 0.05 g/l SA									13.3				2.66
			4. Control + 0.01 g/l SA									6.4				1.28
			1. Control + 0.1%NaCl	mixotrophic	1.3			80		22		6.57			1.14	-Salts tress
			2. Control + 0.2%NaCl		12Dark: 12Light							18.6			3.72	
			3. Control + 0.4%NaCl									7.0			1.40	
			1. Control + 0.1%NaCl + 0.025 g/l SA	mixotrophic	1.3					7.5	25	9.7			1.94	-Salts tress
			2. Control + 0.2%NaCl+ 0.05 g/l SA		12Dark: 12Light							10.4			2.08	
			3. Control + 0.4%NaCl+ 0.1 g/l SA									15			3.00	

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin		
Cordero et al., 1996			1. Control + 0.2%NaCl + 0.025 g/l SA	mixotrophic							9.0			1.80	-Salts tress		
			2. Control + 0.2%NaCl+ 0.05 g/l SA									6.3			1.26		
			3. Control + 0.2%NaCl+ 0.1 g/l SA									11.7			2.34		
			1. Control + 0.4% NaCl + 0.025 g/l SA	mixotrophic	1.3 12Dark: 12Light				7.5	25		7.3			1.46		
			2. Control + 0.4%NaCl+ 0.05 g/l SA										3.6			1.52	
			3. Control + 0.4%NaCl+ 0.1 g/l SA										3.0			0.6	



Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin
Frabregas et al., 1998	Tube	70	1. Control	mixotrophic	2		15 +		7.2-	25	0			0	-Effect of nutrient on astaxanthin accumulation
			2. Control (no KMnO <sub>3</sub> )		12Dark: 12Light	CO <sub>2</sub>	7.8			23.5		1.679			
			3. Control (no MgSO <sub>4</sub> )						6.7		0.479				
			4. Control (no KMn <sub>3</sub> -MgSO <sub>4</sub> )					15.6		1.114					
			1. Control	mixotrophic	11.5		15 +	7.2-	25	37.5		2.679			
			2. Control (no KMnO <sub>3</sub> )		12Dark: 12Light	CO <sub>2</sub>	7.8		49.5		3.536				
			3. Control (no MgSO <sub>4</sub> )						25.7		1.836				
			4. Control (no KMn <sub>3</sub> -MgSO <sub>4</sub> )					28.8		2.057					
Kobayasi et al., 1998	Flask	200	Modified	mixotrophic	1.5				6.8	20	8.40		1.05	-Effect of nutrient on astaxanthin accumulation	
	Flask	200	Basal		4.5	12Dark: 12Light			7	20		13.35	1.669		

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin		
Zhang et al., 1999	Stirred tank	3700	Hong Kong+ SA	Mixotrophic (fed-batch)	2.25-9		100	350	7	30	64.40			3.22	- Salt stress		
	Stirred tank	3700	Hong	Mixotrophic (batch)			100	350	7	30	53.43			2.67	- Increase light intensity - Nutrient stress		
Fabregas et al., 2001	Tube	70	OHM	2 step	2		15 +			25					-Increase light intensity		
				1. mixotrophic (semicontinuous) 2. mixotrophic (batch)	12Dark: 12Light 12	CO <sub>2</sub>	7.2- 7.8			9.6							
Sarada et al., 2001	Flask		Basal+SA+ NaCl	mixotrophic	1.				5-9	25	10.93	12.25	6.2	0.683	- Increase pH - Nitrate stress - Salt stress		
				mixotrophic	1.5							2.32	2.05	6.50	0.18	- Nitrate stress	
													2.52	2.23	6.50	0.19	
													1.25	1.88	4.97	0.10	
													1.16	1.34	3.58	0.09	
													3.21	4.19	12.40	0.25	
										1.72	2.24	13.4	0.07				
										2.24	4.66	4.03	0.10				

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin			
Sarada et al., 2001			1. Basal+Nacl+SA	mixotrophic	1.5						1.72	2.24	1.34	0.07	- Nitrate stress			
			2. Basal+Nacl+SA + Ca <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>								2.24	4.66	4.03	0.10				
			3. Basal+Nacl+SA + KNO <sub>3</sub>								1.21	1.55	0.22	0.05				
			4. Basal+Nacl+SA + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>								1.03	1.03	0.22	0.04				
			5. Basal+Nacl+SA + NaNO <sub>3</sub>								1.27	2.59	1.56	0.07				
Mirash et al., 2002	Glass column	600	BG-11		3.75										Nitrogen starvation			
			BG-11 (no Nitrogen)		3.75											0.064	0.068	0.008
					17.5											0.16	0.068	0.002
Choi et al., 2003	Bubble colimn	2000	FBBM	mixotrophic	2		0.2+0.5 +CO <sub>2</sub>	7+	25	35					- Increase light intensity			
					4.5											30	1.76	
					7											20	1.17	
Katsuda et al., 2004	Flask	200	Basal	mixotrophic	0.15				6.8	20					-Effect of wavvlength.			
					0.4											0.8	1.2	
					0.6											0.8	2	$\lambda_{max} = 380-625nm$

Reference	Reactor	Volume (mL)	Medium	Condition	Light intensity (kLux)	Light source	Aeration rate (L h <sup>-1</sup> )	Agitation rate (rpm)	pH	Temp (°C)	Astaxanthin conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Carotenoid conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Chlorophyll conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Productivity of astaxanthin (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Method to induce astaxanthin		
Katsuda et al., 2004					0.15				6.8	20				0.4			
					0.4									0.84			
					0.6									0.84			
					0.15									0.2			
					0.4									0.021			
					0.6									1.2			
Dong and Chao., 200	Flask	250	BBM	mixotrophic	0.65-4.5		110	110	6.8	23.8	11.9			2.39	- Increase light intensity		
Orosa et al., 2005	Mini-reactor	400	1Modified	mixotrophic	3.415				7	18±1				3.7	0.37		
														2Modified+0.25%SA		5	0.5
														3Modified+0.5SA		7.6	0.69
														4Modified+1SA		6	0.6
														5Modified+2SA		1.2	0.12
Garcia et al., 2005	Tubular	55,000	Inorganic free of acetate	mixotrophic	2.5-100				8	20	1.1%d.wt.	1.7%d.wt.	1.7%d.wt.	0.4	-Induce by move culture to		
	Bubble column	55,000		mixotrophic					8	20	0.25%d.wt.	0.65	1.9	0.2	raceway pond		

Table 2.4 Advantages and disadvantages of open and closed algal cultivation systems

Parameter	Open pond	Closed system
contamination risk	extremely high	low
space requirement	high	low
water losses	extremely height	almost none
CO <sub>2</sub> losses	high	almost none
weather dependence	High/significant	insignificant
species dependence	restricted to a few algal varieties	many algal varieties
biomass concentration	low	high
efficiency of treatment process	low	high

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2.5 Comparison of properties of different large scale algal culture systems

Reactor type	Mixing	Light utilization efficiency	Temperature control	Gas transfer	Hydrodynamic stress on algae	Species control	Scale up
unstirred shallow ponds	very poor	Poor	none	poor	very low	difficult	very difficult
tank							
circular stirred pond	poor	very poor	none	poor	very low	difficult	very difficult
stirred tank reactor	fair	fair good	none	poor	low	difficult	very difficult
airlift reactor	largely uniform	fair good	excellent	low high	high	easy	difficult
tubular reactor	generally uniform	good	excellent	high	low	easy	difficult
flat plate reactor	uniform	excellent	excellent	low high	low-high	easy	easy
		excellent	excellent	high	low-high	easy	difficult

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



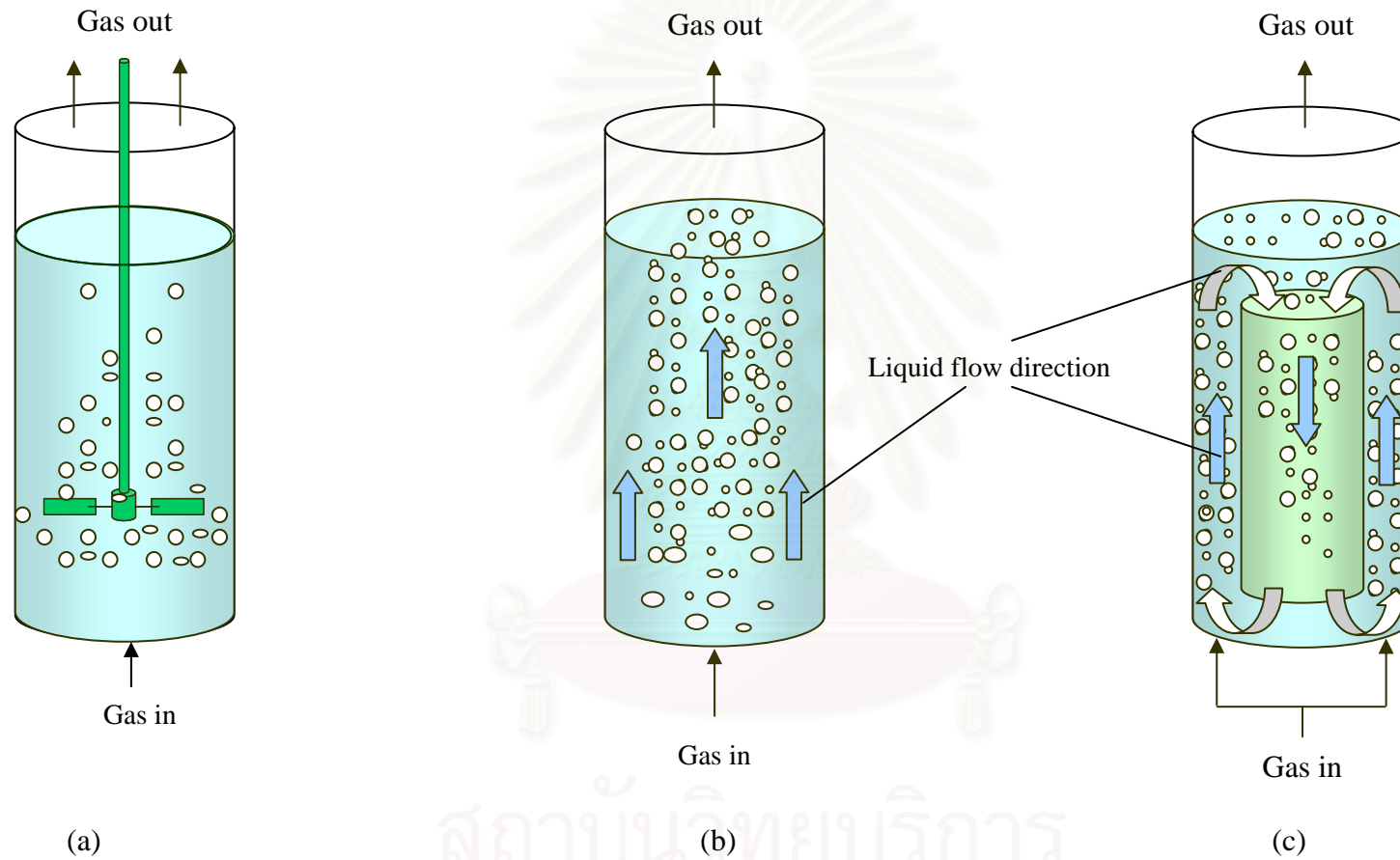


Figure 2.6 Type of bioreactor: (a) stirrer tank reactor, (b) bubble column, (c) airlift contactor

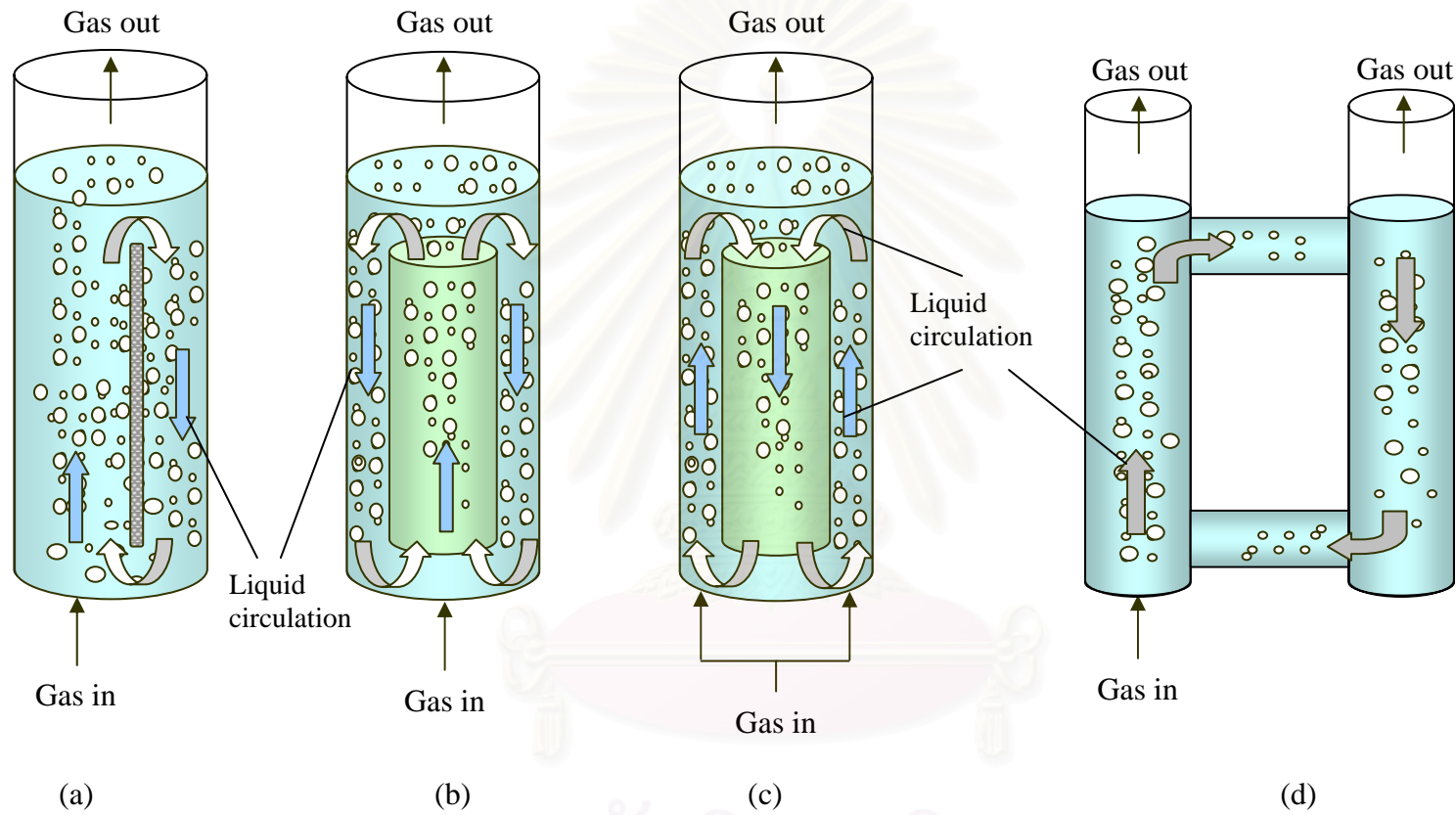


Figure 2.7 Two configurations of ALCs: (a) split cylinder internal loop ALC (b) and (c) concentric internal loop ALCs (d) external loop ALC

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CHAPTER 3

## MATERIALS AND METHODS

### 3.1 Experimental Setup

The experiment in this work was divided into two parts:

- (i) Growth experiment
- (ii) Astaxanthin production experiment

#### 3.1.1 Growth experiment (in airlift photobioreactor)

For the first part, *H. pluvialis* was cultivated in 3L airlift photobioreactor compared with 17L Airlift photobioreactor. The 3L and 17L airlift photobioreactors were made from clear acrylic plastic and had dimensions as shown in Table 3.1. The internal circulation in the airlift systems was induced by installing the draft tube centrally inside the outer column which resulted in the ratio between the downcomer and riser cross section areas ( $A_d/A_r$ ) of 3.2 and 2.78, respectively [see Kaewpintog, 2004 for detail on the determinater of optimal growth conditions for *H. pluvialis*]. These ratios were controlled to be as close as possible to each other by the availability of the commercial draft tube sizes. The schematic diagrams of experimental setup in airlift photobioreactor are shown in Figure 3.1.

The superficial gas velocity was controlled at approximately  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$  and the light intensity was approximately  $20 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . The liquid culture in the airlift photobioreactor was agitated by rising air bubbles. Ambient air from an aquarium pump was metered through a flowmeter, sterilized with a  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  Gelman autoclave filter, and passed into the culture at the base of the reactor. The  $\text{CO}_2$  enriched air was introduced and was metered through a flowmeter, sterilized with a  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  Gelman autoclave filter, passed into the culture, mixed with air, before entering the system at the base of the reactor.

Light for the airlift photobioreactor was supplied from the vertical 18W fluorescent lamps. The illumination intensity incident to the airlift photobioreactor outer surface was measured with a digital LX-5 Lux meter, where photon flux density and irradiance may be readily interconverted as:

$$1 \mu\text{mol}(\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}) = 1\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1} = 119.7/\lambda \text{ Wm}^{-2} = 50 \text{ Lux} \quad (3.1)$$

where  $\lambda$  = the wave length of the light in nanometer

### 3.1.2 Astaxanthin production experiment (in design reactor)

For this experiment, astaxanthin was induced by changing cell environments to promote stress condition (outdoor condition). The schematic diagram of experimental setup in the outdoor raceway reactor is shown in Figures 3.2. The 17 L raceway pond with a surface area of 0.22 m<sup>2</sup> was made from PVC. The dimensions of the raceway pond reactors are shown in Table 3.2.

This system was washed with sterile distilled water before starting the batch culture. The light intensity was approximately 35  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$  from the vertical 18W fluorescent lamps. The movement of the liquid culture in the raceway pond was induced by 4 impellers at 60 rpm. Locations and dimensions of the raceway and the impellers are depicted in Figure 3.2 and Table 3.2

## 3.2 Preparation of Medium and Inoculum

### 3.2.1 Preparation of the bioreactor

- 1) setup the bioreactor as described in Section 3.1.1
- 2) fill the tap water into the bioreactor

3) sparge  $200 \text{ L min}^{-1}$  of ozone through the  $0.45 \mu\text{m}$  Gelman autoclave filter and a flow meter into the water at the base of the bioreactor for 1h in order to clean the whole system

4) sparge the air through the  $0.45 \mu\text{m}$  Gelman autoclave filter and a flow meter into the water at the base of the bioreactor for 3-4 h to remove residual ozone in the water

### 3.2.2 Experimental procedure for growth experiment

1) obtain a green alga, *H. pluvialis* strain NIES-144 from National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan

2) prepare F1 medium which chemical compositions indicated in Table 3.2

3) sterilize the medium in autoclave at  $121^\circ\text{C}$  for 20 min

4) inoculate 10% by volume of cell into 600 mL sterilized fresh F1 medium in 1,000 mL Erlenmeyer flask

5) incubate the flask at  $27^\circ\text{C}$  and supply continuous light intensity of  $20 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$  to the surface of the culture vessel

6) manually shake the flask daily

7) harvest the active green motile cells on the 7<sup>th</sup> day and use as inoculum for other experiments

8) culture cells in airlift photobioreactor where air is sparged through the reactor at superficial gas velocity of  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$

9) illuminate the bioreactor with the fluorescent lamp (18W) at continuous light intensity of  $20 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$  to the surface of the bioreactor. The temperature is controlled in the range of  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

10) measure cell growth as described in Section 3.4.

