การเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* (CHLOROPHYCEAE) เพื่อผลผลิตเบตาคาโรทีน

นาย สรวิศ เผ่าทองศุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-373-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019652

STRAIN SELECTION AND CULTURE OF *Dunaliella salina* (CHLOROPHYCEAE) FOR BETA-CAROTENE PRODUCTION

Mr.Sorawit Powtongsook

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Marine Science
Graduate School
Chulalongkorn University
1993

ISBN 974-583-373-2

Thesis Title	Strain Selection and Culture of Dunaliella salina (Chlorophyceae) for β-carotene Production
By	Mr.Sorawit Powtongsook
Department	Marine Science
Thesis Advisor	Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.
	Assistant Professor Suchana Wisessang, M.Sc.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Wilaiwan Utoomprurkporn
..... Chairman

(Assistant Professor Wilaiwan Utoomprurkporn, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Professor Piamsak Menesveta, Ph.D.)

Suchana Wisessang
..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Suchana Wisessang, M.Sc.)

Somkiat Piyatiratitivorakul
..... Member

(Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.)

ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ต้องกรอกข้อความต่อไปนี้ให้ครบถ้วนทั้งสองหน้า

##C225607 : MAJOR MARINE BIOLOGY
KEY WORD: Dunaliella salina / STRAIN SELECTION / CULTURE / BETA-CAROTENE

SORAWIT POWTONGSOOK : STRAIN SELECTION AND CULTURE OF Dunaliella salina (CHLOROPHYCEAE) FOR BETA-CAROTENE PRODUCTION
THESIS ADVISOR : PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D.
THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. SUCHANA WISESSANG, M.Sc.
121 p.: ISBN 974-582-373-2

The strain selection and culture of Dunaliella salina yielding high beta-carotene were carried out in four steps, i.e. [1] field survey and water sampling in Chon Buri, Chachoengsao, Chanthaburi and Samut-Songkhram province for the clone selection, [2] selection of the clones yielding high beta-carotene, [3] optimizing the culture condition for beta-carotene production in laboratory and [4] outdoor mass culture. It was found that nitrate and phosphate concentrations of salt pond water samples increased with increasing salinity and decreasing pH. The number of D. salina was highest (1.5×10^4 cell/ml) at 300 ppt. Six clones of D. salina were isolated from salt ponds in Samut Songkhram by the single cell isolation technique and clonal culture were made in ESM medium. Thereafter, the selection process was conducted by culturing the cells in three levels of salinity, i.e. 10, 20 and 30% NaCl (w/v) in J/1 medium at 20,000 lux light intensity. The isolated clone DS91008 was selected. This clone produced the highest carotenoid content (80.4 pg/cell in 30% NaCl).

Growth rates of D. salina were not different at three light intensities (5,000, 10,000 and 15,000 lux). The carotenoid contents increased with increasing light intensity and the cells colour changed from green to orange. The growth rate was reduced by the decreasing nitrate concentration. Increasing the light intensity and reducing nitrate concentration affected the rising carotenoid content which consisted merely beta-carotene (98%). At KNO_3 0.1 g/1 (10% of J/1 medium) and 20,000 lux light intensity, D. salina could accumulate carotenoid up to 137.2 pg/cell or 12% beta-carotene (ash free dry weight (AFDW)). The phosphate concentration and initial pH affected growth rate but did not significantly change the carotenoid content.

The outdoor mass culture of D. salina was conducted in 9.1 m^2 raceway pond with a paddle wheel for the water circulation. The cultivation provided specific growth rate of 0.15 or the doubling time of 4.62 days. The maximum biomass was 12.04 g-AFDW/m^2 at day 22. Algal cells were harvested and dried by the freeze dry method and oven drying method (70°C). The freeze dried algal powder contained significantly higher beta-carotene content (5.9% /AFDW) than the oven dried method (1.9% /AFDW).

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ชีววิทยาทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สรวิศ เผ่าทองศุข : การเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยง Dunaliella salina (CHLOROPHYCEAE) เพื่อผลผลิตเบตาคาโรทีน (STRAIN SELECTION AND CULTURE OF Dunaliella salina (CHLOROPHYCEAE) FOR BETA-CAROTENE PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษา : ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต อ.ที่ปรึกษาร่วม:ผศ.สุชนา วิเศษสังข์ 121 หน้า ISBN 974-582-373-2

การคัดเลือกสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยง Dunaliella salina ที่ให้ผลผลิตเบตาคาโรทีนสูงแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนคือ (1) การสำรวจภาคสนามและเก็บตัวอย่างน้ำจากนาเกลือในจังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา จันทบุรี และสมุทรสงคราม (2) คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเบตาคาโรทีนสูง (3) ทดลองหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเบตาคาโรทีนในห้องปฏิบัติการ และ (4) การเพาะเลี้ยงมหมวลในบ่อกลางแจ้ง พบว่าเมื่อความเค็มในนาเกลือสูงขึ้น ปริมาณไนเตรทและฟอสเฟตในน้ำจะเพิ่มขึ้นในขณะที่ pH ลดลง และจำนวนเซลล์ D. salina มีความหนาแน่นสูงสุด (1.5×10^4 cell/ml) ที่ความเค็ม 300 ppt จากการแยกสายพันธุ์ D. salina เพื่อการเพาะเลี้ยงจำนวน 6 สายพันธุ์จากน้ำนาเกลือจังหวัดสมุทรสงครามด้วยวิธี single cell isolation นำมาเพาะเลี้ยงแบบ monoclonal culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร J/1 ที่ 3 ระดับความเค็มคือ 10, 20 และ 30% NaCl (w/v) ความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ พบว่าสายพันธุ์ DS91008 ให้ปริมาณคาโรทีนอยด์สูงที่สุด 80.4 pg/cell ที่ความเค็ม 30% NaCl

การทดลองเลี้ยงสาหร่ายที่ความเข้มแสง 5,000, 10,000 และ 15,000 ลักซ์ พบว่า D. salina มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันแต่ปริมาณคาโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงสูงขึ้นและเซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีส้ม ในขณะที่การลดปริมาณไนเตรทจะทำให้อัตราการเจริญลดลงและปริมาณคาโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น วิเคราะห์พบว่าคาโรทีนอยด์เกือบทั้งหมด (98%) คือเบตาคาโรทีน ที่ระดับความเข้มข้นของ KNO_3 0.1 g/l (10% ของสูตร J/1) และความเข้มแสง 20,000 ลักซ์ D. salina สามารถสะสมคาโรทีนอยด์ได้ถึง 137.2 pg/cell หรือ 12% เบตาคาโรทีนต่อน้ำหนักแห้งที่ปราศจากเถ้า (ash free dry weight (AFDW)) สำหรับปริมาณฟอสเฟตและ pH มีผลต่ออัตราการเจริญแต่ไม่มีผลต่อปริมาณคาโรทีนอยด์

ทดลองเพาะเลี้ยง D. salina ในบ่อเลี้ยงสาหร่ายกลางแจ้งขนาด 9.1 m^2 ความลึก 20 ซม.มีใบพัดหมุนเวียนน้ำในบ่อให้มีสภาวะแวดล้อมสม่ำเสมอกัน ได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายเท่ากับ 0.15 หรือใช้เวลา 4.62 วันในการแบ่งเซลล์เป็นสองเท่า ได้ผลผลิตสาหร่ายสูงสุด 12.04 กรัม/ตรม.ในวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยง และได้เปรียบเทียบวิธีการทำสาหร่ายแห้งด้วยวิธี freeze dry และวิธีนำไปอบที่ 70° C พบว่าสาหร่ายแห้งที่ผ่านการ freeze dry จะมีปริมาณเบตาคาโรทีน 5.9% (AFDW) ในขณะที่สาหร่ายที่อบแห้งมีปริมาณเบตาคาโรทีนเพียง 1.9% (AFDW)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ... วิทยาศาสตร์ทางทะเล ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีววิทยาทางทะเล ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ..2535..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor Prof. Piamsak Menasveta and Asst. Prof. Suchana Wisessang for their advices and supports throughout this research, Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul and Dr. Wilaiwan Utoomprurkporn kindly serve as the thesis committee.

My acknowledgment is also expressed to Dr. Aran Incharoensakdi, Dr. Sanha Panichjayakul, Dr. Padermsak Jarayabhand for their useful suggestions; Dr. Avigad Vonshak kindly gave me opportunity to attend the algal biotechnology training course in Israel; Prof. A. Ben-Amotz, Prof. R.W. Hoshaw, Dr. M.A. Borowitzka and Ms. Haydee Montoya kindly supplied me the information of Dunaliella.

I would like to thank you Mr. Supot Sophachai, Miss Jira Promjaroen, Miss Saranya Phunpruek, Miss Pouranee Limpisut, Miss Busaya Apichaisathaienchote and friends in Marine Science Department for their help in laboratory works and, moreover, Mr.Tui, Tum and saa, staff of Angsila Marine Biological Station for the mass culture work.

Last but not least, the greatest gratitude to my parents, father, mother and grandfather for their understanding and encouragement.

This research was supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ministry of Science, Technology and Environment.

