

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* NIES 144

เพื่อผลิตแอสตาแซนทิน



นางสาว วรภา นีบัณฑิตรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-637-307-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๕ ๙๗๕-๙๗๕ ๒

๒๕๔๐

OPTIMAL CONDITION FOR *Haematococcus pluvialis*
NIES 144 CULTURES FOR ASTAXANTHIN
PRODUCTION

MISS WORAPA HEEPCHANTREE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Programme of Biotechnology

Graduate School

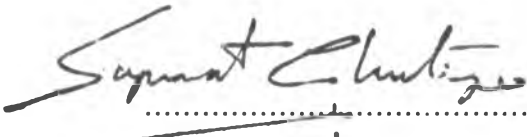
Chulalongkorn University

Academic Year 1997


ISBN 974-637-307-2

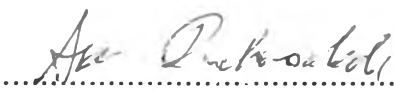
Thesis Title Optimal Condition for *Haematococcus pluvialis* NIES
144 Cultures for Astaxanthin Production.
By Miss Worapa Heepchantree
Department Biotechnology
Thesis Advisor Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.

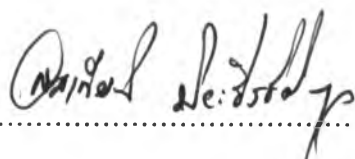
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirement for the Master Degree



.....Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee


.....Chairman
(Assistant Professor Sumate Tantratian, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul,
Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

วราภา หีบจันทร์ตรี : ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง *Haematococcus pluvialis* NIES 144 เพื่อผลิต
แอสตาแซนทิน อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อรุณ อินเจริญศักดิ์ , 129 หน้า. ISBN 974-637-307-2.

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *H. pluvialis* NIES 144 เพื่อให้มีอัตราการผลิตเบต้าแคโรทีนสูง พบว่าสูตรอาหารที่
เหมาะสมคือ Basal Medium ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมอะซิเตด 0.2 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 2.0 กรัม ภายใต้
ความเข้มแสง $20 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ โดยให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาภาวะที่ทำให้
สาหร่ายสะสมรงควัตถุแอสตาแซนทินในปริมาณสูงโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมอะซิเตดลงในระยะที่สาหร่าย
เข้าสู่ระยะคงที่พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณแอสตาแซนทิน
เพิ่มขึ้นเล็กน้อยประมาณ 15 พิโคกรัมต่อเซลล์ ในขณะที่เมื่อเติมโซเดียมอะซิเตด 21.9 มิลลิโมลาร์ ปริมาณแอสตาแซนทิน
จะเพิ่มขึ้นถึง 31 พิโคกรัมต่อเซลล์ โดยใช้ความเข้มแสง $100 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ในภาวะที่ให้แสงตลอดเวลา ในการศึกษาผลของ
อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 30 องศาเซลเซียส ภายหลังการเติมโซเดียมอะซิเตด พบว่าปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์ลด
ลง ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเริ่มต้นที่ความเข้มแสง ตั้งแต่ 20 ถึง $60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ นั้น ไม่มีผลทำให้การสะสมแอสตา-
แซนทินเพิ่มขึ้น ผลของการวิเคราะห์แอสตาแซนทินใช้เทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ คาร์บอน 18 และใช้ระบบสารละลาย
ซึ่งประกอบด้วยอะซิโตนในน้ำและเอทิลอะซิเตดพบว่าแอสตาแซนทินส่วนใหญ่อยู่ในรูปเอสเทอร์โดยปริมาณแอสตา-
แซนทินในเซลล์ในขณะที่มีสีแดงและสีเขียวมีปริมาณเท่ากับ 1.27 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ตามลำดับ

ภาควิชา
สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต วราภา หีบจันทร์ตรี
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [ลายมือ]
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C727136 MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Haematococcus pluvialis* NIES 144 / ASTAXANTHIN

WORAPA HEEPCHANTREE : OPTIMAL CONDITION FOR *Haematococcus pluvialis* NIES 144 CULTURES FOR ASTAXANTHIN PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph D. 129 pp. ISBN 974-637-307-2.