Note: The sample is collected from the sampling point at the side of the reactor as indicated in Figures 3.1.

### 3.3 Astaxanthin Production Experiment

- 1) prepare the reactor as described in Section 3.1.2
- 2) when algal cells reach the stationary phase, move them to the design reactor in outdoor condition and increase the aeration (in terms of superficial gas velocity) from 0.4 to 0.2 cm s<sup>-1</sup>
- 3) take 3-5 mL of sample for the determination of chlorophylls a and b, and astaxanthin content

### 3.4 Determination of Growth

Alga cell growth was determined by cell density, dry weight and specific growth rate.

#### 3.4.1 Determination of cell density

Cell density was measured by microscope and the counting of cells was performed using an improved Neubauer haemocytometer.

- 1) take two 25 µL drops of culture and place them on a clean haemocytometer slide with cover slip already in place, where the drop is evenly dispersed under the cover slip
- 2) count cells under a microscope (objective 10X) (see in Figure 3.3)
- 3) calculate the number of cells as follows:

$$N = n \times 10^4 \quad (3.2)$$

where  $N$  = Cell number (cell mL<sup>-1</sup>)

$n$  = number of cells count in grid (cells)



### 3.4.2 Determination of dry weight

- 1) dry Whatman GF/C filter (47mm in diameter) in the oven at 70 °C for 24h and record the weight of the dry filter
- 2) filter 30 mL of algal suspension using Bunchner setup connected to a vacuum pump through Whatman GF/C filter
- 3) wash the algal twice with distilled water in order to free the alga from solution
- 4) dry the filter containing alga in oven under the above condition
- 5) cool the dried filter containing alga in a desiccator for 20 min
- 6) weigh the dried filter containing alga with 210S Sartorius electronic balance
- 7) calculate the dry weight from:

$$DW = \frac{W_1 - W_2}{V} \times 1,000 \quad (3.3)$$

where  $DW$  = Dry weight ( $\text{g L}^{-1}$ )

$W_1$  = weight of filter plus algae (g)

$W_2$  = weight of filter (g)

$V$  = volume of sampling (mL)

### 3.4.3 Determination of specific growth rate

The specific growth rate is calculated from the following equation:

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (3.4)$$

where  $\mu$  = Specific growth rate ( $\text{d}^{-1}$ )

$N_1$  and  $N_2$  = cells density at  $t_1$  and  $t_2$  ( $\text{cell mL}^{-1}$ )

$t$  = time (d)

### 3.4.4 Determination of Productivity

The specific productivity rate is calculated by the following equation:

$$\text{Specific productivity} = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1} \quad (3.5)$$

where  $C_1$  and  $C_2$  = cells density at  $t_1$  and  $t_2$  (cell mL<sup>-1</sup>)

t = time (d)

### 3.5 Error of measurement

Error of measurement is presented in the form of standard deviation. The experimental data were reported with one standard deviation as error and this is calculated from:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n y_{is}^2}{(n_y - 1)(n_y)}} \quad (3.6)$$

where

$S$  = standard error

$s$  = series number

$i$  = point numbering series  $s$

$m$  = number of series for point  $y$  in chart

$n$  = number of point in each series

$y_{is}$  = data value of series  $s$  at the  $i$  point

$n_y$  = total number of data values in series

Table 3.1 Geometric details of airlift bioreactor

Geometric details	3 L Airlift photobioreactor	17 L Airlift photobioreactor
Total volume, $V_T$ (L)	3.6	18.85
Working volume, $V$ (L)	3	17
Reactor diameter, $D_R$ (cm)	10	14
Column height, $H_R$ (cm)	60	115
Liquid height, $H_C$ (cm)	46	110.4
Draft tube height, $H_D$ (cm)	50	96.5
Diameter of draft tube, $D_r$ (cm)	4.4	7.2
Bottom clearance, $H_B$ (cm)	4	10

Table 3.2 Geometric details of raceway pond

Geometric details	17 L Raceway pond reactor
Total volume , $V_T$ (L)	33
Working volume, $V$ (L)	17
Reactor diameter, $W$ (cm)	15
Reactor height, $H$ (cm)	15
Diameter of impeller, $D$ (cm)	10

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 3.3 Formulation of F1 media [Fabregas et al., 1998]

Formula	Composition (per liter)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9.87 mg
$\text{KNO}_3$	0.41 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.03 g
$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.22 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	16.41 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.008 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.08 mg
$\text{MoO}_3$	0.66 mg
$\text{Cr}_2\text{O}_3$	0.05 mg
$\text{SeO}_2$	0.036 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0078 mg
$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$	6 mg

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

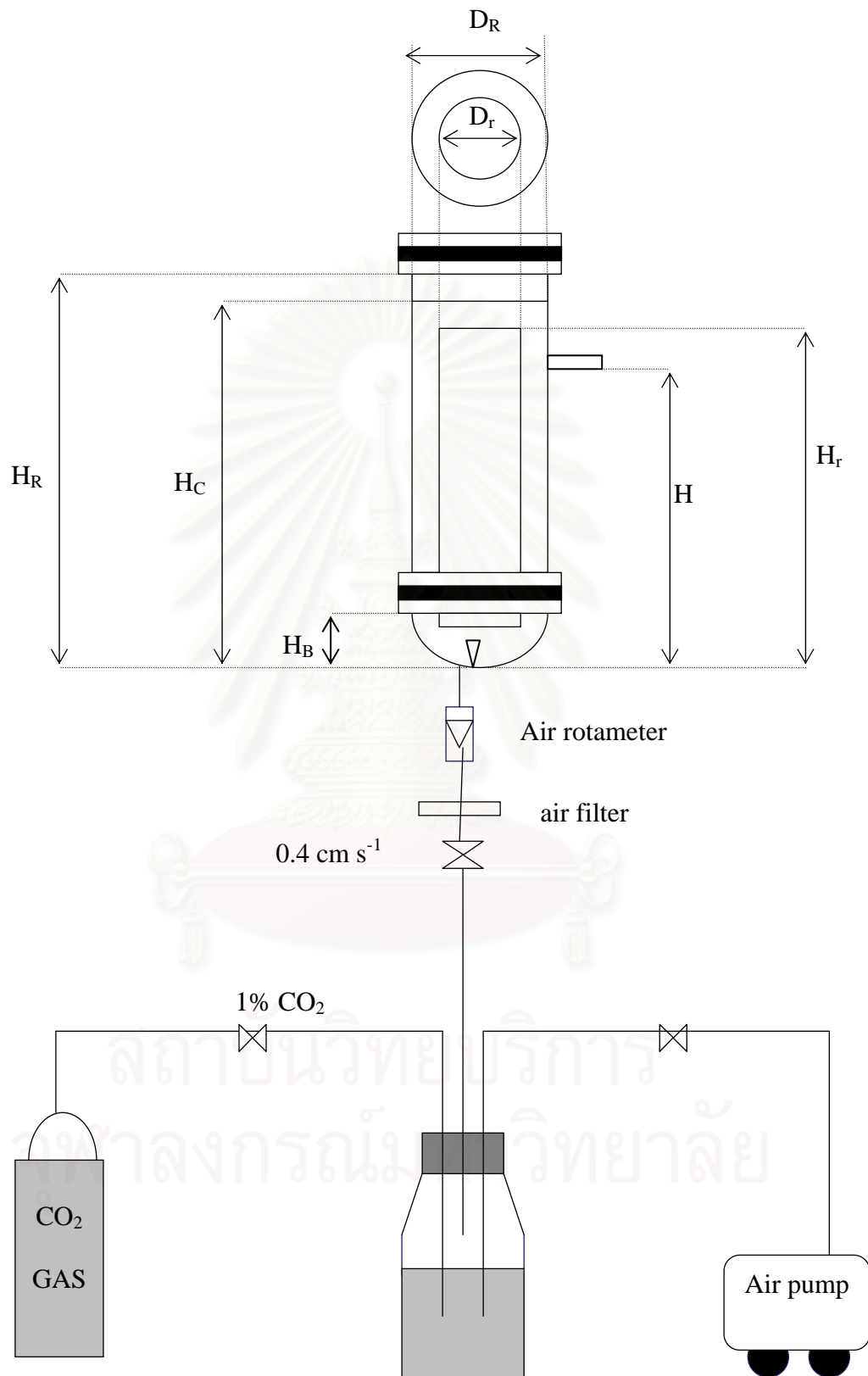


Figure 3.1 Experimental setup and schematic diagram of airlift photobioreactor  
 Symbol:  $H_R$ , column height;  $H_r$ , draft tube height;  $H_B$ , clearance height;  $H_C$ , culture broth height;  $H$ , sampling port height

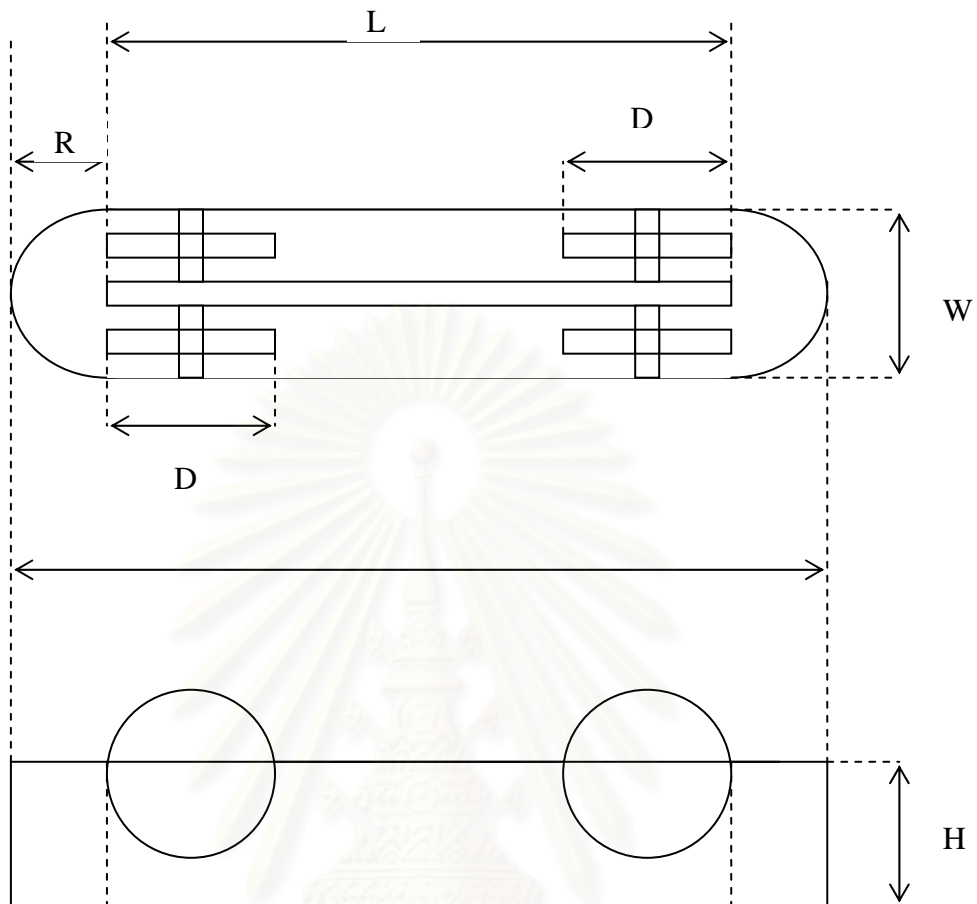


Figure 3.2 Experimental setup and schematic diagram of design reactor (in outdoor)

สงวนลิขสิทธิ์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



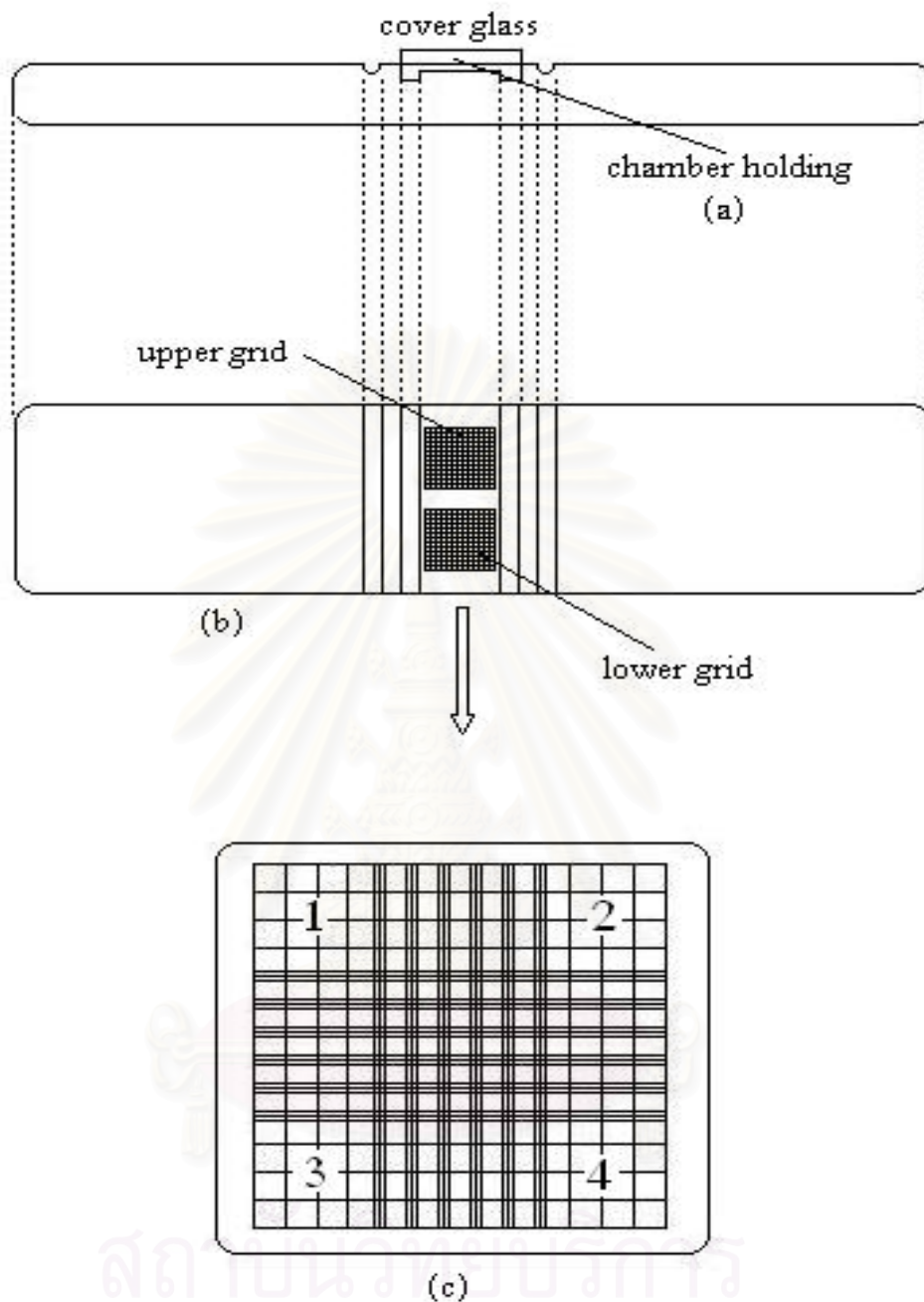


Figure 3.3 (a) Side view of the cell counting chamber showing the cover glass and the space beneath it that holds a microalgae suspension. (b) Top view of the chamber. The chamber has two grids located in the center of the side. (c) An enlarged view of the grid. The microalgae in the squares 1, 2, 3 and 4 are used for cell count

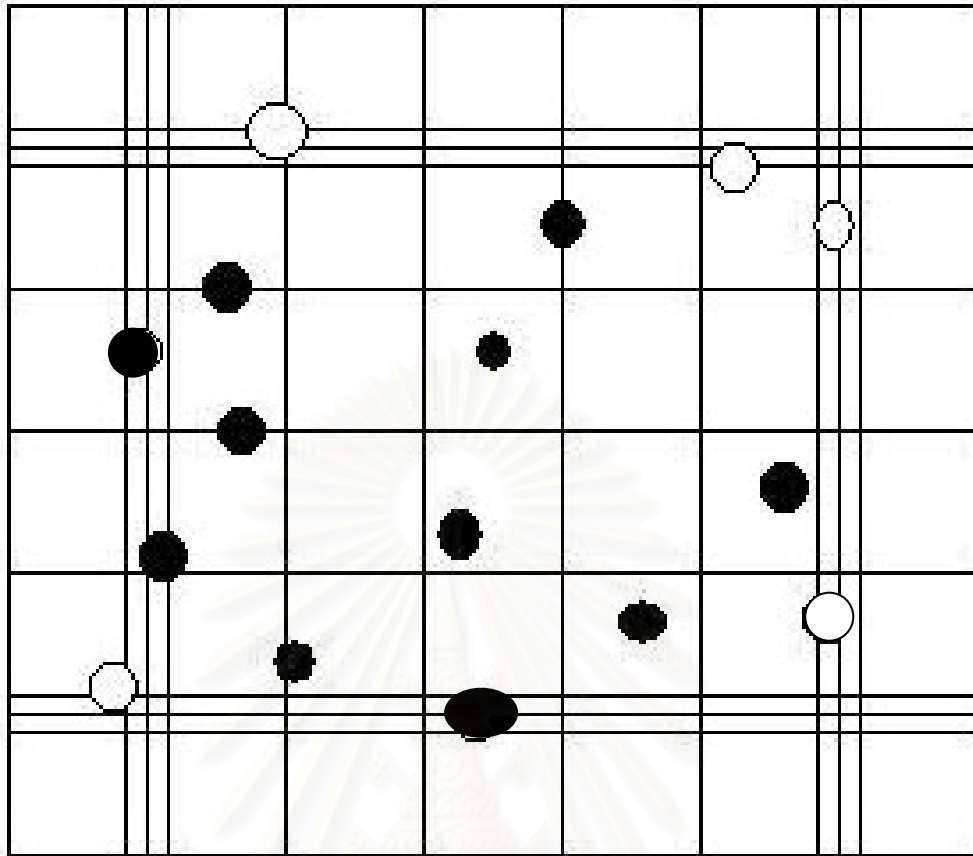


Figure 3.4 Counting cell density

Count the cells in the square and those which touch the top and left border (●) do not count the ones touching the right and lower border (○)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CHAPTER 4

## RESULTS AND DISCUSSION

### 4.1 Cultivation of *H. pluvialis* in airlift photobioreactors

The cultivation of *H. pluvialis* for astaxanthin production was achieved in two growth stages. The first stage is the growth phase which aimed at the production of high cell density without the synthesis of the required product astaxanthin. Cell growth in this stage is called vegetative cells. Astaxanthin only accumulates during the second stage or the process of transformation of green vegetative cells to cyst (aplanospore stage). In the following discussion, each of the cultivation stage will be discussed in detail.