TABLE OF CONTENTS

Page

Engligh Abstract iv

Thai Abstract v

Acknowledgement vi

List of Tables viii

List of Figures ix

Chapters

I. Introduction 1

II. Materials and Methods 19

III. Results 29

IV. Discussions 70

V. Conclusion and recommendation 84

References 88

Appendix 98

Biographical data of author 119

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Location and characteristics of water samples....	30
2	Percent servival of the isolated D. salina in different salinity of ESM medium.....	31
3	Some environmental parameters in salt ponds at Samut Songkhram Province.....	34
4	Environmental condition during the outdoor cultivation.....	64
5	Effect of drying methods on Beta-carotene content in D. salina.....	69

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Picture of Dunaliella spp.....	7
2	Postulated pathway of all-trans and 9-cis Beta-carotene biosynthesis in D. bardawil.....	11
3	Electron micrograph of a section through Beta-carotene-rich D. bardawil.....	12
4	Map of the study sites.....	20
5	Rotary shaker illuminated with 8 white fluorescent lamps, at 80 rpm shaking speed.....	23
6	Construction design of the outdoor raceway pond..	27
7	Photomicrograph of orange D. salina cultured in 20%NaCl J/1 medium, 20,000 lux light intensity...	32
8	Greenish stage of D. salina cultured in 20% NaCl J/1 medium, 4,000 lux light intensity.....	32
9	D. viridis cultured in 20% NaCl J/1 medium at 15,000 lux light intensity.....	33
10	Correlation between pH and salinity in salt ponds at Samut Songkhram Province.....	34
11	Bubble graph represent correlation between salinity, nitrate concentration and the number of D. salina in salt evaporation ponds.....	35
12	Correlation between salinity, phosphate concentration and number of D. salina in salt evaporation ponds.....	35
13	Specific growth rate of D. salina clones cultured in J/1 medium at salinity 10% NaCl.....	37

Figure		Page
14	Carotenoid content of D. salina clones cultured in J/1 medium at salinity 10% NaCl.....	37
15	Specific growth rate of D. salina clones cultured in J/1 medium at salinity 20% NaCl.....	38
16	Carotenoid content of D. salina clones cultured in J/1 medium at salinity 20% NaCl.....	38
17	Specific growth rate of D. salina clones cultured in J/1 medium at salinity 30% NaCl.....	39
18	Carotenoid content of D. salina clones cultured in J/1 medium at salinity 30% NaCl.....	39
19	Specific growth rate of D. salina cultured in three light intensities.....	41
20	Carotenoid, Beta-carotene and Chlorophyll-a content of D. salina cultured in three light intensities.....	41
21	Absorption spectra of D. salina cultured in different light intensities.....	42
22	HPLC overlay chromatogram of D. salina	43
23	HPLC chromatogram of β-carotene isomer separation of greenish stage D. salina.....	44
24	HPLC chromatogram of β-carotene isomer separation of orange stage D. salina.....	45
25	Discriminant analysis for cell length and width of D. salina cultured in four light intensities.....	47
26	Effect of KNO_3 concentration in J/1 medium on specific growth rate of D. salina.....	48
27	Effect of KNO_3 concentration in J/1 medium on carotenoid content of D. salina.....	49

Figure		Page
28	Effect of KNO_3 concentration in J/1 medium on chlorophyll-a content of D. salina	50
29	Effect of KNO_3 concentration on carotenoid to chlorophyll-a ratio	51
30	Effect of KH_2PO_4 concentration in J/1 medium on specific growth rate of D. salina	53
31	Effect of KH_2PO_4 concentration on carotenoid content of D. salina	54
32	Effect of KH_2PO_4 concentration on chlorophyll-a content of D. salina	55
33	Effect of KH_2PO_4 concentration on carotenoid to chlorophyll-a ratio	56
34	Effect of pH on specific growth rate of D. salina	57
35	The pH variation throughout experiment	57
36	Effect of pH on carotenoid content of D. salina	58
37	Effect of pH on chlorophyll-a content of D. salina	59
38	Effect of pH on carotenoid to chlorophyll-a ratio of D. salina	60
39	Correlation between cell number and AFDW of D. salina	61
40	D. salina outdoor raceway pond	63
41	Four blade paddle wheel driven by moter and reducing gear for the water circulation	63
42	Growth curve of D. salina outdoor cultivation	64
43	Scatter plot of culture medium temperature and air temperature during the outdoor experiment	65

Figure		Page
44	Plotting between light intensity and dissolved oxygen in algal culture pond.....	66
45	Green D. viridis (small cell) contaminated in D. salina mass culture pond.....	68
46	D. salina was eaten by the protozoa. The algal cell could be seen as an orange spot inside the cell.....	68