High growth rate of *H. pluvialis* NIES 144 was accomplished by culturing cells in The Basal Medium containing 0.12 g/l sodium acetate and 2.0 g/l of yeast extract under 12-h dark, 12-h light and $20 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 22°C . High content of astaxanthin was obtained by supplementation of various concentrations of sodium chloride and sodium acetate to the late vegetative growth phase. At 0.2% (w/v) NaCl, astaxanthin content was slightly increased to 15 pg/cell and with acetate supplementation at 21.9 mM, astaxanthin content reached 31 pg/cell under $100 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ continuous illumination. At temperature higher than 30°C after supplementation, a decrease in astaxanthin content was observed. With supplementation of sodium acetate and ferrous sulphate at light intensity 20 to $60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the astaxanthin content was not increased. The analysis of the obtained astaxanthin by HPLC on reverse phase C 18 column with acetonitrile : H_2O and ethylacetate solvent system showed that the majority of astaxanthin existed in the ester forms. Red cyst cells of *H. pluvialis* NIES 144 contained 1.27% (w/w) as compared to 0.70% (w/w) in the green cells.

ภาควิชา.....

ลายมือชื่อนิสิต.....^{วทก} ^{หน้าหน้าหน้า}

สาขาวิชา..... ^{หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ}

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา..... 2540

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Aran Incharoensakdi, for his excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Dr. Sumate Tantratian, Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul and Dr. Sirirat Rengpipat for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

This research was supported by a grant from The National Science and Technology Development Agency, Ministry of Science, Technology and Environment.

Sincere thanks are extended to Dr. Bussaba Reakumnouychoke and all members of Cytogenetic Unit of Pathology Department, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital for microscopic photographs of *H. pluvialis* NIES 144.

Sincere thanks are also expressed to all friends and members of the Biochemistry and Biotechnology Department for their assistance and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents and my three sisters for their unlimited love, support and understanding.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	IV
ENGLISH ABSTRACT.....	V
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	XI
LIST OF FIGURES.....	XII
ABBREVIATIONS.....	XVII
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	15
1 Effect of Environmental Factors on Growth of <i>H. pluvialis</i> NIES 144.....	19
1.1 Type of Medium	19
1.2 Type and Concentration of Carbon Source.....	19
1.3 Concentration of Nitrogen Source....	21
2 Effect of Environmental Factors on Growth of <i>H. pluvialis</i> NIES 144 in The Basal Medium.....	21
2.1 Light Intensity.....	22
2.2 Content of Carbon and Nitrogen Source.....	22
2.3 Initial Cell number.....	23

3	Effect on Environmental Factor on Astaxanthin Content in <i>H. pluvialis</i> NIES 144.....	23
	3.1 Effect of Light Intensity.....	24
	3.2 Effect of Sodium Chloride.....	25
	3.3 Effect of Carbon and Nitrogen.....	25
	3.3.1 Effect of C/N Content.....	25
	3.3.2 Effect of CH ₃ COONa (pH 7).....	25
	3.4 Effect of Temperature.....	25
	3.4.1 Effect of Temperature and Light Intensity, Supplemented with NaCl.....	25
	3.4.2 Effect of Temperature and Light Intensity, Supplemented with CH ₃ COONa.	26
	3.5 Effect of FeSO ₄ .7H ₂ O (pH 1.5).....	26
4	Partial Analysis of Astaxanthin from <i>H. pluvialis</i> NIES 144 by High Performance Liquid Chromatography Method.....	26
CHAPTER III	RESULTS.....	30
1	Effect of Environmental Factors on Growth of <i>H. pluvialis</i> NIES 144.....	30
	1.1 Type of Medium.....	30
	1.2 Type and Concentration of Carbon Source.....	34
	1.3 Concentration of Nitrogen Source.....	37