#### 4.1.1 Effect of medium concentration on the cultivation in 3L airlift system

The medium is always important for an effective cultivation of micro-organisms. Specifically, this section was set out to investigate whether there were differences in using the various concentration of culture medium in growing *H. pluvialis*. Figure 4.1 shows the Growth curves of *H. pluvialis* in 3L airlift photobioreactor containing F1 medium at its original concentration (1x) and half strength medium (0.5x) and double strength medium (2x) under the illumination at  $20 \mu\text{molphoton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  with fluorescent lamps at superficial gas velocity of  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$ . The pH of this experiment was controlled at 7 by the addition of 1%CO<sub>2</sub>. The maximum cell densities obtained from the cultivation at 0.5x, 1x, and 2x of F1 medium were  $35 \times 10^4$ ,  $41 \times 10^4$ , and  $39 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup>, respectively. The number of green vegetative cells started to decrease after around 8 days at which the experiments were ceased.

The results suggested that, in the low range of nutrient concentration, the cell growth of *Haematococcus pluvialis* depended on the concentration of the medium, and an increase of the medium concentration from 0.5x to 1x resulted in an increase in the specific growth rate (as seen in Figure 4.1 (b)). However, a further increase in nutrient concentration from 1x to 2x did not have significant effect on the specific

growth rate which indicated that the growth no longer depended on the cell concentration. This type of growth kinetics agreed well with the well known Monod kinetics.

However, it was observed that cell growth ceased after 8 days of cultivation, and the maximum cell attained from these systems was around  $35\text{-}41 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ . This was slightly lower than the maximum cell density obtained from the work of Kaewpintong (2004) who achieved the level of  $55 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  (also after 8 days of operation). It could be that cells at this density started to exhibit shading effect where the light penetration was reduced greatly by the dense cell culture. At this stage, the morphology change from vegetative to non-motile cells started to appear.

Alternatively, it was also possible that cells excreted some unwanted metabolite products which could inhibit the growth of the cells. Therefore, as the three systems were having similar levels of the cell at the end of Day 8, the level of excrete concentration should be about the same and the effect of the cell growth started to be visible at about the same time period.

#### 4.1.2 Effect of light intensity in small and large scale systems

Light energy is essential for phototropic growth of algae, which is a particular concern for industrial applications. The exposure of the cells to inadequate or excessive light often leads to a decline of algal growth rates. On the other hand, the mutual shading effect at high cell concentrations can cause a decrease in productivity even when the total light energy input is enough for the entire population inside the photobioreactors.

The experiment with light intensity was carried out in the batch cultivation mode using 3 L and 17 L airlift photobioreactors with  $A_d/A_r$  of 3.2 (in 3L) and 2.78 (in 17L) with superficial gas velocity of  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$  and pH of 7. Three different surface light intensities were tested and the results on growth profiles are shown in Figures 4.2 and 4.3.

In Figure 4.2, the optimal light intensity for the cultivation in the 3L airlift system was found to be  $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . This was exactly the intensity reported by Kaewpintong (2004) and indicated the repeatability of this cultivation system. The maximum cell density obtained after 8 days of cultivation was around  $41 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ . The cultivation in a large scale system showed a clear inferior performance, and Figure 4.3 demonstrates that the maximum cell density achievable in this system was only  $21 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ . However, the 17L airlift required a stronger light intensity and Figure 4.3 illustrates that the optimal light intensity for the cultivation in this system was about  $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . In large scale systems, the thickness of the reactor was larger than the small one and therefore it was possible that a stronger light intensity was required for an effective light penetration through the culture.

Figures 4.2 and 4.3 also show that there was a morphological change in the cell structure, i.e. from green vegetative to non-motile cells. This change occurred at all range of light intensity but became more significant at higher light intensity. For instance, in the 17L airlift system, the number of non-motile cells increased from  $2 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  to  $4 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  as the light intensity increased from 20 to  $40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Although this finding proved that astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* could be induced at high light intensity, this phenomenon was, in fact, not desired in the cultivation stage where the culture was targeted to grow as vegetative cells without the morphological changes.

#### 4.1.3 Effect of pH in large scale system

Chemical analysis showed that algal biomass consisted of 40-50% carbon. Hence, the growth rate of photoautotrophic cultures essentially depended on a sufficient supply of carbon source for photosynthesis. Several studies have recently been conducted to increase the growth rate of *H. pluvialis*, and reported that this alga could grow mixotrophically as well as photoautotrophically. For the autotrophic culture,  $\text{CO}_2$  was proven to be a good carbon source [Kaewpintong et al., 2006]. Although the heterotrophic culture of this alga is also possible, its growth rate was proven too slow for its culture to be applied to commercial production. There were evidences that the specific growth rate of vegetative cells under heterotrophic

condition was considerably lower than that obtained under photoautotrophic condition ( $0.22 \text{ d}^{-1}$  compared to  $3.2 \text{ d}^{-1}$ ) [Kobayashi et al., 1991]. In addition, contamination problems could also be important issue for the heterotrophic culture.

Adding  $\text{CO}_2$  into the culture is one of the possible methods for enhancing the inorganic carbon source for the cell. However, such method affected the pH of the culture and could therefore affect the cell growth. Therefore the effect of pH was directly related to the availability of carbon source in the system. In this work, *H. pluvialis* was grown in photoautotrophic condition with  $\text{CO}_2$  as the main carbon source. To investigate the effect of pH on the algal growth, experiment were performed in 3 and 17 L airlift photobioreactors, where pH was controlled by controlling the addition of  $\text{CO}_2$  into the air stream supplied to the bottom of the system. Both airlift photobioreactors were operated with superficial gas velocities of  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$  and illuminated at  $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

The results in Figures 4.4 and 4.5 showed that the maximum cell density of airlift photobioreactors (3 L and 17 L, respectively) were  $41$  and  $16 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ , respectively, and these were obtained at the pH of 7. Both cell concentration and specific growth rate decreased with pH which indicated that *Haematococcus pluvialis* grew best at pH = 7.

#### 4.1.4 Effect of aeration in large scale system

During the vegetative growth stage of *H. pluvialis*, cells have two flagella and can move around by themselves. Hence, even though there was no mixing provided, the cells should be able to move around by themselves to the location suitable for their growth (perhaps in the region of high light and nutrient concentration). This is why it was important to initially check whether the mixing is beneficial for the growth of such microorganism. The experiment was performed in the 3 and 17 L airlift photobioreactors illuminated at  $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  with pH = 7.

Figures 4.6 and 4.7 illustrate the growth of *H. pluvialis* in the two airlift photobioreactors running at different levels of aeration rate (which was measured in terms of superficial gas velocity). The 3 L airlift could achieve a higher cell density ( $41 \times 10^4$



cell  $\text{mL}^{-1}$ ) and a higher specific growth rate ( $0.38 \text{ d}^{-1}$ ) than those from the 17 L (max. cell density =  $15.87 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  and specific growth rate =  $0.28 \text{ d}^{-1}$ ). It was observed clearly that the optimal aeration rates for the 3L and 17L were quite different but the effect of aeration rate for both system exhibited similar trend. There seemed to exist optimal aeration rate for the growth, below and above which the cell growth declined. For the 3L system, the optimal was at  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$  whereas for the 17L, the optimal was  $1 \text{ cm s}^{-1}$ . A low aeration rate did not provide enough circulation for the cell and this was proven to be inadequate for the growth of the cell. Kaewpintong (2004) proved that the growth in the the system without aeration was much slower than that with aeration. On the other hand, a much too high aeration rate did not show benefits for the growth. Although an increase in aeration rate gave rise to the mass transfer which facilitated the removal of gases such as oxygen, preventing the accumulation of such gas, which might cause adverse effect on the growth, growth seemed to be drastically slowed down by excessive aeration. This might be due to the shear force which was induced at high aeration. This indicated that the cell of *H. pluvialis* was highly shear sensitive and even the shear caused by aeration could deteriorate the growth. This explanation was supported by several past reports. For instance, Gudin and Chaumont (1991) stated that the key problem in the cultivation of microalgae in photobioreactors was cell damage due to shear stress. Hata et al. (2001) illustrated that the culture of green vegetative cell in exponential phase of growth required a low liquid velocity due to its fragility.

For the large scale system (17L), the optimal superficial velocity was higher than that in the 3L. From visual observation, the circulation in the 3L was much better than that in the 17L at the same aeration level. Therefore it was necessary for the 17L system to be operated at higher aeration rate to ensure that adequate mixing was provided for cell circulation.

#### 4.1.5 Comparison between overall performance of 17L and 3L airlift

Few studies have, however, considered the practical aspects concerning with the scale-up of the bioreactor to cultivate microalga such as *H. pluvialis*. Recently, Kaewpintong [2004] studied the effects of the configurations and operating variables on the cultivation of vegetative cells *H. pluvialis* in a small scale airlift

photobioreactor, and demonstrated that high productivity of semi-continuous culture could be achieved. There was therefore a clear need for the investigation on the up-scale of such culture.

In this experiment, the cultivations of *H. pluvialis* in 3 and 17 L of airlift bioreactor are shown in Figure 4.8 were investigated using the optimal conditions as found from the previous experiments as described above, i.e. for the 3L airlift: superficial gas velocity =  $0.4 \text{ cm s}^{-1}$ , light intensity =  $20 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , for the 17L airlift, superficial gas velocity =  $1 \text{ cm s}^{-1}$ , light intensity =  $30 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , both at pH = 7. Figure 4.9 shows the comparison between the performance of these two systems which illustrated that the cell density of *H. pluvialis* in 3 L airlift bioreactor ( $41 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ ) was better than that in 17 L airlift bioreactor ( $21 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ ). It was clear that the requirements for both aeration and light intensity were higher in the 17 L than in the 3 L airlift bioreactors. This could be due to several reasons, one of which was that the circulation in the larger airlift had to be maintained using higher flow than in the smaller system. Also in the large scale system, the flow of liquid could be subject to internal circulation, particularly in the riser section [Wongsuchoto and Pavasant, 2004], and therefore cell circulation was partially suppressed with this effect. Hence, a higher level of aeration was required to overcome this problem. A higher light intensity was also required for the larger system, this was to make sure that light penetration was at the same level as the smaller ones.

In addition, a major problem encountered when operating this large system is the contamination of the airlift bioreactor by bacteria, fungi and other faster growing algae, as well as protozoan predators which have been reported to eliminate 90% of the algal biomass within 72 h [Spencer, 1989].

#### 4.1.6 Semi-continuous culture of *H.pluvialis* in airlift bioreactor photobioreactors

Semi-continuous cultivation was conducted in order to examine the potential of having a large-scale culture system that could operate economically. This cultivation of *H.pluvialis* in 3 and 17 L airlift photobioreactor were carried out under

the most suitable conditions obtained from the aforementioned experiments, i.e.  $A_d/A_r = 3.2$ ,  $u_{sg} = 0.4 \text{ cm s}^{-1}$ , light intensity =  $20 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pH = 7 (Fig. 4.10) and  $A_d/A_r = 2.78$ ,  $u_{sg} = 1 \text{ cm s}^{-1}$ , light intensity =  $30 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pH = 7 (Fig. 4.11), respectively. In the batch culture, the cell density was allowed to increase until it reached a maximum of  $21 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$  and  $41 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$  in 3 and 17 L airlift photobioreactor, which occurred at about days 6–8 of cultivation. For the semi-continuous culture, the cultivation of 3 and 17 L airlift photobioreactor were started as a batch culture with the initial cell density of  $2 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ . The cell was grown in the system until it reached the exponential growth phase after which the volume of culture broth was replaced with a fresh culture medium to initial cell density. The harvest cell density of 3 and 17 L airlift photobioreactor were approximately  $10 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$  and  $35 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ , respectively. It was proven that with this harvesting cycle, the cell could maintain its vegetative form and in each 4 day cycle, cell density increased up to the level obtained in the previous cycle. The productivity of semi-continuous culture in 3 and 17 L airlift photobioreactor were  $5.25 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$  and  $5.25 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectively. This result was comparable to that reported by Hata et al. (2001) who successfully achieved the semi-continuous culture, but only in the small scale (in 500 mL Erlenmeyer flask) with a productivity of  $6.8 \text{ cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

## 4.2 Preliminary examination of astaxanthin production

Several environmental stress conditions have been demonstrated to induce astaxanthin accumulation, among the most frequently used were: high irradiance, nutrient deficiency, high salinity, and high temperature [Kobayashi et al. 1992a, Tjahjono et al. 1994, Harker et al. 1996a, Boussiba 1991, Sarada et al. 2002]. This section intended to provide preliminary results on the stimulation of astaxanthin by changing two environmental factors, i.e. light intensity and salinity for *H. pluvialis* cultivated in the airlift systems as described in Section 4.1. In this Section, figure 4.12 is shown the 17 L raceway pond with 4 impellers (60 rpm) was used to cultivate *H. pluvialis* to induce astaxanthin. Vegetative cells of *H. pluvialis* were firstly prepared and as the cells entered their stationary phase (often at Day 9 in the airlift photobioreactor), they were transferred into the raceway pond which was prepared to

operate at different inducing conditions as described below.

#### 4.2.1 Effect of light intensity on astaxanthin production

The ability to accumulate astaxanthin in *H. pluvialis* is an adaptation to habitats with strong radiation [Hagen et al. 1994] along with the formation of cysts having rigid cell walls [Montsant et al. 2001, Hagen et al. 2002]. In most studies, light was required continuously to sustain the production of astaxanthin, although in a few cases it was reported to also accumulate in the dark, but at a much lower rate [Droop 1955, Kobayashi et al. 1997].

In the first experiment, the effect of light intensity on the astaxanthin production was tested. In this part, the harvest culture from the 17 L airlift photobioreactor was transferred to the raceway pond illuminated with light intensity of 35-60  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The results of cell densities are shown in Figure 4.13. Note that the cell culture was from the 17L airlift system running at the light intensity of 20  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and superficial gas velocity of 0.4  $\text{cm s}^{-1}$  and pH = 7 where the maximum cell density was only around  $12 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ . Three types of cells were found to exist in the raceway pond at different time period. During the first 4 days, the vegetative started to transform into the non-motile or immature cyst, and after 4 days, the vegetative cell disappeared whereas the number of immature cyst became larger. As soon as the green motile cells disappeared, the cyst started to appear. The number of cyst increased from Day 3 towards the end of the experiment whilst the number of immature cyst declined after reaching its highest level at around Days 5 or 6. These results agreed with that of Harker et.al (1996a) i.e. light of one of the most important factors for astaxanthin formation in *H. pluvialis* as cells responded to stress with high light intensity by generating astaxanthin.

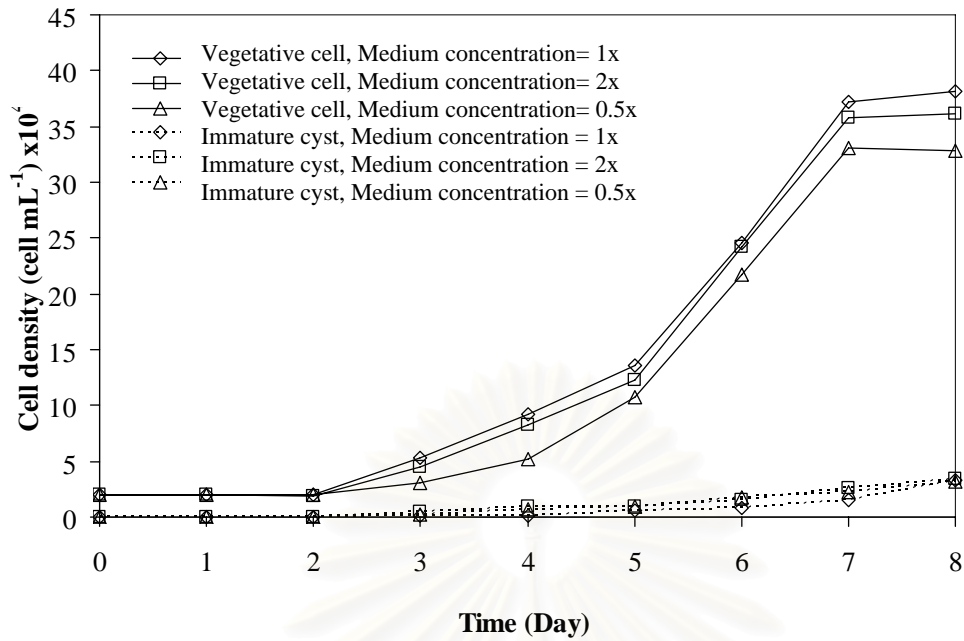
#### 4.2.2 Effect of salt in astaxanthin production

The second parameter of concern for the induction of astaxanthin from *H. pluvialis* was the salt stress [Cordero et.al, 1996]. Again, the cell culture was obtained from the cultivation in the 17L airlift system, however, running at 0.4  $\text{cm s}^{-1}$  of

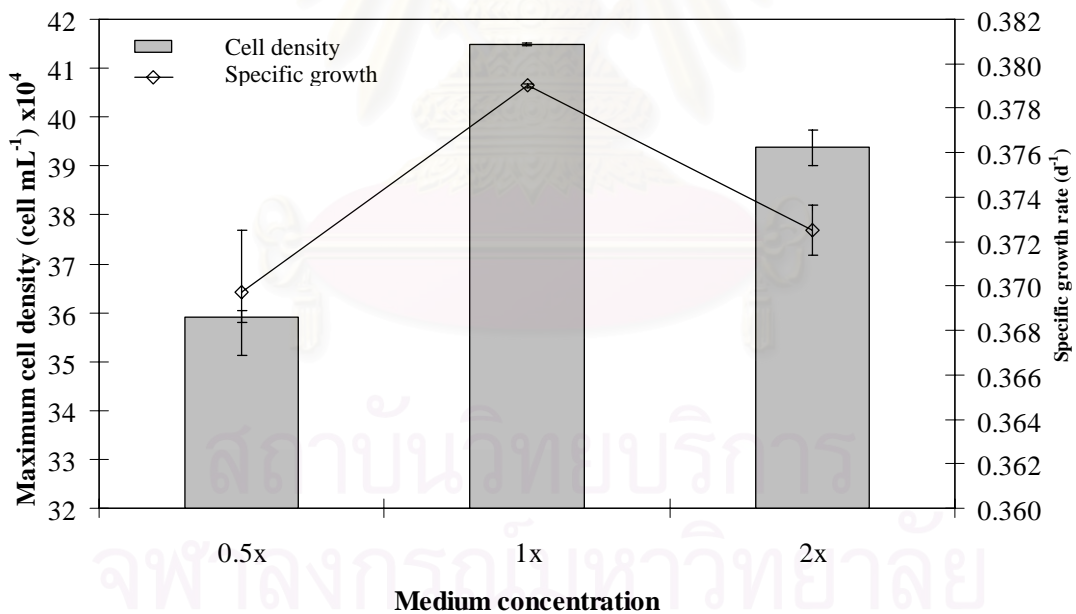
superficial velocity and light intensity of  $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The raceway pond was illuminated, this time, with light intensity of  $35 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . To clarify the effect of salinity on induction of astaxanthin, *H. pluvialis* was cultivated in medium mixed with 1%, 2% and 3% by weight of salt in the culture medium. The results of cell densities were shown in Figure 4.14. A similar result with the effect of light intensity was found here where the green motile cells started to decline during the first 4-5 days of cultivation. During this time, the non-motile or immature cyst began to form. After Day 5, the non-motile cells started to change form to cyst. It took about 8-9 days for the induction process to complete. However, in all cases, the cell densities were not drastically influenced by the salt. Hence, it might be concluded that the effect of salinity in this range could be neglected.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



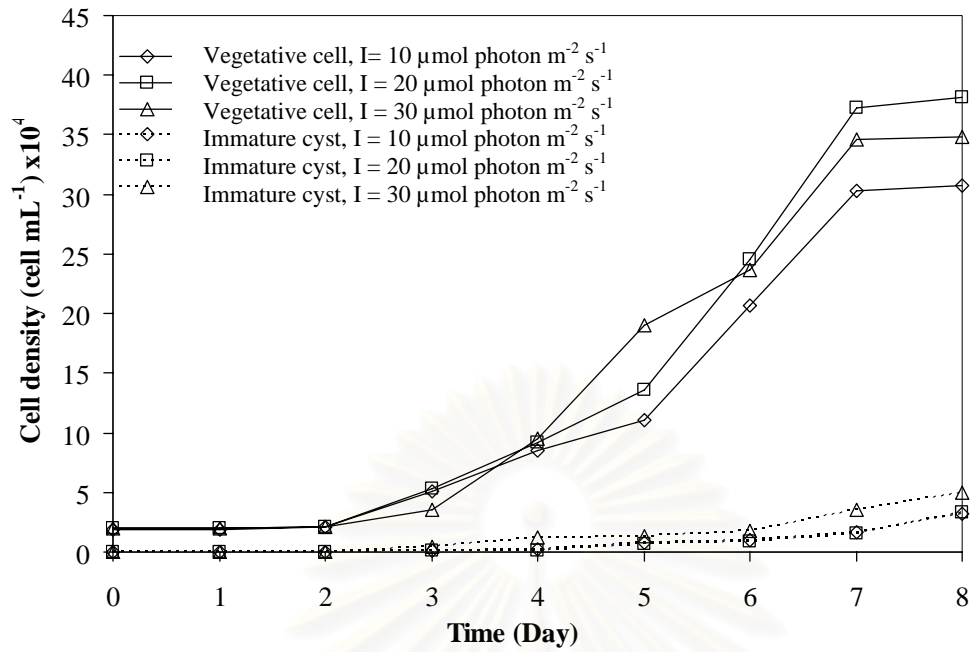
(a) cell density growth curve



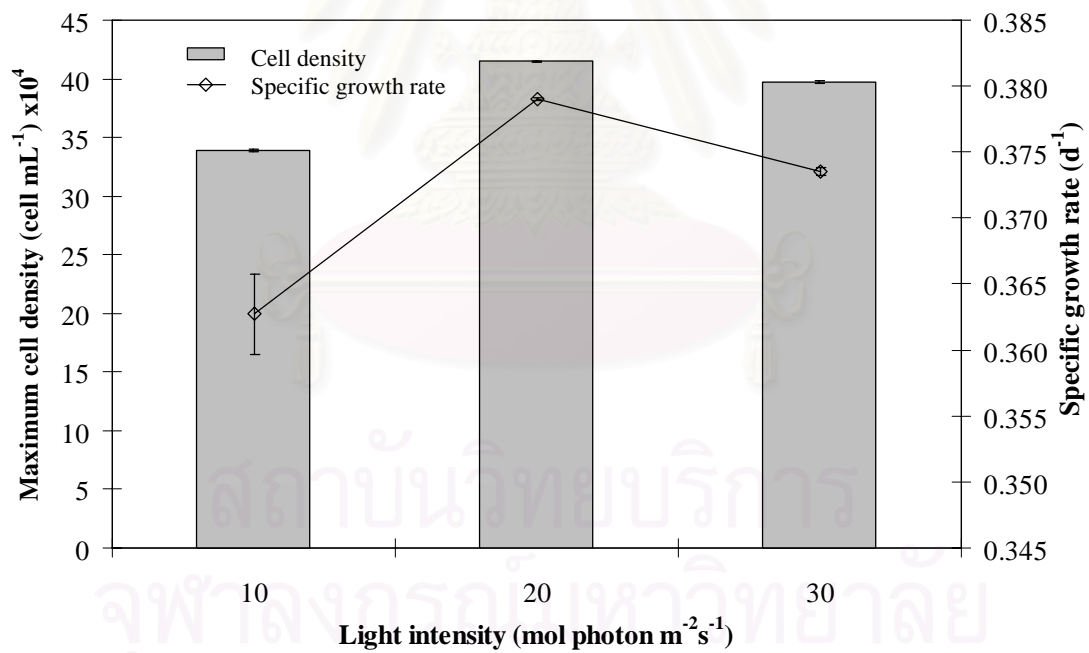
(b) maximum cell density and specific growth rate

Figure 4.1 Effect of medium concentration on cell density of *H. pluvialis* in 3 L airlift photobioreactor





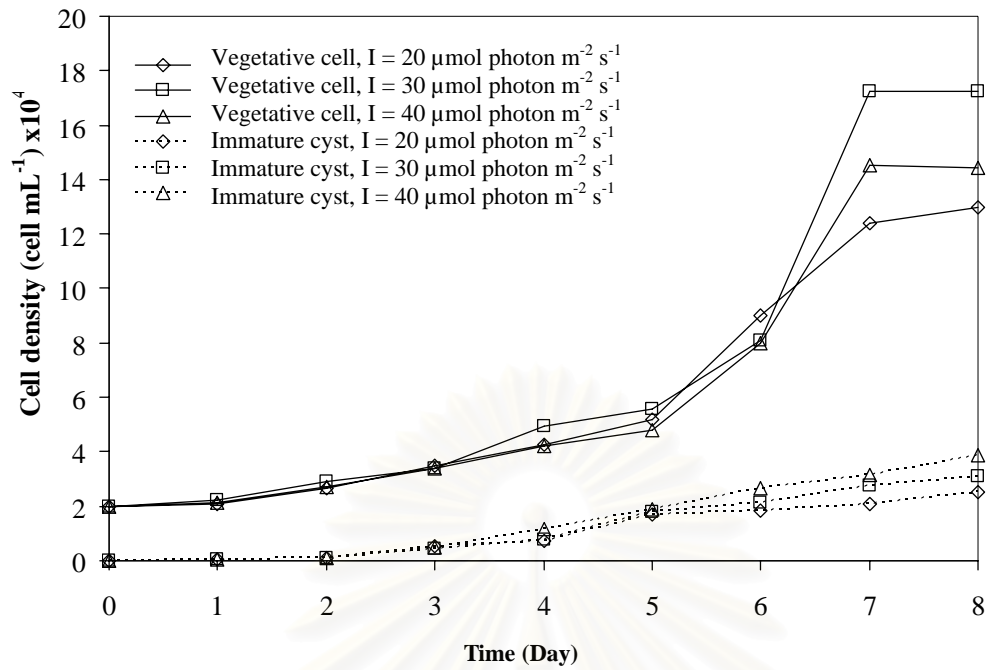
(a) cell density growth curve



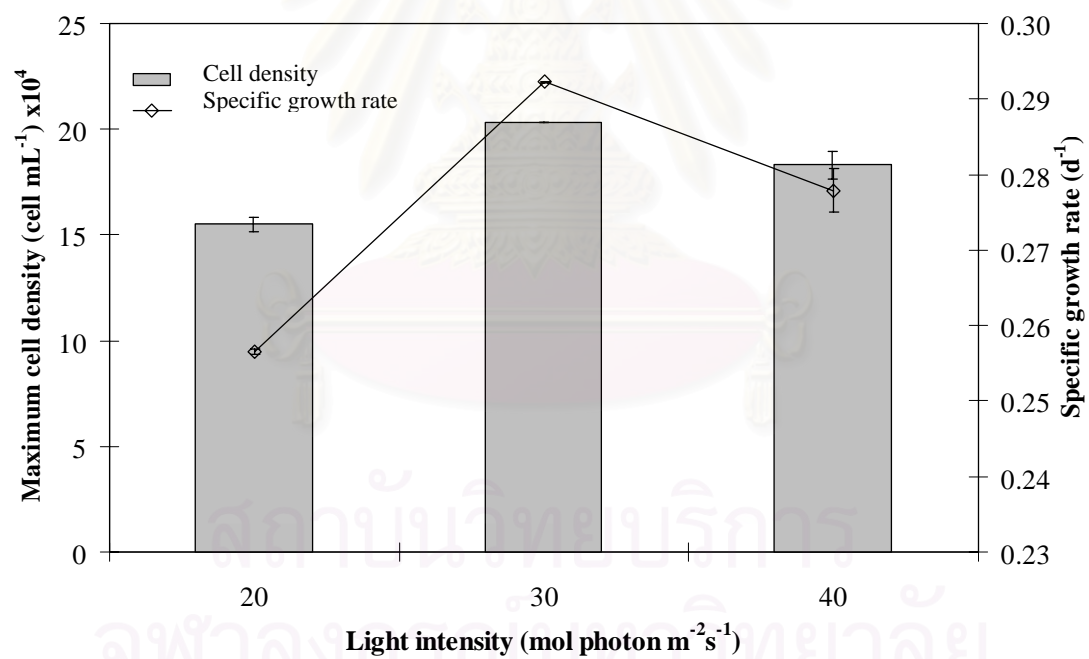
(b) maximum cell density and specific growth rate

Figure 4.2 Effect of light intensity on cell density of *H. pluvialis* in 3 L airlift photo-Bioreactor



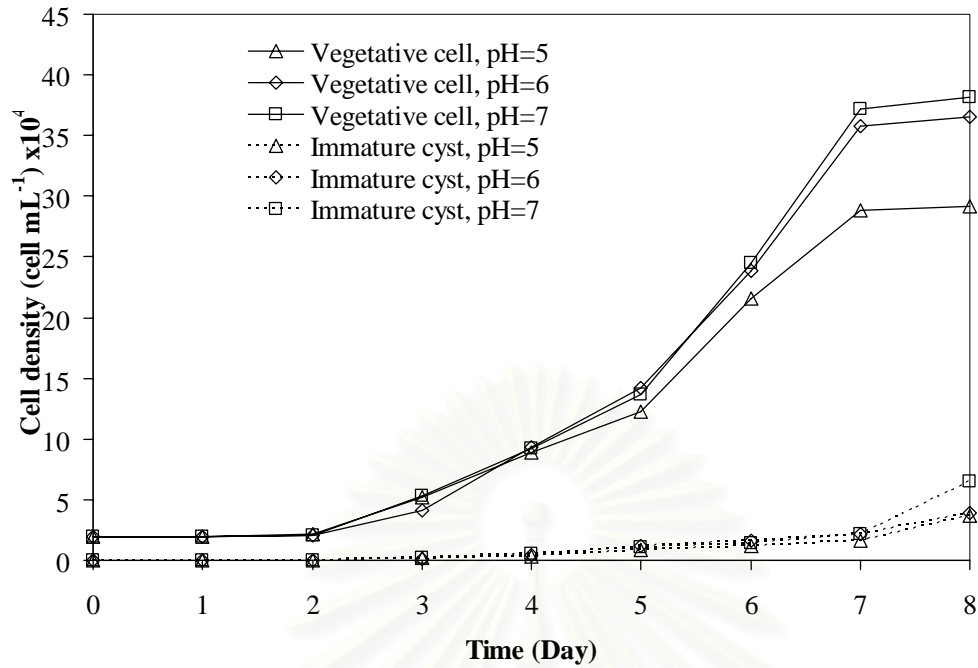


(a) cell density growth curve

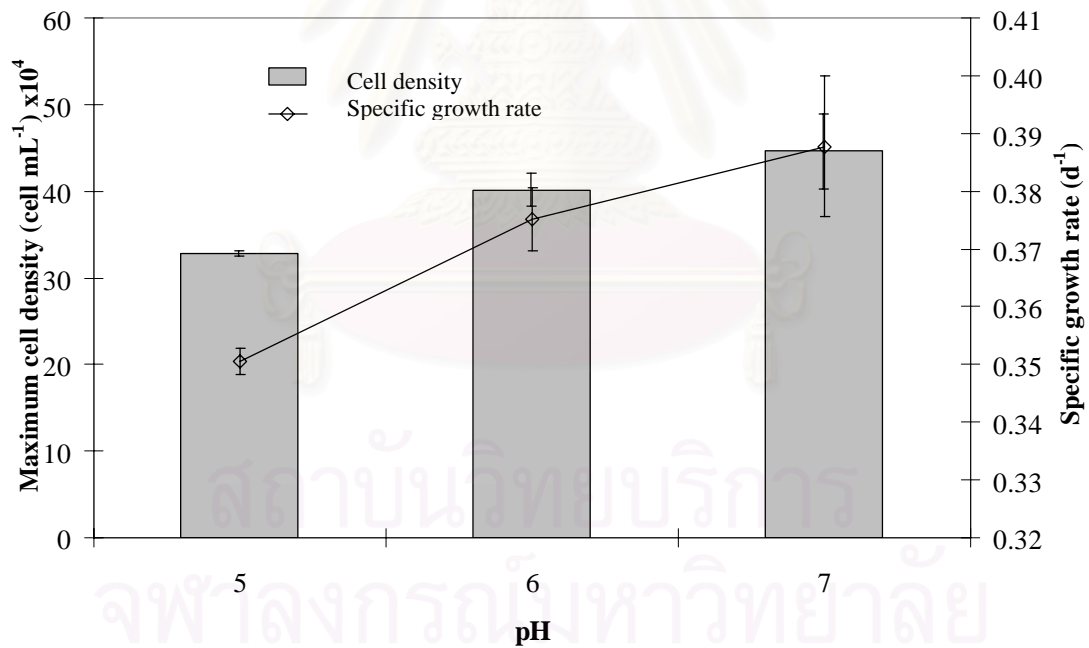


(b) maximum cell density and specific growth rate

Figure 4.3 Effect of light intensity on cell density of *H. pluvialis* in 17 L airlift photo-Bioreactor

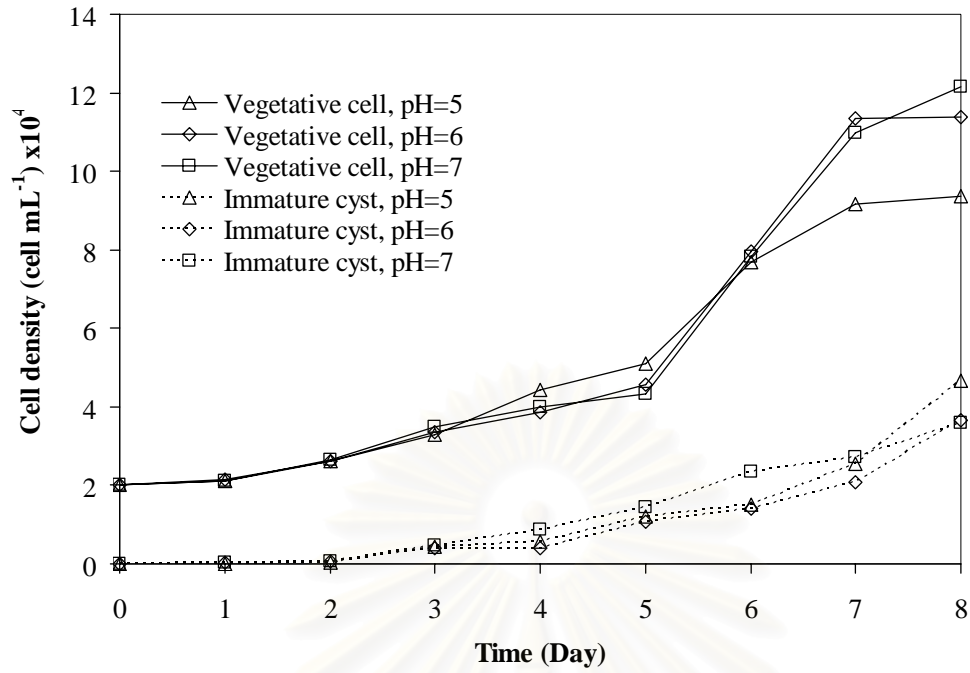


(a) cell density growth curve

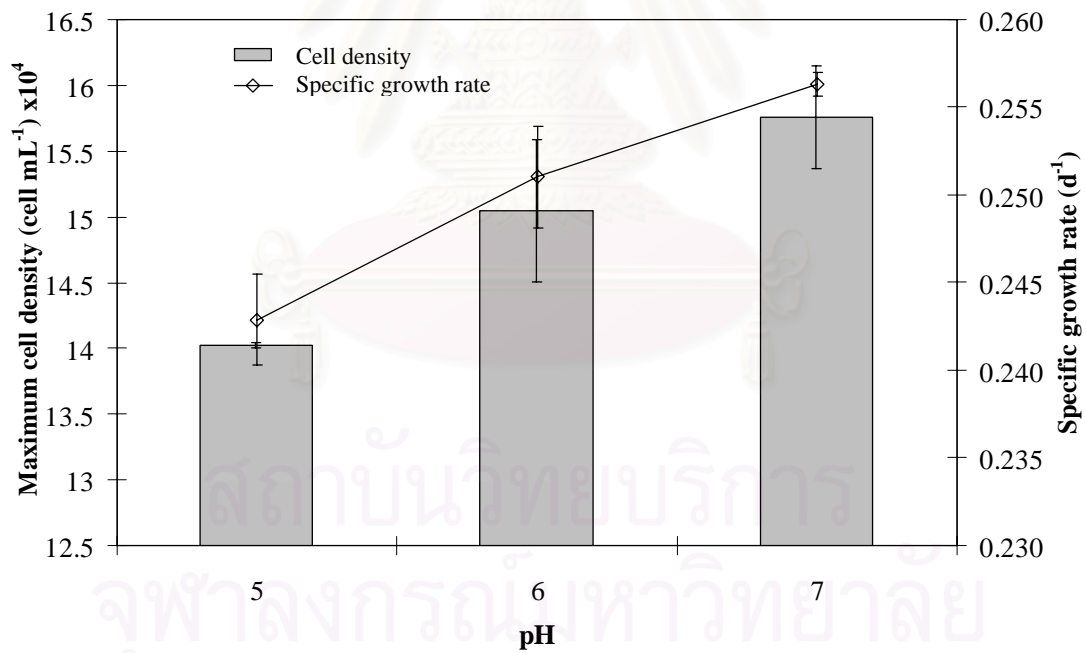


(b) maximum cell density and specific growth rate

Figure 4.4 Effect of pH on cell density of *H. pluvialis* in 3 L airlift photo-Bioreactor