2	Effect of Environmental Factors on Growth of <i>H. pluvialis</i> NIES 144 in The Basal Medium.....	40
2.1	Light Intensity.....	40
2.2	Content of Carbon and Nitrogen Source.....	42
2.3	Initial Cell Number.....	45
3	Effect of Environmental Factors on Astaxanthin Content in <i>H. pluvialis</i> NIES 144.....	48
3.1	Effect of Light Intensity.....	48
3.2	Effect of Sodium Chloride.....	52
3.3	Effect of Carbon and Nitrogen.....	57
3.3.1	Effect of C/N Content.....	57
3.3.2	Effect of CH ₃ COONa (pH 7).....	62
3.4	Effect of Temperature.....	67
3.4.1	Effect of Temperature and Light Intensity, Supplemented with NaCl.....	67
3.4.2	Effect of Temperature and Light Intensity, Supplemented with CH ₃ COONa.	71
3.5	Effect of FeSO ₄ .7H ₂ O (pH 1.5).....	75

4	Partial Analysis of Astaxanthin from <i>H. pluvialis</i> NIES 144 by High Performance Liquid Chromatography Method.....	83
CHAPTER IV	DISCUSSION.....	86
CHAPTER V	SUMMARY.....	96
REFERENCES.....		98
APPENDIX		104
BIOGRAPHY.....		129

LIST OF TABLES

	Page
Table 1 Carbon and nitrogen content for carbon modified in three types of media.....	20
Table 2 Carbon and nitrogen content for nitrogen modified in three types of media.....	22
Table 3 Sodium acetate and yeast extract content for The Basal modified medium.....	22

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1	Acyclic C ₄₀ H ₅₆ structure (I), carotene structure (II)..... 2
Figure 2	Structure of six synthetic carotenoids..... 3
Figure 3	Three configurations of astaxanthin..... 7
Figure 4	Proposed pathway for astaxanthin biosynthesis in <i>H. pluvialis</i> ; (A) related carotenoids, which do not take part in this pathway, are given in (B)..... 13
Figure 5	Vegetative green cell and red cyst cell of <i>H. pluvialis</i> NIES 144 (X 200)..... 27
Figure 6	Growth of <i>H. pluvialis</i> NIES in three types of media, The Basal medium (a), Medium for <i>H. lacustris</i> ATCC 30453 (b) and Modified Basal medium (c) with various initial cell numbers..... 31
Figure 7	Specific growth rates of <i>H. pluvialis</i> NIES 144 with various initial cell numbers in three types of media..... 33
Figure 8	Growth of <i>H. pluvialis</i> in three types of media containing various concentrations of carbon source..... 35
Figure 9	Specific growth rate of <i>H. pluvialis</i> in three types of media containing various concentrations of carbon source..... 36

Figure 10	Growth of <i>H. pluvialis</i> in three types of media containing various concentrations of nitrogen source...	38
Figure 11	Specific growth rate of <i>H. pluvialis</i> in three types of media containing various concentrations of nitrogen source.....	39
Figure 12	Growth of <i>H. pluvialis</i> exposed to 20, 40, and 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	41
Figure 13	Growth of <i>H. pluvialis</i> in The Basal medium containing various concentrations of sodium acetate and yeast extract.....	43
Figure 14	Specific growth rate of <i>H. pluvialis</i> in The Basal medium containing various concentrations of sodium acetate and yeast extract.....	44
Figure 15	Growth of <i>H. pluvialis</i> in The Basal medium containing various initial cell numbers.....	46
Figure 16	Specific growth rate of <i>H. pluvialis</i> in The Basal medium containing various initial cell numbers.....	47
Figure 17	Growth of <i>H. pluvialis</i> in The Basal medium under various light intensities.....	49
Figure 18	Effect of light intensities on the contents of astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation	50
Figure 19	Effect of light intensities on the contents of astaxanthin and chlorophyll by 90% acetone extraction after 8 - day cultivation	51