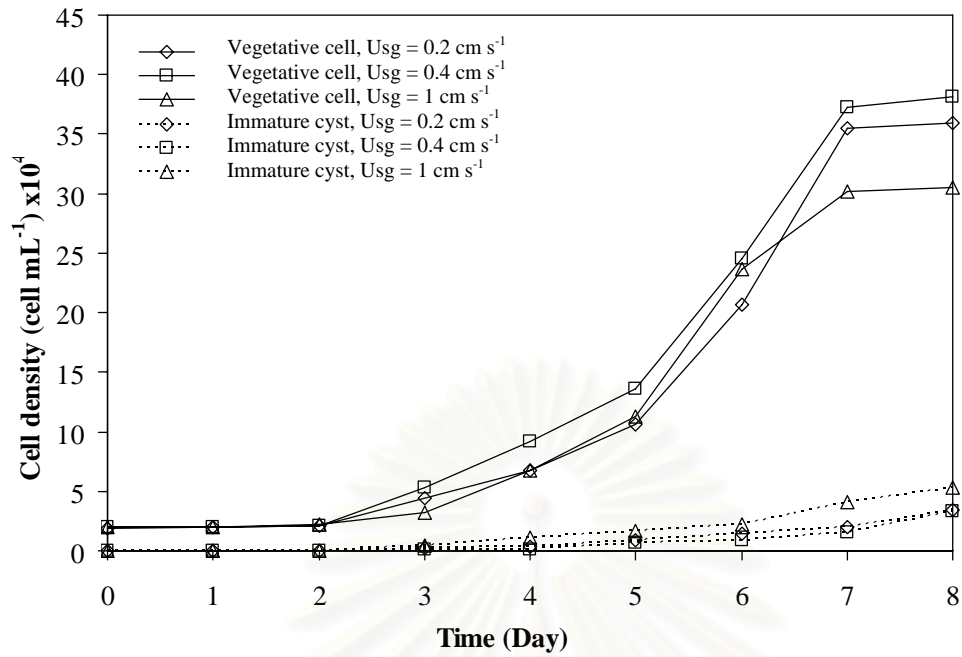


(a) cell density growth curve

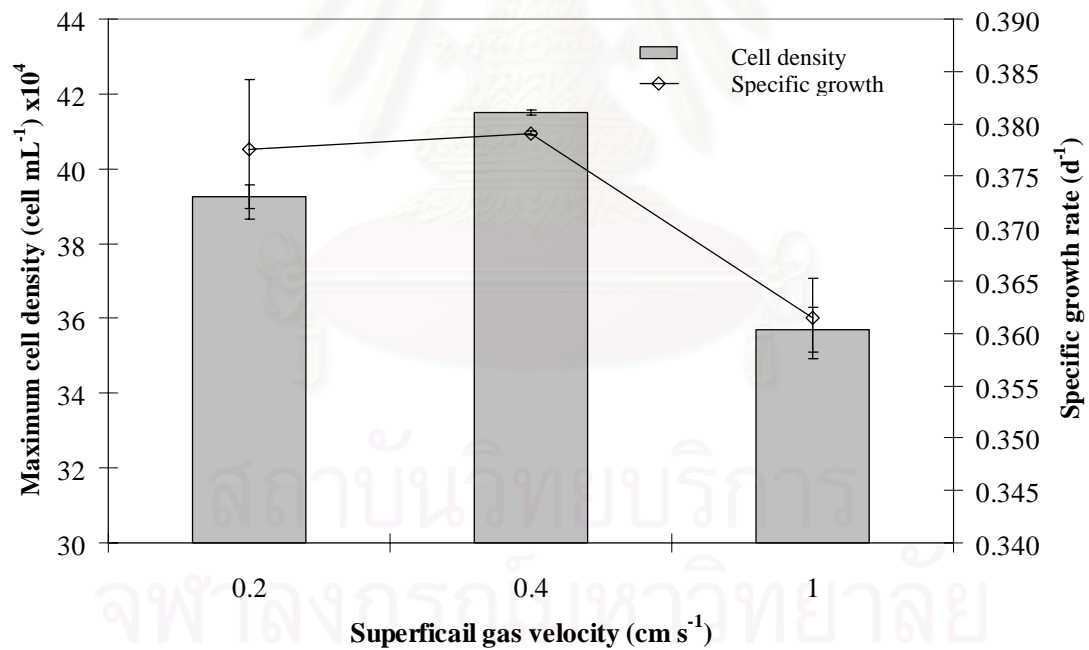


(b) maximum cell density and specific growth rate

Figure 4.5 Effect of pH on cell density of *H. pluvialis* in 17 L airlift photo-Bioreactor

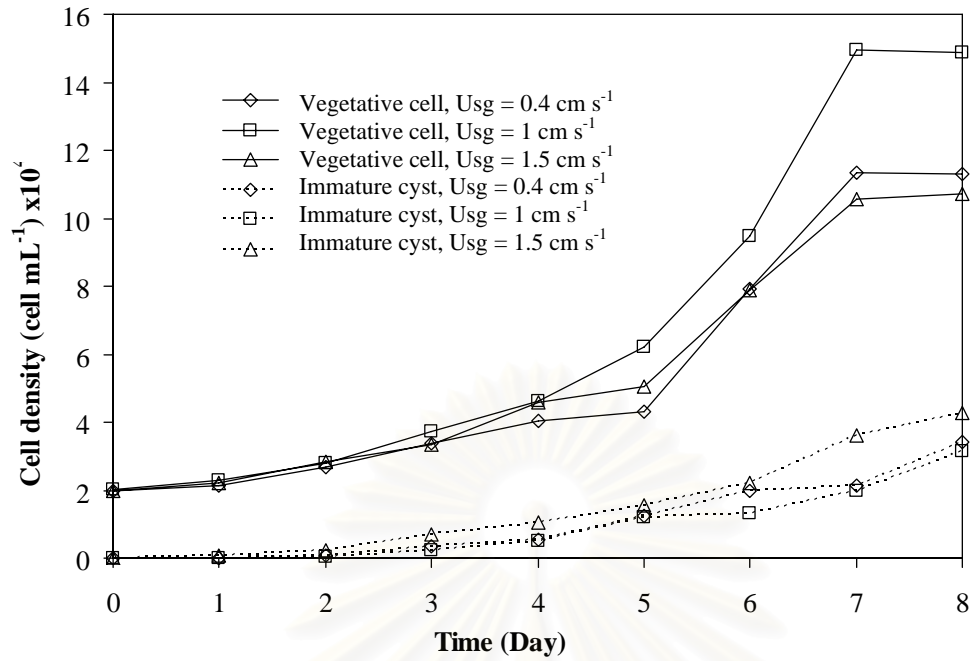


(a) cell density growth curve

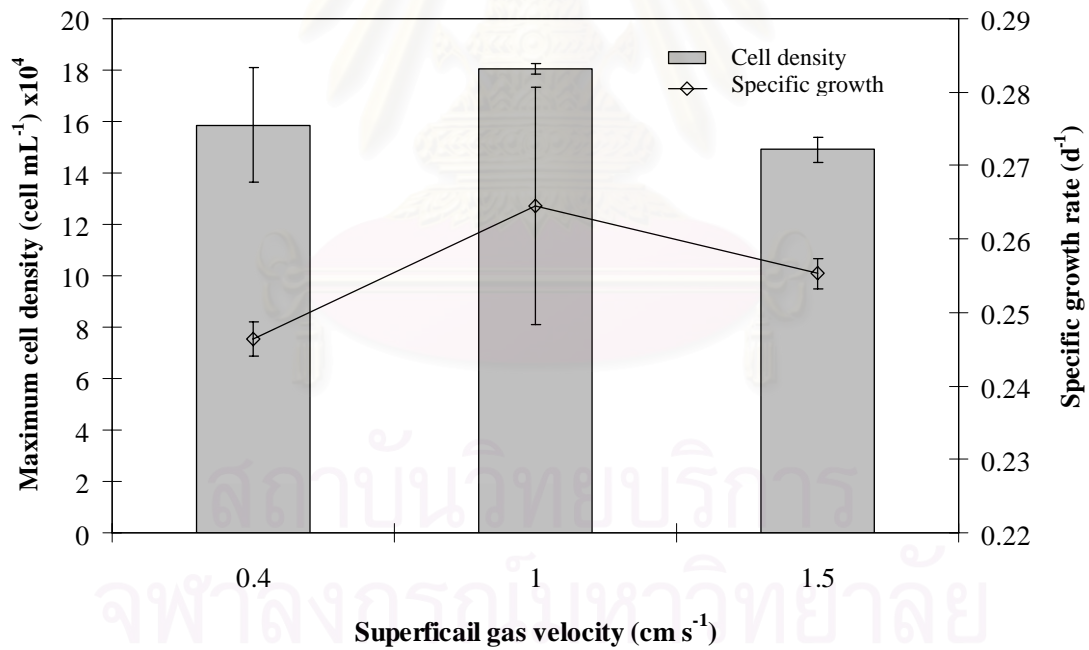


(b) maximum cell density and specific growth rate

Figure 4.6 Effect of aeration on cell density of *H. pluvialis* in 3 L airlift photo-Bioreactor

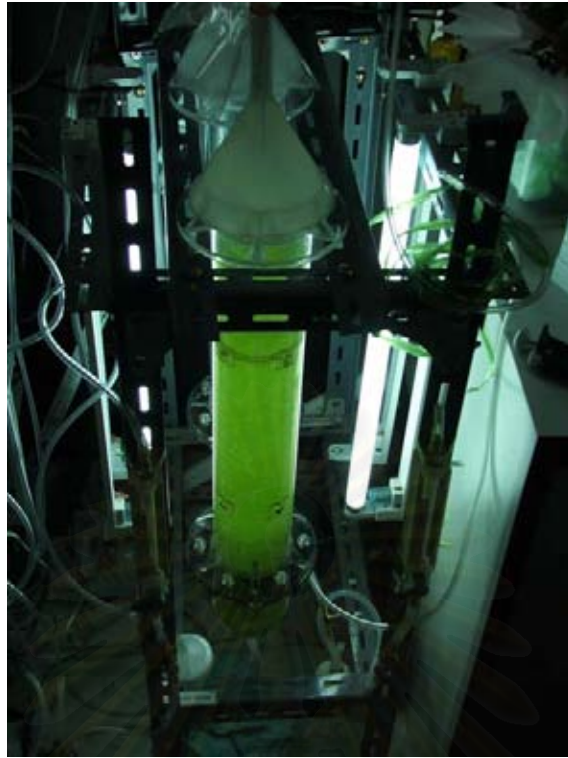


(a) cell density growth curve



(b) maximum cell density and specific growth rate

Figure 4.7 Effect of aeration on cell density of *H. pluvialis* in 17 L airlift photo-Bioreactor



3 L airlift photobioreactor



17 L airlift photobioreactor

Figure 4.8 Cultivation of *H.pluvialis* in 3 and 17 L of airlift photobioreactor: growth stage

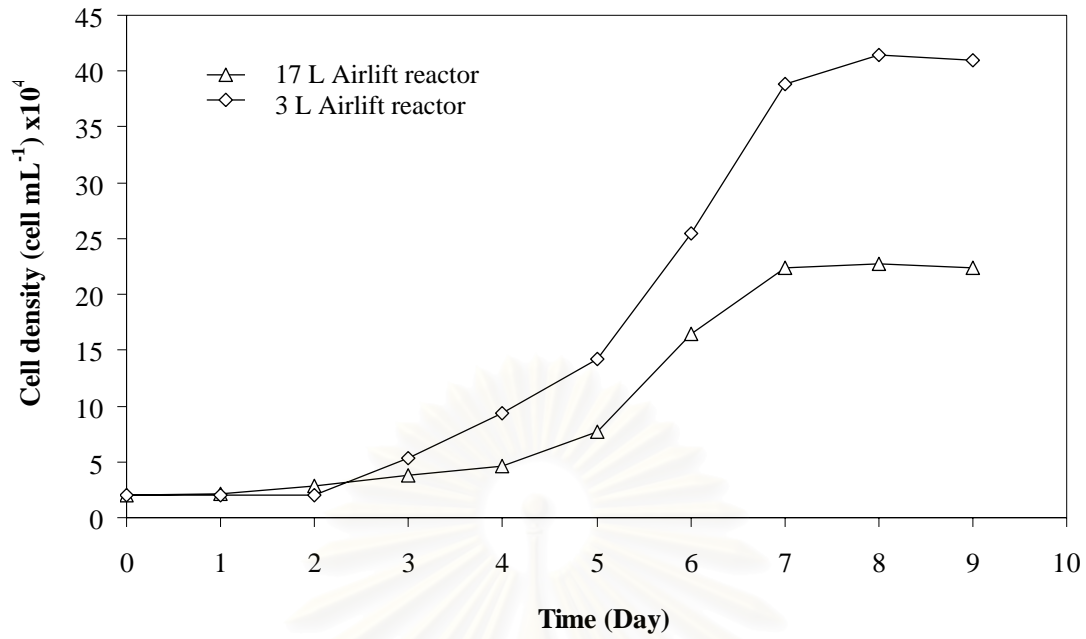


Figure 4.9 Cultivation of *H. pluvialis* in 3 L airlift photobioreactor at suitable condition:  $u_{sg} = 0.4 \text{ cm s}^{-1}$ , light intensity =  $20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pH = 7 and 17 L of airlift photobioreactor at suitable condition:  $u_{sg} = 1 \text{ cm s}^{-1}$ , light intensity =  $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pH = 7

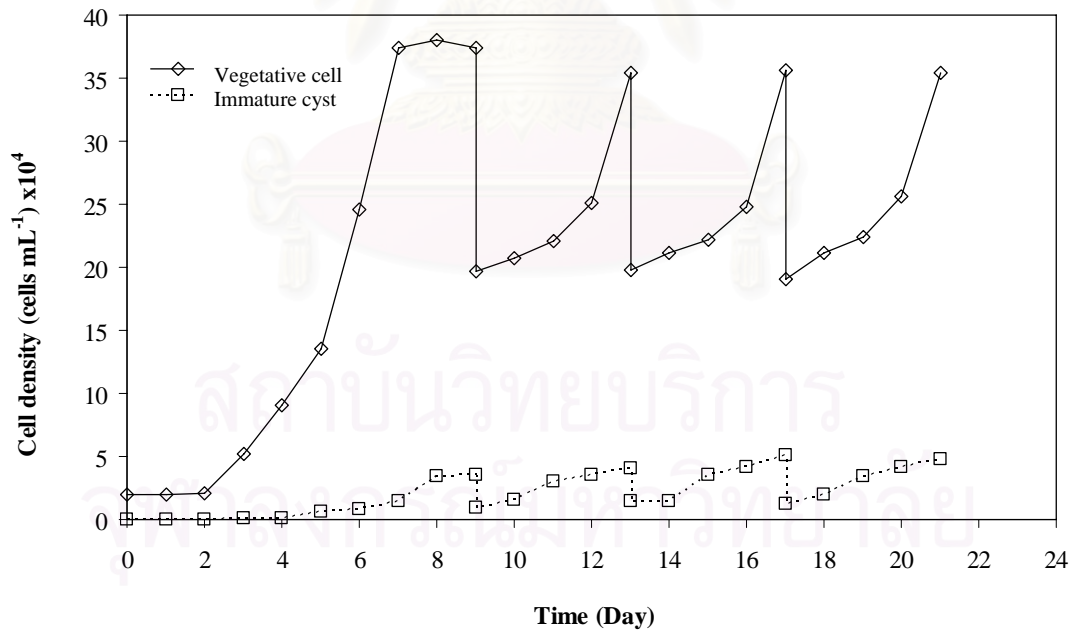


Figure 4.10 Cultivation of *H. pluvialis* in 3 L airlift photobioreactor under semi-continuous culture



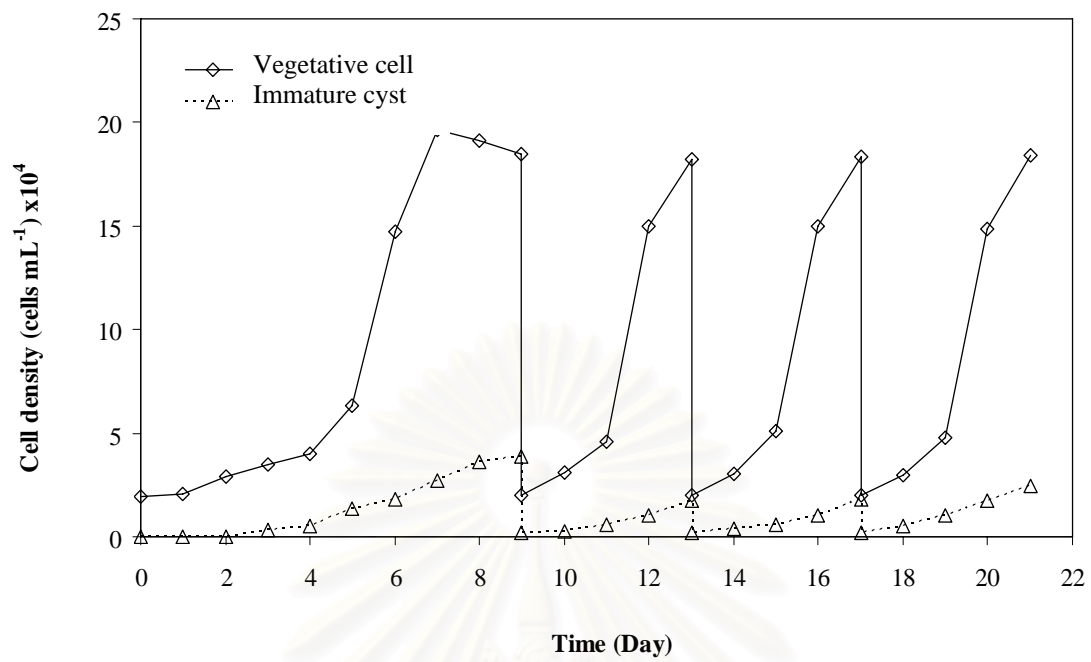


Figure 4.11 Cultivation of *H. pluvialis* in 17 L airlift photobioreactor under semi-continuous culture



Figure 4.12 Cultivation of *H. pluvialis* in raceway pond: induce astaxanthin stage

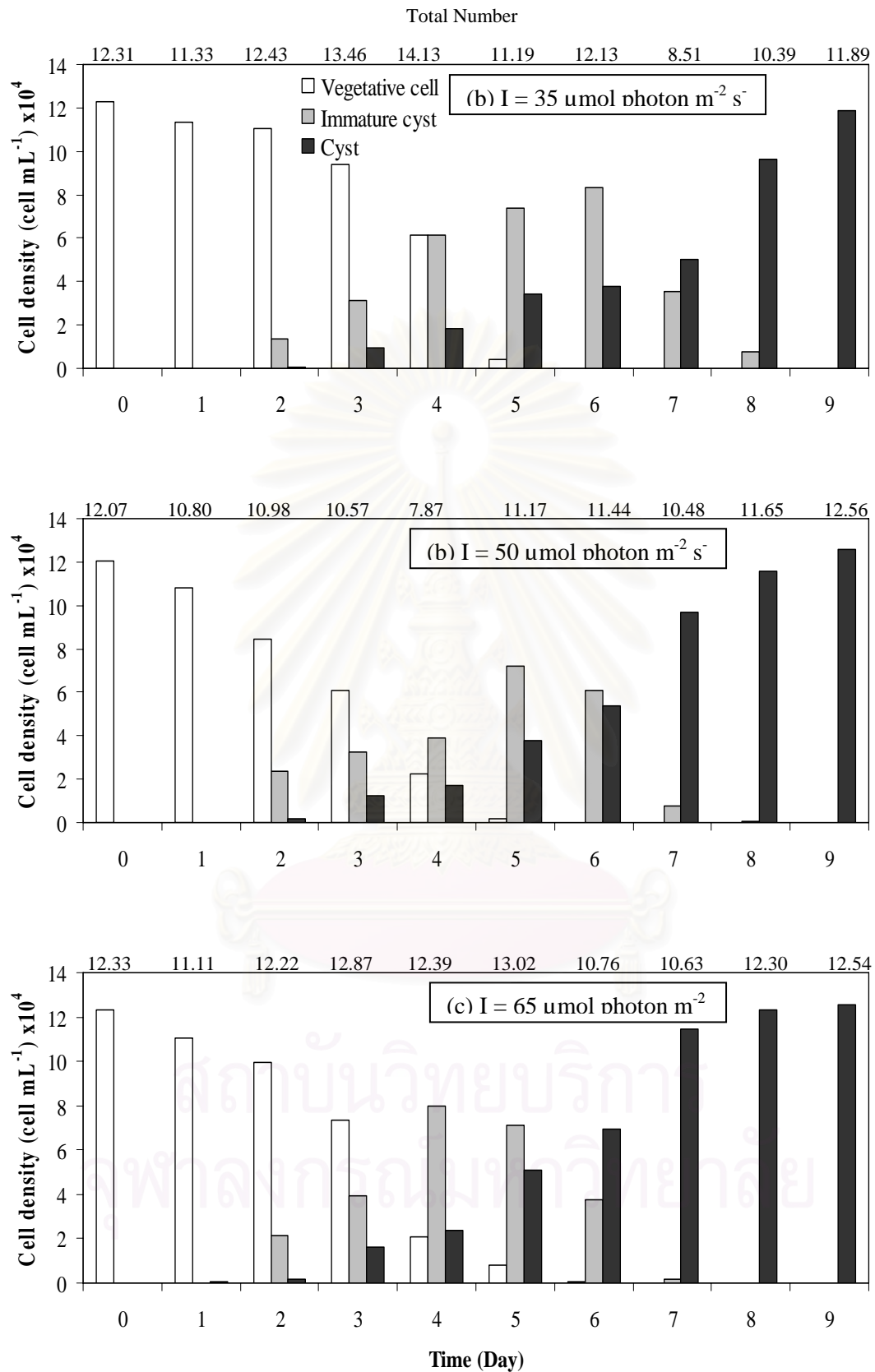


Figure 4.13 Effect of light intensity on cell density during astaxanthin accumulation stage

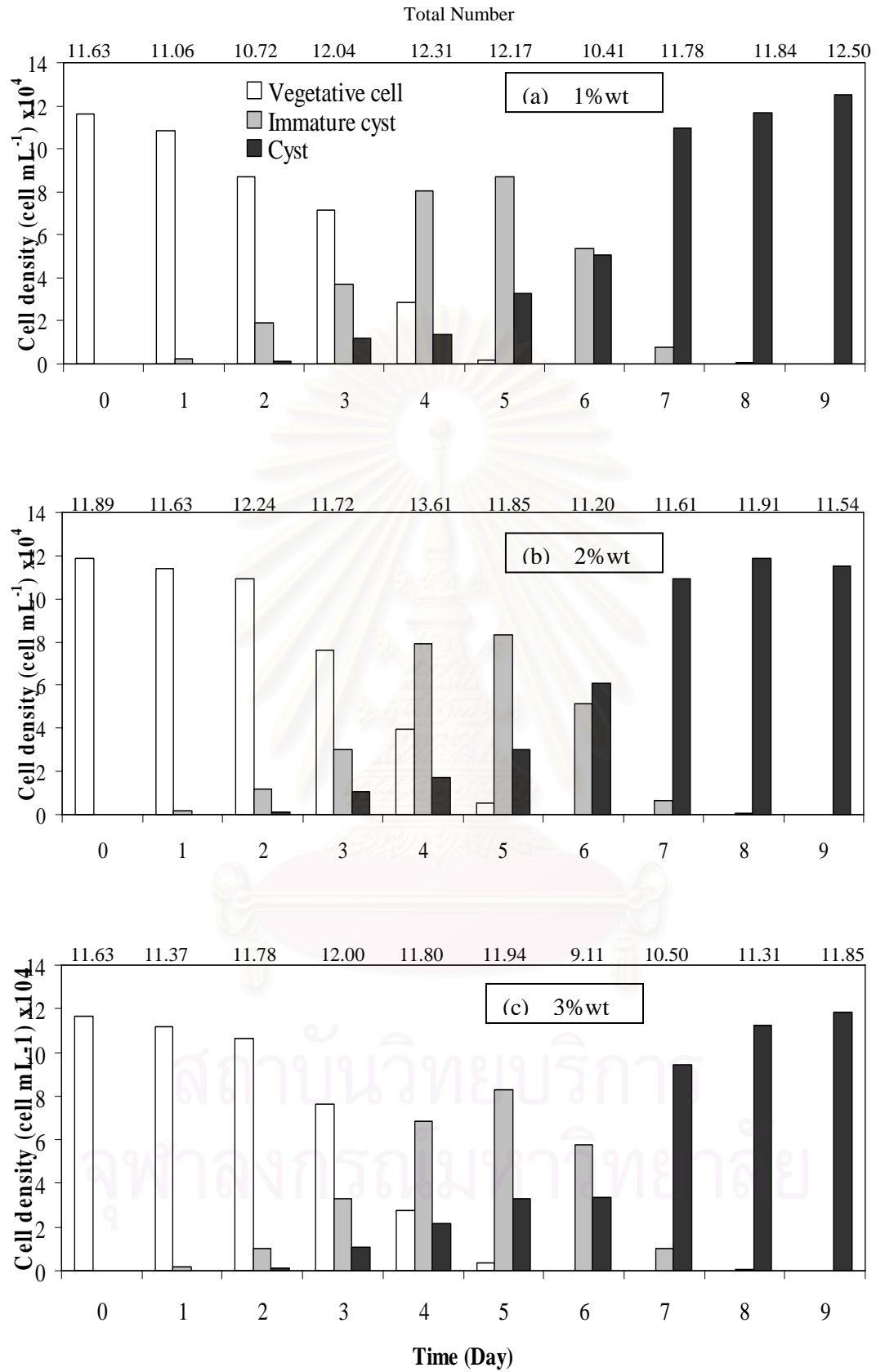


Figure 4.14 Effect of salinity on cell density during astaxanthin accumulation stage

# CHAPTER 5

## CONCLUSIONS AND RECOMMENDATION

### 5.1 Conclusions

Major findings from this work can be summarized as follows:

1. High cell density of *H. pluvialis* NIES-144 was accomplished by culturing cells in 3 L airlift photobioreactor. The cell density of up to  $41 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$  was obtained.
2. *H. pluvialis* cultured in large scale (17L) airlift photobioreactor and obtained  $21 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .
3. In 1x of F1 medium, the maximum cell concentration of *H. pluvialis* that cultured in airlift bioreactor was higher than that in 0.5x and 2x medium ( $41 \times 10^4$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ,  $35 \times 10^4$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ,  $39 \times 10^4$  cell  $\text{mL}^{-1}$  respectively).
4. The suitable light intensity for the growth of *H. pluvialis* in 3 and 17 L of airlift photobioreactor were 20 and 30  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectively.
5. The cell concentration was decrease with pH decrease because at pH lower than 7 might not be the suitable condition to cultivated *H. pluvialis*.
6. Aeration in the airlift photobioreactor was crucial for a proper growth of the alga, but the aeration rate should be gentled, the most appropriate aeration velocities (superficial velocity) were found at lower limit of the pump which were 0.4 and 1  $\text{cms}^{-1}$  in 3 and 17 L of airlift photobioreactor, respectively.
7. The semi-continuous culture was successfully implemented where the harvest could be performed every 4 days with the productivity of  $2.5 \times 10^4$  cell  $\text{mL}^{-1} \text{day}^{-1}$ .

8. The raceway pond could be used for inducing astaxanthin accumulation of *H. pluvialis*. The accumulation of astaxanthin could be induced by increasing the light intensity and/or add salt in the raceway pond system.

## 5.2 Contributions

This work continued from the previous work of Kaewpintong (2004) who was among the first and deeply investigated the cultivation of *Haematococcus pluvialis* in the airlift photobioreactor. In the previous work, the success of using the 3L airlift photobioreactor was reported which opened up the research question as to whether this system could be cultivated in a larger scale system. This work demonstrated further that it was possible to design and scale up the airlift system for a semi-continuous production of *H. pluvialis*. However, it was evidenced in this work that, with the operating constraints employed in this work, the small airlift photobioreactors were preferable to the large airlift photobioreactors columns for the production of biomass. This is not uncommon for the design of reactors as small ones usually had better performance in terms of mixing and mass transfer than the larger scale systems. However, the large scale system could be still attractive as it was easier to operate particularly if ones wanted to mass-produce the cell culture product. Table 5.1 demonstrates that the productivity of the large scale system (17L) was only about half of the smaller one (3L). The maximum attainable productivity from this work was still lower than that from Kaewpintong (2004) although the cultivation system was similar. This could be due to the effects of other environmental conditions such as temperature and level of contamination. However, the level of productivity obtained from this work was still far lower than that obtained from Harker (1996a), and this is left as the future work.

The attempt to induce astaxanthin was also exercised in this work, but due to time constraint, this part was only included in smaller extent.

Table 5.1 Comparison between the cultivation of *Haematococcus pluvialis* in airlift photobioreactors

Reference	Volume of Airlift bioreactor (L)	Maximum cell density (cell mL <sup>-1</sup> )	Maximum Productivity (cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
This study	3	0.41 x 10 <sup>6</sup>	0.048 x 10 <sup>6</sup>
	17	0.21 x 10 <sup>6</sup>	0.023 x 10 <sup>6</sup>
Harker et al., 1996a	30	2.50 x 10 <sup>6</sup>	0.114 x 10 <sup>6</sup>
Kaewpintong, 2004	3	0.80 x 10 <sup>6</sup>	0.097 x 10 <sup>6</sup>

### 5.3 Recommendation

Due to a serious time constraint of the experiment work, several parameters could not be tested for their optimality in the cultivation of *H.pluvialis* . Therefore the following future works regarding the cultivation of the alga are recommended:

1. The interaction of nutrient and light intensity should be investigated in more detail. For instance, this is to make sure that the cells are not nutrient limited or controlled by light limitation.
2. The schedule for harvest in the semi-continuous culture should be determined to ensure the highest biomass productivity.
3. The upscale of the bioreactor should be investigated.



## REFERENCES

- Acien, F.G., Garcia, C.F., Sanchez, P.J.A., Fernandez, S.J.M., Molina, G.E. 1998. Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. Journal of Bioscience and Bioengineering 58:605–616.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. 1989. Industrial production: methods and economics. In: Cresswell, R.C., Rees, T.A.V., Shah, N. (Eds.), *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Longman Scientific 294–316.
- Borowitzka, L.J. 1991. Development of Western biotechnology algal beta-carotene plant. Bioresource Technology 38:251–252.
- Borowitzka, M.A. 1992. Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. Applied Phycology 4:267–279.
- Borowitzka, M.A. 1997. Algae for aquaculture: Opportunities and constraints. Applied Phycology 9:393-401.
- Bubrick, P. 1991. Production of astaxanthin from *Haematococcus*, Bioresource Technology 38:237-239.
- Boussiba, S., Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant and Cell Physiology 32(7):1077-1082.
- Chen, F., Chen, H., Gong, X. 1997. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behavior of the cell suspensions. Bioresource Technology 62:19–24.



- Choi S.L., Suh I.S., Lee C.G. 2003. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. Enzyme and Microbial Technology 33:403–409.
- Cordero, B., Otero, A., Patino, M., Arredondo, B.O., Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green algae *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. Biotechnology Letters 18:213– 218.
- Dong, Q.L., Chao, X.M. 2004. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. Catalysis Today 98:537–544.
- Droop, M.R. 1955. Conditions governing *haematochrome* formation and loss in the algae *Haematococcus pluvialis*. Microbiology 20:391–397.
- Droop, M.R. 1995. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*. Nature 17:5-42.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Garcia, A., lvarez, D., Lamela, T., Otero, A. 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology Letters 20:623– 626.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., Otero, A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Microbial Biotechnology 53:530–535.
- Fabregas, J., Otero, A., Maseda, A., Dominguez, A. 2001. Two stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology 89:65– 71.

- Fan, L., Vonshak, A., Boussib, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). Applied Phycology 30:829-833.
- Garcia, F., Conteras, A., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Molina, E. 1999. Use of concentric tube airlift photobioreactor for microalgal outdoor mass culture. Enzyme Biochemical Engineering 26:107-114.
- Garcia, M.C., Brindley C., Del R.E., Acien F.G., Fernandez J.M., Molina E. 2005. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients Biochemical Engineering 26(2-3): 107–114.
- Garcia, M.C., Del R.E., Sanchez, Casas, J.L., Acien Fernandez F.G., Fernandez, J.M., Rivasb J., Guerrero M.G., Molina G.E. 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. Biotechnology 123:329-342.
- Goodwin, T.W. and Jamikorn, M. 1954. Carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. Biochemical Engineering 57:376-381.
- Grunewald, K., Hagen, C., Braune, W. 1997. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris*. Applied Phycology 32:387– 392.
- Gudin, C. and Chaumont, D. 1991. Cell fragility the key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. Bioresource Technology 38:145-151.
- Hagen, C., Braune, W., Bjorn, L.O. 1994. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). III. Action as a “sunshade”. Applied Phycology 30:241–248.

- Hagen, C., Siegmund, S., Braune, W. 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. Applied Phycology 37:217–226.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Young, A.J. 1996a. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology 55:207–214.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Young, A.J. 1996b. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in to 30 liter airlift photobioreactor. Bioengineering 2:113–118.
- Hata, N., Ogbonna, J.C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic photoautotrophic culture. Applied Phycology 13:395–402.
- Jeon, Y.C., Chul, W.C., Yeoung, S.Y. 2005. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. Biochemical Engineering 27:127-131
- Jonquieres A., Perrin L., Durand A., Arnold S., Lochon P. 1998. Modeling of vapor sorption in polar materials. Comparison of Flory-Huggins and related models with the ENSIC mechanistic approach. Membrane Science 147:59–71.
- Kaewpintong, K. 2004. Cultivation of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor Thesis. Chulalngkorn University 113.
- Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., Pavasant P. 2006. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. Bioresource Technology 96:288-295.

- Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., and Katoh, S. 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. Enzyme and Microbial Technology 35:81–86.
- Kim, Z.H., Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, C.G. 2005. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. Enzyme and Microbial Technology 39:414–419.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. 1991. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media Journal of Fermentation and Bioengineering 71:335–339.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., Nagai, S. 1992a. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering 74:17–20.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. 1992b. Effects of light intensity, light quality and illumination cycle on astaxanthin formation in a green algae. Journal of Fermentation and Bioengineering 74:61–63.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cells of to green algae *Haematococcus pluvialis*. Environmental Microbiolog 59:867–873.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. Journal of Fermentation and Bioengineering 84:94–97.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y. 1998. Independent astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. Biotechnology Letters 19:507-509.

- Lababpour, A., Shimahara, K., Hada, K., Kyoui, Y. 2005 Fed-Batch Culture under Illumination with Blue Light Emitting Diodes (LEDs) for Astaxanthin Production by *Haematococcus pluvialis*. Journal of Bioscience and Bioengineering 100:339–342.
- Lee, Y.K., Soh, C.W. 1991. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). Applied Phycology 27:575–577.
- Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends in Biotechnology 18:160–167.
- Margalith, P.Z. 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. Microbiology Biotechnology 51:431–438.
- Mirash, Z., Aliza, Z., Inna, K.G., Cohen, Z., Boussiba, S. 2002. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *haematococcus pluvialis* (chlorophyceae). Phycological Society of America 41, 819–826.
- Montsant, A., Zarka, A., Boussiba, S. 2001. Presence of a nonhydrolyzable biopolymer in cell wall of vegetative cells and astaxanthin-rich cysts of *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology 3:515–521.
- Molina, E., Garcia, F., Sanchez, J.A., Acien, F.G., Fernandez, J.M. 1997. Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance. Enzyme and Microbial Technology 21:375– 381.
- Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. Applied Phycology 12:499–506.

- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology 96:373–8.
- Park, E.K., Lee, C.G. 2000. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. Microbiology Biotechnology 11:1024–1030.
- Protor, V.W. 1997. Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. Ecology 444:114-143.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., Kopel, R. 1993 A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors Applied Phycology 5:327-332.
- Ricketts, T.R. 1970. The pigments of *Prasinophyceae* and related organism. Phytochemistry 9:1835-1842.
- Robinson, L.F., Morrison, A.W. 1992. Biomass production apparatus. USA Patent 5:137-828.
- Sarada, R., Usha, T., Ravishankar G.A. 2002. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry 37:623-627.
- Smith, G.M. 1950. Fresh water algae. Mcgraw Hill Book USA 109-111.
- Spencer, K. 1989. Pigmentation supplements for animal feed composition. US Patent No. 4871551.



- Steinbrenner, J. and Linden H. 2001 Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytyl synthase and carotenoid Hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Physiology 125:810-817.
- Tjahjono, A.E., Kakizono, T., Hayama, Y., Nishio, N., Nagai, S. 1994. Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. Journal of Fermentation and Bioengineering 77(4):352–357.
- Tredici, M.R., Materassi, R. 1992. From open ponds to alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. Applied Phycology 4:221–231.
- Tripathi, U., Sarada, R., Ramachandra, R., Ravishankar, G.A. 1999. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. Bioresource Technology 68:197–199.
- Tripathi, U., Rao, S.R., Ravishankar, G.A. 2002. Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in culture of *Haematococcus pluvialis*. Process Biochemical 38:419–426.
- Turujman, S.A. 1997. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin. AOAC Annual International Meeting. Cincinnati 80:622–632.
- Wongsuchoto, P. and Pavasant, P. 2004. Internal liquid circulation in annulus sparged internal loop airlift contactors. Chemical Engineering Journal 100:1-9.