Figure 20	Growth of <i>H. pluvialis</i> in The Basal Medium containing different sodium chloride content ratios at 20 (a), 50 (b), 100 (c), 150 (d), and 200 (e) $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	53
Figure 21	Effect of various NaCl concentration on the contents of astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation	56
Figure 22	Growth of <i>H. pluvialis</i> in The Basal Medium when supplemented various C/N contents at 20 (a), 50 (b), 100 (c), 150 (d), and 200 (e) $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	58
Figure 23	Effect of C/N contents on the contents of astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation.....	61
Figure 24	Growth of <i>H. pluvialis</i> in The Basal Medium when supplemented various concentration of sodium acetate at 20 (a), 50 (b), 100 (c), 150 (d) and 200 (e) $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	63
Figure 25	Effect of sodium acetate concentration on the contents of astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation.....	66
Figure 26	Growth of <i>H. pluvialis</i> in The Basal Medium on 0.2 % (w/v) NaCl supplemented culture at various temperature under 50 (a), 100 (b), and 140 (c) $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	68
Figure 27	Effect of temperature on 0.2 % (w/v) NaCl supplemented culture on astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation	70

- Figure 28 Growth of *H. pluvialis* in The Basal Medium on 21.9 mM supplemented culture of sodium acetate at various temperature under 50 (a), 100 (b), and 140 (c) $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 72
- Figure 29 Effect of temperature on 21.9 mM sodium acetate supplemented culture on astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation..... 74
- Figure 30 Growth of *H. pluvialis* in The Basal Medium initially cultivated at 20, 40, and 60 $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and with 21.9 mM of sodium acetate at day 4 with various concentrations of ferrous sulphate under 140 $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 22°C..... 76
- Figure 31 Effect of ferrous sulphate on 21.9 mM sodium acetate supplementation after cultivated under 20, 40, and 60 $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at day 4 and following cultivated at 140 $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 4 days on astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation 78
- Figure 32 Growth of *H. pluvialis* in Basal Medium initially cultivated at 20, 40, and 60 $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and with 43.8 mM of sodium acetate at day 4 with various concentrations of ferrous sulphate under 140 $\mu\text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at 22°C..... 79

- Figure 33 Effect of ferrous sulphate on 43.8 mM sodium acetate supplementation after cultivated under 20, 40, and 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ at day 4 and following cultivated at 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 4 days on astaxanthin and chlorophyll by DMSO extraction after 8 - day cultivation..... 81
- Figure 34 Absorbance of DMSO extraction of *H. pluvialis* on growth at day 0 (a), 2 (b), 4 (c) and after acetate supplementation at day 6 (d) and 8 (e)..... 82
- Figure 35 HPLC chromatogram of standard astaxanthin (a), astaxanthin and its esters in green vegetative (b) and red cyst cell (c) by acetone extraction using reverse phase C18 column with acetonitrile :H₂O and ethylacetate solvent system..... 84
- Figure 36 Cultures (a) and lyophilized products (b) of vegetative green cell and red cyst cell of *H. pluvialis* NIES 144..... 85

ABBREVIATIONS

°C	degree celcius
$\mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	photon density (light intensity)
%	percent
w/v	weight by volume
ml.	millilitre
mM	millimolar
μM	micromolar
μ	specific growth rate
g	gram
pg	picogram (10^{-12} gram)
rpm	revolution per minute
min	minute
nm	nanometre
m	metre
λ	wavelength of the light
C/N ratio	carbon per nitrogen balance
$E^{1\%}_{1\text{cm}}$	the specific extinction coefficients
A	absorbance
lb	pound
in ²	square inch
w	watt
BM	The Basal medium
BBM	The Basal modified medium
MFH	Medium for <i>H. lacustris</i> ATCC 30453
s	second
$\mu \text{ E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	photon density(light intensity)