Zhang, X.W., Gong, X.D., Chen, F. 1999. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology 23:691–696.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# APPENDIX

## การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* โดยระบบร่วมของถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเชิงแสงในร่มและบ่อ ทางน้ำกลางแจ้ง

ภาณุ พานิชการ<sup>1</sup> สรวิต เผ่าทองสุข<sup>2</sup> ประเสริฐ ภาสตันต์<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

<sup>2</sup>ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล (ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* สามารถสะสมสารแอสตาแซนทินได้มากเมื่อคิดเป็นสัดส่วนของน้ำหนักทั้งหมด ผลผลิตของการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายถูกจำกัดเนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ เพื่อที่จะทำให้ประสิทธิภาพดีขึ้น จึงจำเป็นต้องใช้ระบบที่มีการควบคุมสภาวะแบบสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกเซลล์สีเขียวจะถูกผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสง ส่วนในขั้นตอนที่สอง เซลล์ที่เก็บเกี่ยวจากขั้นแรกจะถูกย้ายมาในบ่อทางน้ำกลางแจ้งเพื่อทำการเหนี่ยวนำสารแอสตาแซนทิน การศึกษานี้ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 17 L โดยออกแบบเบื้องต้นให้มีค่าอัตราส่วน ระหว่างพื้นที่หน้าตัดสำหรับการไหลลงต่อพื้นที่หน้าตัดสำหรับการไหลขึ้น (Ad/Ar) เท่ากับ 2.78 แล้วจึงย้ายเซลล์สีเขียวที่ได้ไปทำการเหนี่ยวนำให้เกิดสารแอสตาแซนทินในบ่อทางน้ำขนาด 17 L ในสภาวะ กลางแจ้ง โดยสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์อากาศยกเชิงแสงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ การใช้สูตรอาหาร F1 ทำการเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 20 ไมโคร โมล โฟตอน/ตารางเมตร/วินาที โดยพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ด้วยอัตราเร็วของฟองอากาศ 0.4 เซนติเมตร/วินาที ในขณะที่การขยายขนาดของถังปฏิกรณ์จาก 3 ลิตรเป็น 17 ลิตร ในสภาวะเดียวกัน สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้แต่มีอัตราการเติบโตและผลผลิตลดลง และสามารถทำการเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* แบบกึ่งต่อเนื่องซึ่งจะสามารถนำผลผลิตออกไปสู่ระบบบ่อทางน้ำเพื่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพเซลล์จากเซลล์สีเขียวที่มีแฟลกเจลลา กลายเป็นเซลล์ระยะซิสที่มีสารสะสมสารสีแอสตาแซนทิน ซึ่งการเหนี่ยวนำจะต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 9 วัน

คำสำคัญ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสง สาหร่ายฮีมาโตคอคคัส แอสตาแซนทิน

ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ supersert@mail.com โทร 0-2218-5279

## Combined system of indoor airlift photobioreactor and outdoor raceway pond for the cultivation of *Haematococcus pluvialis*

Panu Panitchkarn<sup>1</sup>, Sorawit Powtongsook<sup>2</sup>, and Prasert Pavasant<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

<sup>2</sup>Center of Excellent for Marine Biotechnology (c/o Department of marine Science, Chulalongkorn University), National Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, 12120, Thailand

The green microalga *Haematococcus pluvialis* is reported to be capable of accumulating the most superior amount of astaxanthin. The microalga has been reported that its production is still limited by the low cell concentration achievable in the bioreactor. To improve the efficiency, it is essential to cultivate the microorganism under controlled conditions in a two-stage culture system. In the first stage, green vegetative cells are produced in illuminated airlift photobioreactor, whereas in the second stage, the harvested cultures are transferred to the high light-intensity (outdoor) semi-batch pond for the induction of astaxanthin. The objective of the present study is to cultivate *Haematococcus pluvialis* in the 17L airlift photobioreactor. This airlift photobioreactor is designed to have the ratio between downcomer and riser cross sectional area (Ad/Ar) of 2.78. The green motile cells are then transferred to a new designed raceway pond for the examination of the induction of astaxanthin in outdoor conditions. It was found that optimum condition for the cultivation of *H. pluvialis* in photobioreactor was using F1 medium with 20  $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$  illumination and 1% carbon dioxide aeration at 0.4 cm/s. However, growth and productivity of *H. pluvialis* was decreased after scaling up the photobioreactor from 3 L to 17 L. Semi-continuous cultivation was performed in 17 L photobioreactor. Green vegetative cells produced from 17 L photobioreactor was transferred to outdoor raceway tank in order to induce astaxanthin accumulation. At this stage, *H. pluvialis* changed from green vegetative cells to green cysts and finally red cysts in 9 days.

**Keywords** Airliff photobioreactor, *Haematococcus*, Astaxanthin

Corresponding author. E-mail: supersert@gmail.com โทร 0-2218-5279

## บทนำ

เซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กมีความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูง เช่น สารสีแคโรทีนอยด์, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ที่เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ยา, และสารเคมีอื่น ๆ รวมถึงการนำมาผลิตไฮโดรเจนและไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทางชีวภาพ<sup>(1)</sup> ในปัจจุบันมีการผลิตสารสี (pigment) ที่มีประโยชน์หลายชนิดจากสาหร่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสารสีแอสตาแซนทินจากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งมีรายงานว่าสาหร่ายชนิดนี้เป็นแหล่งสะสมของแอสตาแซนทินต่อหน่วยเซลล์ที่มากที่สุด<sup>(2-4)</sup> นอกจากนี้แอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากสาหร่าย *H. pluvialis* มีข้อดีกว่าที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีอื่น ๆ (เช่น สกัดจากเปลือกของสัตว์ทะเลประเภทกุ้ง หรือปู) เนื่องจากแอสตาแซนทินที่สะสมในสาหร่าย *H. pluvialis* ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบเอสเทอร์ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบอิสระ<sup>(3,5)</sup> ดังนั้นถ้าคำนึงในแง่ของการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม

การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ขนาดเล็กนี้จึงมีความเหมาะสมกว่าการเพาะเลี้ยงสัตว์ขนาดใหญ่อื่นๆ การสะสมของแอสตาแซนทินจะเกิดขึ้นเฉพาะในช่วงที่สภาวะการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตเท่านั้น เช่น สภาวะที่ความเข้มข้นของสารอาหารลดลง ความเข้มแสงมากเกินไป อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ฯลฯ โดยในสภาวะเหล่านี้ เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างจากเซลล์สีเขียวที่มีแฟลกเจลลาที่เคลื่อนที่ได้เอง (green vegetative cell) ไปเป็นเซลล์ที่ไม่มีแฟลกเจลลาแต่มีผนังเซลล์ที่หนาขึ้น รวมทั้งมีการสะสมสารสีแอสตาแซนทินเกิดขึ้นด้วย หรือเรียกว่าเป็นเซลล์ระยะซิสต์ (cyst)<sup>(6-7)</sup> ดังนั้นการเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* เพื่อการสังเคราะห์ astaxanthin จึงจำเป็นต้องใช้การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะการเจริญเติบโต และการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะการสร้างและสะสมแอสตาแซนทิน<sup>(2-9)</sup>

สาหร่าย *H. Pluvialis* เป็นสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า และยังเป็นสาหร่ายน้ำจืดที่มี

สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบปกติ จึงมีโอกาสดูถูกปนเปื้อนด้วยเซลล์อื่นที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า การเพาะเลี้ยงจึงต้องทำในระบบปิด ข้อมูลจากการวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงรูปแบบของระบบปิดหลายรูปแบบ เช่น ระบบแบบแผ่นแบน ระบบถังเป่าอากาศทรงสูง หรือระบบท่อยาว สำหรับระบบถังปฏิกรณ์แบบอากาศยาน (airlift reactor) เป็นรูปแบบหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงดี โดยเป็นระบบที่ออกแบบง่าย ราคาไม่แพง และยังให้การผสมผสานและการไหลวนที่ค่อนข้างดี มีแรงเฉือนต่ำ เหมาะกับการเพาะเลี้ยง *H. pluvialis* ซึ่งเป็นเซลล์ที่บอบบางและไม่ทนต่อแรงเฉือนโดยเฉพาะในช่วงของเซลล์สีเขียว<sup>(10-14)</sup>

งานวิจัยนี้เป็นงานที่ต่อเนื่องจากงานของ Kaewpintong และคณะ<sup>(15)</sup> โดยมีความมุ่งเน้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. Pluvialis* เพื่อผลิตสารแอสตาแซนทินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยานที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และยังศึกษาถึงลักษณะของถังเพาะเลี้ยงกลางแจ้งที่มีสภาวะที่มีการควบคุมสำหรับการกระตุ้นการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน โดยให้มีการเพาะเลี้ยงในลักษณะกึ่งต่อเนื่องที่สามารถนำไปใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจริงได้

## วิธีการทดลอง

### การเตรียมหัวเชื้อและอาหารเพาะเชื้อ

สาหร่าย *H. pluvialis* NIES-144 เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับมาจาก National Institute for Environmental Studies ประเทศญี่ปุ่น นำมาเพาะเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยชาวนุเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร F1<sup>(7)</sup> โดยมีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ดังนี้  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  9.87 มิลลิกรัม,  $\text{KNO}_3$  0.41 กรัม,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.03 กรัม,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2.22 มิลลิกรัม,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16.41 มิลลิกรัม,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.008 มิลลิกรัม,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.08 มิลลิกรัม,  $\text{MoO}_3$  0.66 มิลลิกรัม,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  0.05 มิลลิกรัม,  $\text{SeO}_2$  0.036 มิลลิกรัม,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0078 มิลลิกรัม,  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$  6

มิลลิกรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  โดยให้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการถ่ายเซลล์ที่เติบโตเพิ่มปริมาณขึ้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เพื่อเป็นหัวเชื้อก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ โดยจะใช้เซลล์ที่อยู่ในช่วงเจริญเติบโต (exponential phase) เพื่อเป็นหัวเชื้อในการทดลองทั้งหมด

### การติดตั้งถังปฏิกรณ์

ถังปฏิกรณ์แบบอากาศยานขนาด 3 และ 17 ลิตร ซึ่งทำจากอะคริลิกใส มีขนาดดังแสดงใน รูปที่ 1a ทำการฆ่าเชื้อโดยพ่นแก๊สไอโซน ผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Gelman) ที่ทำการอบฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการพ่นไอโซนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนมาเป็นการพ่นอากาศเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เพื่อกำจัดไอโซน บางส่วนที่หลงเหลืออยู่ในระบบออกไป จากนั้นทำการเติมอาหารสารอาหารตามสูตร F1 เข้าไปในถังปฏิกรณ์ ทั้งสองพร้อมทั้งใส่หัวเชื้อเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของทั้งสองถังปฏิกรณ์มีค่า  $2 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร การปั่นกวนในถังปฏิกรณ์ทำโดยการให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอน ไดออกไซด์ความเข้มข้น 1% ทางด้านล่างของถังปฏิกรณ์ โดยผ่านโรตารีเตอร์และตัวกรอง พิเศษภายในระบบควบคุมโดยการปรับปริมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ให้ในระบบ และให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ทางด้านข้างของถังปฏิกรณ์ดัง รูปที่ 1a

ถังปฏิกรณ์แบบบ่อทางน้ำทำจากพีวีซี มีขนาดดังแสดงในรูปที่ 1b ให้แสงสว่างทางด้านบนของถังปฏิกรณ์ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์โดยความเข้มแสงสามารถปรับได้โดยปรับระยะห่างระหว่างหลอดไฟกับถังปฏิกรณ์

### การศึกษาการเติบโตของเซลล์ในถังปฏิกรณ์

ในส่วนนี้จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *H. pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยานเชิงแสงขนาด 3 ลิตร และ 17 ลิตร โดยกำหนดค่าอัตราส่วนของพื้นที่ของไหลที่ไหลลงต่อพื้นที่ของไหลที่ไหลขึ้น

( $A_1/A_2$ ) เท่ากับ 3.2 และ 2.78 ตามลำดับ โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารอาหารเท่ากับ 0.5, 1 และ 2 เท่าของสูตรอาหาร F1 ในทุกชุดการทดลองให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1% โดยควบคุมให้ pH ของระบบมีค่าระหว่าง 5-7 ให้อากาศที่ความเร็วไหลขึ้น 0.2-1 เซนติเมตรต่อวินาที ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 10-30 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที การทดลองนี้ดำเนินการเลี้ยงแบบกะ (batch) เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมนำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-batch) ต่อไป

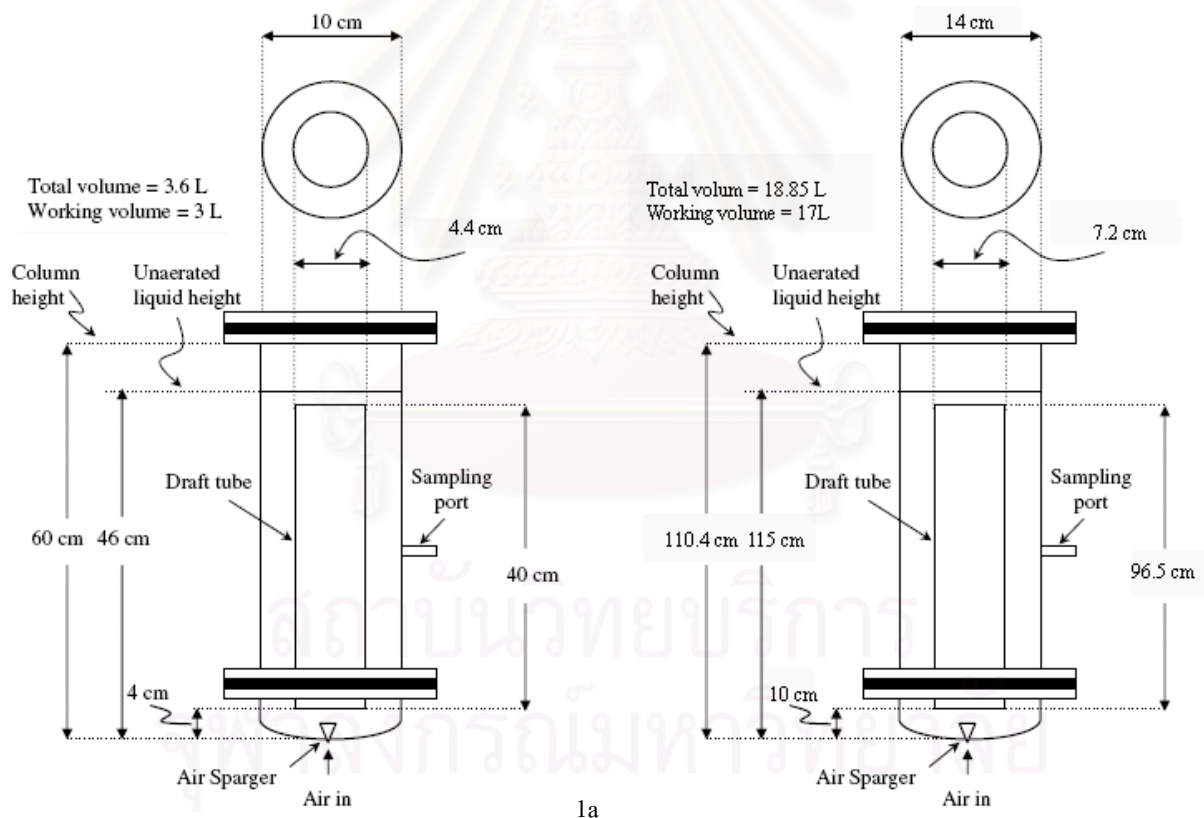
ค่าการผลิตสามารถคำนวณจากสมการที่ 1

$$\text{ค่าการผลิต} = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

เมื่อ  $C_1, C_2$  คือความเข้มข้นของเซลล์ซีเควียมีหนวดของสาหร่าย *H.pluvialis* ที่เวลาที่  $t_1$  และ  $t_2$  ซึ่งหาได้จากการนับเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

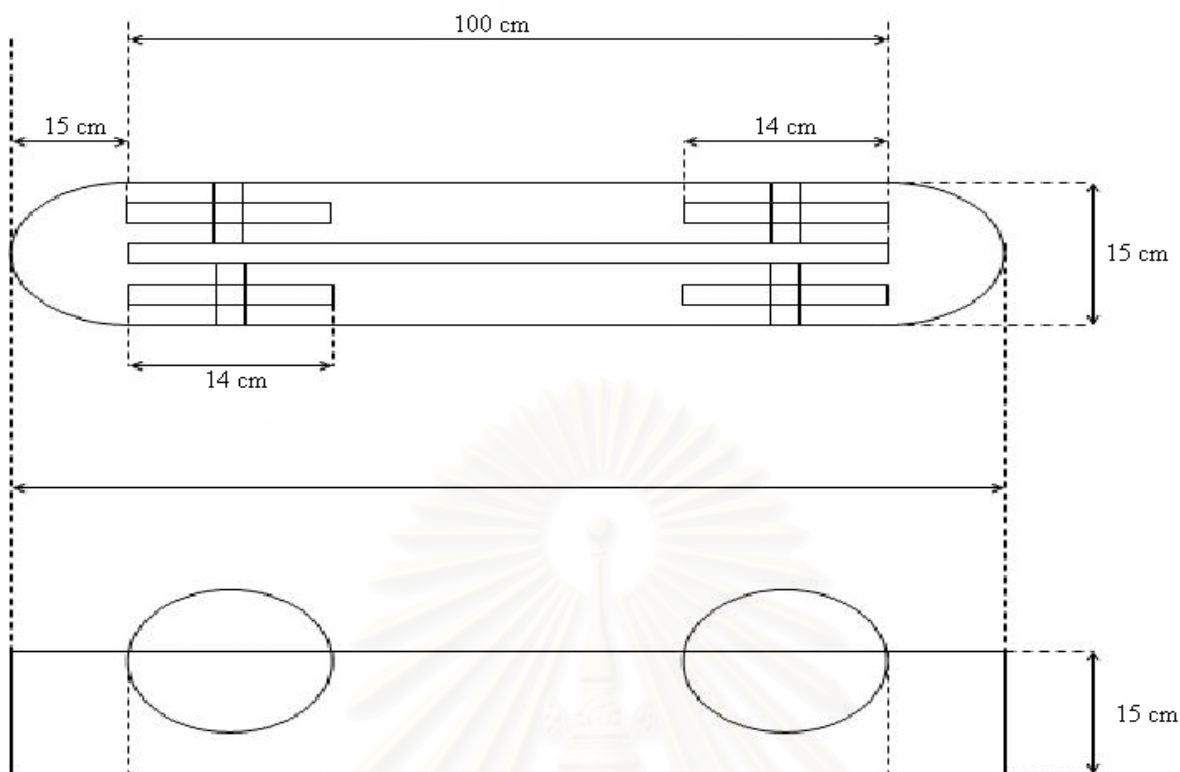
**การศึกษาผลของความเค็มต่อการสะสมแอสตาแซนทิน**

ในส่วนนี้จะเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของสารแอสตาแซนทินในเซลล์ของสาหร่าย *H.pluvialis* ที่ได้จากส่วนของการทดลองการเจริญเติบโตในส่วนแรก โดยนำมาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบบ่อทางน้ำในสภาวะกลางแจ้งที่มีการส่องสว่างด้วยหลอดไฟฟ้าตลอด 24 ชั่วโมง โดยการเพิ่มความเข้มแสงเป็น 35 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที และเพิ่มปริมาณเกลือ 1-3% โดยมวล การทดลองนี้จะดำเนินการภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ(batch)



1a





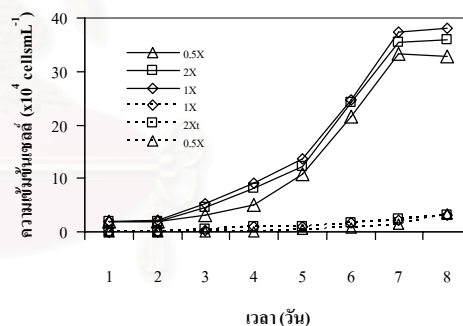
1b

รูปที่ 1 ถึงปฏิบัติการชีวภาพเชิงแสง a:ถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสง, b:บ่อทางน้ำ

## ผลการทดลอง

### ผลของความเข้มข้นของสารอาหาร

ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสาหร่าย *H. pluvialis* ที่ความเข้มข้นของสารอาหารที่ต่างกัน ในถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 3 ลิตร แสดงดังรูปที่ 2 โดยเซลล์จะเข้าสู่ช่วงคงตัว(stationary phase) ที่เวลาประมาณ 7 วัน และจะสังเกตว่าเซลล์มีอัตราการเติบโตต่ำสุดที่ความเข้มข้นของสารอาหารเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นปกติ และสามารถเติบโตได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของอาหารตามสูตรปกติ (1x) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ในถึงปฏิบัติการยังคงสภาพเป็นเซลล์สีเขียวที่มีแฟลกเจลลา ส่วนเซลล์ที่มีการสลัดแฟลกเจลลาและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นซิส มีอยู่เป็นส่วนน้อย

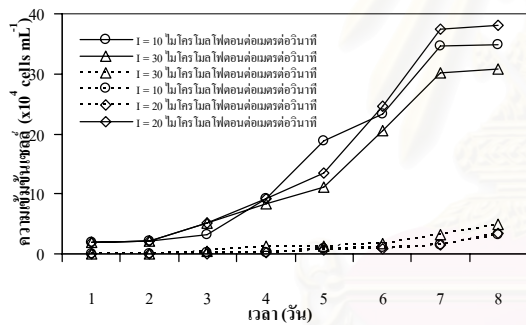


รูปที่ 2 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* จากการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของอาหารที่ต่างกัน ตั้งแต่ 0.5, 1 และ 2 เท่าของสูตรอาหาร F1 ปกติ ( — คือเซลล์เขียวที่มีหนวด), ( ..... คือเซลล์ที่สลัดหนวดก่อนเข้าระยะซิส )

### ผลของความเข้มแสง

การศึกษาผลของความเข้มแสงต่อการเติบโตของ *H. pluvialis* ทำในถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 3 ลิตร ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนได้ออกไซด์ 1% ที่ความเร็วอากาศยกตัว 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที

แสดงดังรูปที่ 2 จากรูปจะเห็นได้ว่าสำหรับ *H.pluvialis* จะเติบโตได้ดีที่สุดที่ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที (ความหนาแน่นสูงสุดประมาณ  $38 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร) และการเติบโตต่ำสุดที่ความเข้มแสง 10 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที ส่วนที่ความเข้มแสง 30 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะซีสมากที่สุด ซึ่งงานวิจัยของ Bussiba และ Vonshak<sup>(16)</sup> พบว่าที่ความเข้มแสงสูง (90 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) จะเหนี่ยวนำเซลล์ทั้งหมดให้เข้าสู่ระยะซีส ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์สีเขียวของ *H. pluvialis* จะต้องควบคุมความเข้มแสงไม่ให้สูงเกินไป เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ส่งผลต่อผลผลิตเซลล์สีเขียวจากระบบได้



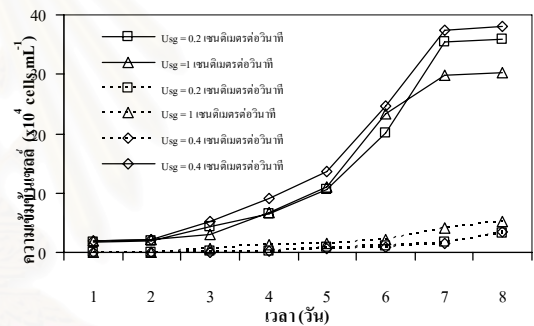
**รูปที่ 3** ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* โดยเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงต่างกัน ( — คือเซลล์เขียวที่มีหนวด ), ( ..... คือเซลล์ที่สลัดหนวดก่อนเข้าระยะซีส )

**ผลของความเร็วจากอากาศ**

การศึกษาผลของความเร็วจากอากาศในถังปฏิกรณ์นี้ ทำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 3 ลิตร พ่นด้วยอากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ให้ความเข้มแสงที่ 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 พบว่าที่ความเร็วแก๊สไหลเข้า 0.4 เซนติเมตร/วินาที จะมีการเติบโตสูงที่สุด ในขณะที่การพ่นอากาศด้วยความเร็วต่ำ 0.2 เซนติเมตรต่อวินาที มีอัตราการเติบโตต่ำกว่าเล็กน้อย

ส่วนการพ่นอากาศด้วยความเร็วสูง 1 เซนติเมตร/วินาที ส่งผลให้ความหนาแน่นเซลล์ต่ำที่สุดและในขณะที่เดียวกันก็จะพบเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นซีสเพิ่มสูงขึ้นด้วย

โดยทั่วไปการเพิ่มอัตราการให้อากาศจะทำให้การกวนผสมภายในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยก และการถ่ายเทมวลสารระหว่างวัฏภาคแก๊สและวัฏภาคของเหลวดีขึ้น แต่การที่อัตราการเติบโตของสาหร่าย *H.pluvialis* กลับลดลงเมื่อเพิ่มความเร็วของอากาศสูงกว่า 0.4 เซนติเมตร/วินาที อาจเป็นเพราะว่าแรงเฉือนที่เกิดขึ้นทำให้เซลล์ต้องปรับเปลี่ยนสภาพไปเป็นซีสหรือบางครั้งอาจถูกทำลายไป ซึ่งตรงกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาคือเซลล์ของสาหร่าย *H.pluvialis* จะไวต่อสิ่งกระตุ้นต่างๆ<sup>(18)</sup> และเซลล์จะถูกทำลายเนื่องมาจากแรงเฉือนที่เซลล์ได้รับ<sup>(19)</sup>



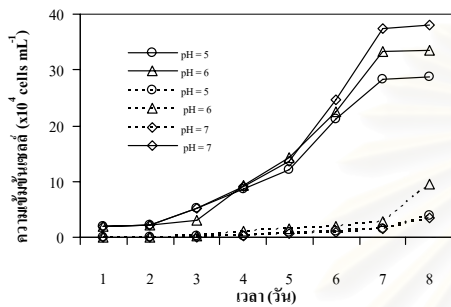
**รูปที่ 4** ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* โดยเพาะเลี้ยงที่การให้อากาศที่ความเร็วต่างกัน ( — คือเซลล์เขียวที่มีหนวด ), ( ..... คือเซลล์ที่สลัดหนวดก่อนเข้าระยะซีส )

**ผลของการควบคุมพีเอช**

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายพบว่าคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญโดยมีคาร์บอนประมาณ 40-50% โดยน้ำหนัก<sup>(20)</sup> ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* นี้ ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะมีผลต่อค่าพีเอชของน้ำ การทดลองทำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 3 ลิตร ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 1% ที่ 0.4 เซนติเมตรต่อวินาที และให้แสงที่ 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตาราง



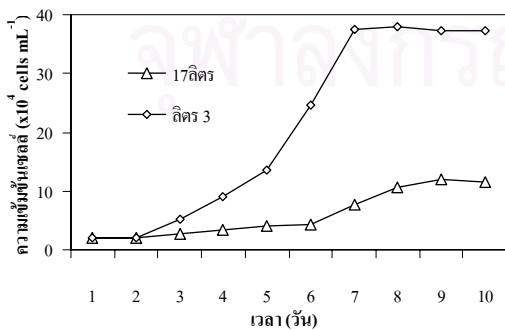
เมตรต่อวินาที ผลการทดลองในรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าที่พีเอช 7 นั้นสาหร่ายมีการเติบโตสูงที่สุด โดยมีความหนาแน่นประมาณ  $30 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนที่พีเอชต่ำกว่า 7 สาหร่ายจะมีการเติบโตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพความเป็นกรดของระบบนั้นไม่เหมาะสมกับการเติบโตของเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* และจะพบว่าในสภาวะนี้เซลล์จะต้องมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด ทำให้พบเซลล์ในระยะชีสเพิ่มขึ้นมากที่สุด



รูปที่ 5 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* ที่เพาะเลี้ยงที่พีเอชต่างกัน (— คือเซลล์เขียวที่มีหนวด), (..... คือเซลล์ที่สลัดหนวดก่อนเข้าระยะชีส)

**การเปรียบเทียบการเติบโตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 3 และ 17 ลิตร**

การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 3 และ 17 ลิตร ทำในสภาวะเดียวกันคือให้ความเข้มแสงที่ 20 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที และให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 1% ที่ความเร็ว 0.4 เซนติเมตร/วินาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6

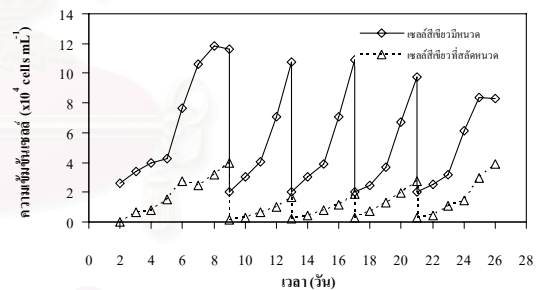


รูปที่ 6 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* โดยเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 3 และ 17 ลิตร

จะเห็นได้ว่าการเติบโตของ *H. pluvialis* ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 3 ลิตร มีอัตราการเติบโตสูงกว่าที่เลี้ยงในระบบขนาด 17 ลิตรที่สภาวะเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 3 ลิตร ก็ยังเล็กเกินไปในการนำไปใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเป็นอุตสาหกรรม การขยายขนาดถึงปฏิกรณ์จึงมีความสำคัญเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตให้มากขึ้น

**การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-batch) ในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 17 ลิตร**

การเพาะเลี้ยงเซลล์ของสาหร่าย *H.pluvialis* แบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 17 ลิตร ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 1% ที่ความเร็ว 0.4 เซนติเมตร/วินาที ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที ดังแสดงในรูปที่ 7



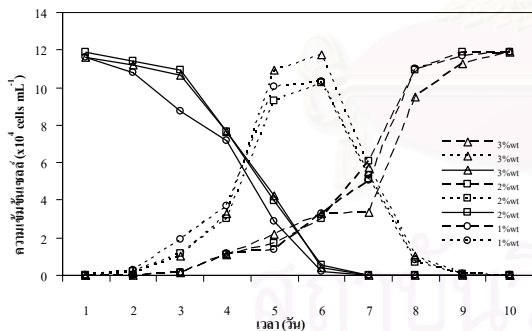
รูปที่ 7 ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย *H.pluvialis* โดยเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 17 ลิตร (— คือเซลล์เขียวที่มีหนวด), (..... คือเซลล์ที่สลัดหนวดก่อนเข้าระยะชีส)

ผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบกะ (batch) โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาด 17 ลิตรที่ความเข้มข้นเริ่มต้น  $2 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ประมาณ  $12 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร โดยใช้เวลาประมาณ 6-8 วัน แต่สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องในการทดลองนี้จะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ความเข้มข้น ประมาณ  $10 \times 10^4$

เซลล์/มิลลิลิตร เนื่องจากเซลล์ในช่วงนี้เป็นเซลล์ที่ยังเป็นเซลล์สีเขียวปกติก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ระยะชีส โดยจะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ทุกๆ 4 วัน การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องนี้ให้ค่าการผลิต  $8 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร/วัน ในขณะที่งานวิจัยของ Kaewpintong และคณะ<sup>(15)</sup> ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในระบบกึ่งต่อเนื่องโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกขนาด 3 ลิตร ได้ค่าการผลิต  $20 \times 10^4$  เซลล์/มิลลิลิตร/วัน

**ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการสะสมแอสตาแซนทิน**

ได้ทดลองนำเซลล์ที่ทำการเก็บเกี่ยวได้จากการทดลองเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกเชิงแสง นำมาเพาะเลี้ยงในบ่อทางน้ำที่สภาวะกลางแจ้ง (outdoor raceway pond) เพื่อทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมของสารแอสตาแซนทินในเซลล์ของสาหร่าย *H. phувialis* โดยให้แสง 35 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที<sup>(2)</sup> เสริมกับแสงตามธรรมชาติ ทำการกวนน้ำด้วยใบพัดที่หมุนด้วยอัตราเร็ว 60 รอบ/นาที ผลของการเติมเกลือ NaCl ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมแอสตาแซนทินของสาหร่าย *H. Phувialis* แสดงดังรูปที่ 8



**รูปที่ 8** ความหนาแน่นของเซลล์สำหรับ *H. phувialis* ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นชีสด้วยความเข้มข้นของเกลือ (..... คือเซลล์เขียวที่มีหนวด), (คือเซลล์ที่สกัดหนวดก่อนเข้าระยะชีส), (คือเซลล์ในระยะชีส)

จะเห็นได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นจาก 1% เป็น 2% และ 3% นั้น แทบจะไม่มีผลกระทบต่อเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ในระยะชีส โดยพบว่าสาหร่ายใช้เวลาประมาณ 9 วันในการ

เปลี่ยนสภาพเซลล์ทั้งหมดจากเซลล์สีเขียวปกติกลายเป็นชีสที่มีสีเขียวและเป็นสีแดงในที่สุด

**สรุปผลการทดลอง**

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกเชิงแสงขนาดเล็กที่ 3 ลิตร มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสาหร่าย *H. phувialis* โดยให้ค่าการผลิตที่สูง โดยสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์อากาศยกเชิงแสงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ การใช้สูตรอาหาร F1 ทำการเลี้ยงด้วยความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอน/ตารางเมตร/วินาที โดยพ่นอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 1% ด้วยอัตราเร็วของฟองอากาศ 0.4 เซนติเมตร/วินาที ในขณะที่การขยายขนาดของถังปฏิกรณ์จาก 3 ลิตรเป็น 17 ลิตร ในสภาวะเดียวกัน สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้แต่มีอัตราการเติบโตและผลผลิตลดลง และสามารถทำการเพาะเลี้ยง *H. phувialis* แบบกึ่งต่อเนื่องซึ่งจะสามารถนำผลผลิตออกไปสู่ระบบบ่อทางน้ำเพื่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพเซลล์จากเซลล์สีเขียวที่มีแฟลกเจลลา กลายเป็นเซลล์ระยะชีสที่มีการสะสมสารสีแอสตาแซนทิน ซึ่งการเหนี่ยวนำจะต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 9 วัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อทำการเพาะเลี้ยงและการขยายขนาดถังปฏิกรณ์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปจึงมีความน่าสนใจอย่างมาก นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำบ่อทางน้ำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมสารสีแอสตาแซนทินในเซลล์ของสาหร่าย *H. phувialis* ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาควบคู่ไปกับระบบการผลิตเซลล์

**กิตติกรรมประกาศ**

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

- บทความวิจัย** : Borowitzka, M.A. 1997. Algae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Phycology* 9:393-401.
- บทความวิจัย** : Harker, M., Tsavalos, A.J., Young, A.J. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technology* 55:207-214.
- บทความวิจัย** : Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 18:160-167.
- บทความวิจัย** : Bussiba, S., Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant cell physiology* 32(7):1077-1082.
- บทความวิจัย** : Margalith, P.Z., 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Microbiology Biotechnology* 51:431-438.
- บทความวิจัย** : Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B.O., Fabregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green algae *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnol Letters* 18:213-218.
- บทความวิจัย** : Fabregas, J., Domínguez, A., Garcia-Alvarez, D., Lamela, T., Otero, A., 1998. Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters* 20:623-626.
- บทความวิจัย** : Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technology* 96(3):373-8.
- บทความวิจัย** : Kobayashi, M., Kakizono, T., and Nagai, S. 1991. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media *Fermentation and Bioengineering* 71, 335-339.
- บทความวิจัย** : Tredici, M.R., Materassi, R., 1992. From open ponds to alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *Phycology* 4:221-231.
- บทความวิจัย** : Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., Kopel, R., 1993. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. Appl. Phycol.* 5, 237-332
- บทความวิจัย** : Molina E., García F., Sánchez J.A., Acien F.G., Fernández J.M. 1997. Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance. *Enzyme Microbial Technology* 21:375-381.
- บทความวิจัย** : Acien, F.G., García, C.F., Sánchez, P.J.A., Fernández, S.J.M., Molina, G.E. 1998. Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnol Bioengineering* 58:605-16.
- บทความวิจัย** : García-Malea López M.C., Del R' E. Sánchez, Casas López J.L., Acien Fernández F.G., Fernández Sevilla J.M., Rivas J., Guerrero M.G., Molina Grima E. 2005. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Biotechnology*.
- บทความวิจัย** : Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., Pavasant P. 2006. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresour. Technology*.
- บทความวิจัย** : Bussiba, S., Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant cell physiology* 32(7):1077-1082.

บทความวิจัย : Hata, N., Ogbonna, J.C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. 2001. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic–photoautotrophic culture. Phycology 13:395–402.

บทความวิจัย : Krichnavaruk, S., Pavasant, P., 2002. Analysis of gas–liquid mass transfer in an airlift contactor with perforated plates. Chem. Eng. J. 89, 203–211.

บทความวิจัย : Gudin, C., Chaumont, D., 1991. Cell fragility—The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactor. Bioresour. Technol. 38, 145–151.

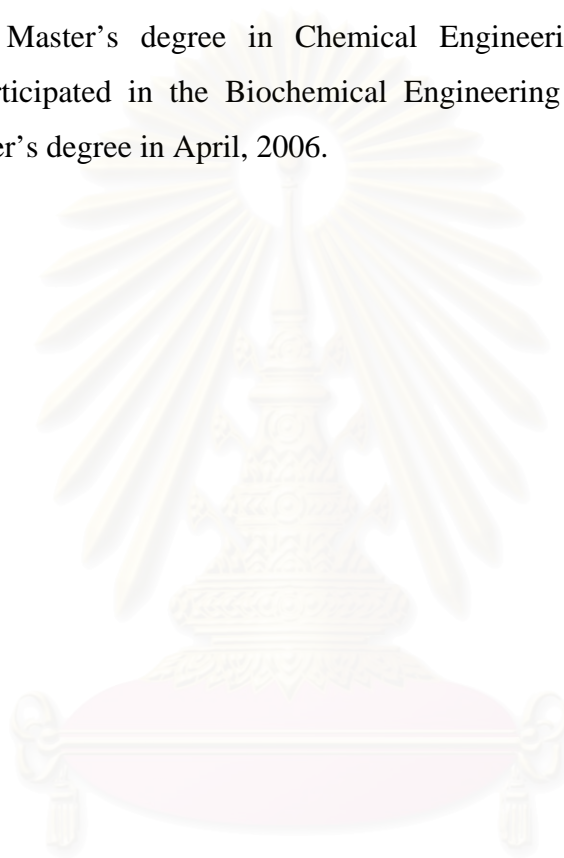
บทความวิจัย : Fischer, U., Alfermann, A.W., 1995. Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in the bioreactor: influence of culture conditions. J. Biotechnol. 41, 19–28.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## BIOGRAPHY

Mister Panu Panitchakarn was born on 9<sup>th</sup> March, 1983 in Pitsanulok. He finished his secondary course from Pitsanulokpittayakom School in March, 2001. After that, he studied in the major of Chemical Engineering in Faculty of Engineering at King Mongkut's University of Technology North Bangkok. He continued his further study for Master's degree in Chemical Engineering at Chulalongkorn University. He participated in the Biochemical Engineering Research Group and achieved his Master's degree in April, 2006.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย