การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูง

Screening of microalgae with high lipid production

วีนา ชูโชติ[1*] กิตติคุณ สุคันโธวงศ์[1] ธนิยา แซ่โอ้ว[1] และสันติสุข ขวัญศิริวณิช[1]

Weena Choochote Kittikoon Sucunthowong Thaniya Zeao and Suntisuk Kwansiriwanich

[1] คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

*Corresponding author, e-mail: kcweena@kmitl.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูง แบ่งเป็น 2 การทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ คือคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย 8 สายพันธุ์ ด้วยวิธีย้อมสีไนล์เรดและนำสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษาการเจริญและการผลิตไขมันจากการคัดเลือกด้วยวิธีย้อมสีไนล์เรด พบว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 มีปริมาณไขมันมากที่สุดและเมื่อเลี้ยง *Ankistrodesmus* sp. W53 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 15 ลิตร มีการให้อากาศและเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องให้แสงแบบต่อเนื่องที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 25 วัน พบว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 สามารถผลิตไขมันสูงสุดร้อยละ 26.09 ของน้ำหนักแห้ง มีปริมาณเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง 20.42×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 4.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในวันที่ 14 ของการทดลอง สรุปได้ว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 สามารถผลิตไขมันสูงสุดร้อยละ 26.09 ของน้ำหนักแห้งในวันที่ 14 ของการทดลอง ซึ่งบ่งชี้ว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 สามารถผลิตไขมันได้สูง และจะสามารถผลิตไขมันได้สูงขึ้นถ้าเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

คำสำคัญ: สาหร่ายขนาดเล็ก, ไขมัน, สีย้อมไนล์เรด, การสกัดไขมัน

Abstract

The aim of this study was to screen freshwater microalgae for high lipid production. The experimentation was performed twice, each was done in triplicate. Eight strains of microalgae were selected for lipid production by the Nile red method. The selected microalgae was studied on growth and lipid production. The results showed that *Ankistrodesmus* sp. W53 was the highest neutral lipid by the Nile red method. After cultivation in bioreactor containing 15 L of BG-11 with aeration at room temperature under continuous illumination (light intensity of 3,500 Lux), *Ankistrodesmus* spp. W53 showed the highest total lipid content of 26.09% wt on 14th day of cultivation. The cell concentration and cell dry weight were 20.42×10^4 cells/ml and 4.6 g/l, respectively. The results indicated that *Ankistrodesmus* sp. W53 exhibited high lipid production. Lipid production could also be increased by optimization of culture conditions.

Keyword: Microalgae, Lipid, Nile red, Lipid extraction.

บทนำ

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีทุกสภาวะแวดล้อม มีลักษณะโครงสร้างของเซลล์ การผลิตสารอินทรีย์ หรืออาหารสะสมแตกต่างกัน โดยทั่วไปภายในเซลล์สาหร่ายประกอบด้วยสารอาหารประเภทโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรท สารสีและสารอื่นๆ ดังนั้นสาหร่ายขนาดเล็กจึงเป็นแหล่งผลิตสารธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ปัจจุบันนี้มีการนำชีวมวลของสาหร่ายมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารสำหรับสัตว์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและอาหารเสริมสุขภาพ (Li *et al*., 2007) มีการนำสารสกัดจากสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ เช่น สารสีแคโรทีนอยด์ ไฟโคบิลิน กรดไขมัน พอลิแซ็กคาไรด์และวิตามิน (Gouveia *et al*., 2007)

สาหร่ายขนาดเล็กแต่ละชนิดมีปริมาณไขมันต่างกัน สาหร่ายที่มีปริมาณไขมันสูงส่วนใหญ่มีปริมาณน้ำมัน 30-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Yen *et al*., 2013) ไขมันของสาหร่ายมีลักษณะคล้ายน้ำมันพืชคือมีส่วนประกอบที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ ไขมันที่พบในสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว มีจำนวนคาร์บอน 16-18 อะตอมต่อโมเลกุล ในสภาวะปกติสาหร่ายจะสะสมอาหารในรูปของแป้ง แต่เมื่ออยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหารสาหร่ายจะสะสมอาหารในรูปของไขมันทั้งที่เยื่อหุ้มเซลล์และภายในเซลล์ ไขมันสะสมอยู่ในรูปอนุพันธ์ของกลีเซอรอล ฟอสโฟไลปิดและไกลโคไลปิด (Thomson, 1996) สาหร่ายบางสายพันธุ์สามารถสร้างกรดไขมันจำเป็น (polyunsaturated fatty acids) ที่มีคุณภาพสูงเป็นจำนวนมากและเป็นประเภทเดียวกับที่พบในน้ำมันปลา (fish oil) เช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlorella minutissima* มีปริมาณกรดไอโคซาเพนทาอีโนอิก (eicosapentaenoic, EPA) มากกว่าร้อยละ 90 ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Guschina and Harwood, 2006)

สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันค่อนข้างสูง สามารถที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซลได้ การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก โดยทั่วไปสามารถทำได้ 3 วิธีดังนี้ วิธีทีหนึ่ง สกัดน้ำมันจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วเปลี่ยนเป็นน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเช่น กรด เบส หรือเอนไซม์ วิธีที่สองผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากชีวมวลของสาหร่ายโดยตรง โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในสภาวะความดันบรรยากาศและอุณหภูมิห้อง และวิธีที่สาม เป็นการเปลี่ยนชีวมวลของสาหร่ายเป็นน้ำมันดีเซลที่ความดันสูง และอุณหภูมิสูงโดยไม่ต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยา (Chen *et al*., 2012)

ปัจจุบันนี้น้ำมันปิโตรเลียมที่กลั่นมาจากแหล่งฟอสซิลมีเหลืออยู่ในปริมาณจำกัด ซึ่งการเผาไหม้น้ำมันเชื้อเพลิงเหล่านี้ทำให้เกิดปัญหาภาวะเรือนกระจก สาหร่ายขนาดเล็กสามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ เนื่องจากสาหร่ายมีการเจริญเติบโตโดยการสังเคราะห์แสง ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นที่สนใจที่จะใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคต (Brennan and Owende, 2010) สาหร่ายเหล่านี้สามารถเจริญได้ดีในสารอาหารที่มีราคาถูก สามารถควบคุมการเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูง จึงเพิ่มชีวมวลได้ง่ายและรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับพืชพลังงานอื่นๆ การที่สาหร่ายสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและผลิตไขมันปริมาณมากนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ระบบและสภาวะของการเพาะเลี้ยง (Chisti, 2007) สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่างและความเข้มแสง แต่เมื่อสาหร่ายเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่นการขาดแคลนธาตุอาหารประเภทไนโตรเจนจะทำให้สาหร่ายสะสมปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น (Dean et al., 2010)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูงด้วยวิธีย้อมสีไนล์เรด ศึกษาการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่ายสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากวิธีย้อมสีไนล์เรด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์สาหร่าย

Ankistrodesmus sp. W53, *Chlamydomonas* sp. W53, *Chlorella* sp. ED54, *Oocystis* sp. W53, *Scenedesmus* sp. W53 และ *Euglena* sp. W53 จากคลังเก็บสาหร่าย สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง *Chlorella* sp. RW54 คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ *Chlorella vulgaris* จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การคัดเลือกสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมัน

2.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

นำเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์ทั้ง 8 สายพันธุ์จากหลอดอาหารเอียงมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (เชื้อสาหร่าย 1 หลอดอาหารเอียง ต่อ 1 ฟลาสก์) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้ม 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสาหร่ายในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การศึกษาการเจริญ

นำหัวเชื้อสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์จากข้อ 2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร (ค่าดูดกลืนแสง 0.3 ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 2 มิลลิลิตร ทุก 2 วัน นำไปวิเคราะห์การเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ชนิด Improve neubauer จนกระทั่งสาหร่ายเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2.3 การตรวจสอบปริมาณไขมันที่มีอยู่ในเซลล์สาหร่าย

นำสาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์จากข้อ 2.2 ที่เจริญจนเข้าสู่ระยะคงที่มาตรวจสอบปริมาณไขมันภายในเซลล์ด้วยการย้อมสีไนล์เรด (ดัดแปลงจาก Chen *et al.*, 2009) โดยเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายทุกฟลาสก์ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสีย้อมไนล์เรดความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำเซลล์สาหร่ายไปตรวจสอบปริมาณไขมันด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Nikon:80i) ถ้ามีไขมันจะเห็นการเรืองแสงสีเหลือง

2.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตไขมัน

นำสาหร่ายจากการตรวจสอบด้วยวิธีย้อมสีจากข้อ 2.3 ที่มีปริมาณไขมันมากที่สุด มาเพาะเลี้ยงในถังเลี้ยงสาหร่ายขนาด 20 ลิตร 1 ถัง โดยเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร BG-11 ปริมาตร 15 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อสาหร่ายเริ่มต้นร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7 ที่อุณหภูมิห้อง เพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศให้แสงแบบต่อเนื่องโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 16 วันเก็บตัวอย่างครั้งละ 20 มิลลิลิตร ทุก 2 วัน เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดปริมาณคลอโรฟิลล์และวัดปริมาณไขมันภายในเซลล์ด้วยวิธีสกัดโดยใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ในสภาวะเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออกจะเหลือเพียงไขมันที่สกัดได้ นำไปชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาค่าร้อยละของไขมัน (Bligh and Dyer, 1959)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกสาหร่ายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไขมัน

การศึกษาการเจริญ

จากการศึกษาการเจริญในระดับฟลาสก์ พบว่าส่วนใหญ่สาหร่ายทั้ง 8 สายพันธุ์เจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 10 ของการทดลอง ยกเว้น *Chlorella* sp. ED54 และ *Scenedesmus* sp. W53 เข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 12 และ 32 ของการทดลองตามลำดับ จากการทดลองพบว่า *Scenedesmus* sp. W53 มีปริมาณเซลล์มากที่สุด รองลงมาคือ *Ankistrodesmus* sp. W53 และ *Chlorella* sp. ED54 มีปริมาณเซลล์ 14.167 $X10^5$, 6.883$X10^5$ และ6.025 $X10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 32, 10 และ 12 ของการทดลองตามลำดับ (Table 1) *Scenedesmus* sp. W53 มีปริมาณเซลล์มากที่สุดอาจเนื่องจาก *Scenedesmus* sp. W53 ใช้สารอาหารในการเจริญน้อยหรือสูตรอาหาร BG 11 ไม่เหมาะต่อการเจริญจึงทำให้ระยะเวลาที่เข้าสู่ระยะคงที่นานกว่าสายพันธุ์อื่น นอกจากนั้นการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ขึ้นกับสายพันธุ์สาหร่ายและสภาวะการเลี้ยง (Chisti, 2007)

การตรวจสอบปริมาณไขมันที่มีอยู่ในเซลล์สาหร่าย

นำสาหร่ายขนาดเล็กทั้ง 8 ชนิดมาตรวจสอบปริมาณไขมันภายในเซลล์ด้วยการย้อมสีไนล์เรด พบว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 มีหยดน้ำมันมากที่สุด (Fig.1) รองลงมาคือ *Chlorella* sp. ED54 และ *Chlamydomonas* sp. W53 วิธีย้อมสีไนล์เรดเป็นวิธีตรวจวัดการสะสมไขมันภายในเซลล์ของสาหร่ายที่รวดเร็วและมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันแบบเดิม (Huang *et al*., 2009) ดังเช่นที่มีการศึกษาใน *Chlorella* sp. (White *et al*., 2010; Wilkie *et al*., 2011) *Chlorella vulgaris* (Govender *et al*., 2012), *Chlamydomonas reinhardtii* (Gabriel *et al*., 2010; Msanne *et al*., 2012; Lv *et al*., 2013, Ramanan *et al*.,2013), *Dunaliella primolecta* และ *Chaetoceros calcitrans* (Govender *et al*., 2012), *Ankistrodesmus* sp. (Wilkie *et al*.,2011) และ *Botryococcus braunii* BOT-22 (Sakamoto, *et al*., 2012) จากการทดลองนี้พบว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 มีปริมาณหยดน้ำมันมากที่สุด จึงนำ *Ankistrodesmus* sp. W53 มาศึกษาการเจริญและการผลิตไขมัน

Table 1 Growth of microalgae in BG 11 medium

Microalgae	Stationary phase (day)	Cell content (10^5 cells/ml)
Ankistrodesmus sp. W53	10	6.883
Chlamydomonas sp. W53	10	4.917
Chlorella sp. ED54	12	6.025
Chlorella sp. RW54	10	5.317
Chlorella vulgaris	10	5.017
Scenedesmus sp. W53	32	14.167
Oocystis sp. W53	10	3.300
Euglena sp. W53	10	5.058

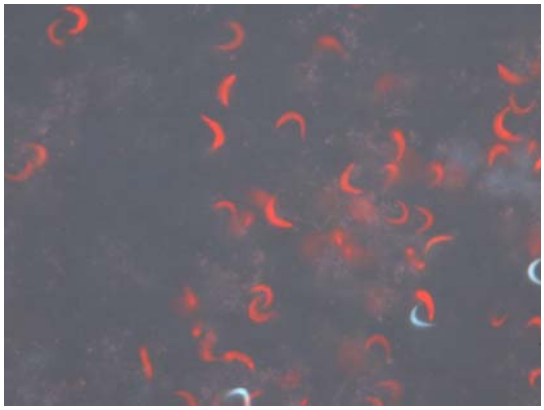

Fig. 1 *Ankistrodesmus* sp. W53 with fluorescent Nile red (40X)

การศึกษาการเจริญและการผลิตไขมัน

ศึกษาการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่าย *Ankistrodesmus* sp. W53 ในถังเลี้ยงสาหร่ายขนาด 20 ลิตร ที่มีอาหารเหลว สูตร BG-11 ปริมาตร 15 ลิตร จากการทดลองพบว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 มี การเจริญสูงสุดในวันที่ 10 ของการทดลอง มีปริมาณเซลล์ 31.58X10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ 1.821 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้ง 3.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณไขมันร้อยละ 5.77 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่พบว่า *Ankistrodesmus* sp. W53 มีการผลิตไขมันมากที่สุดร้อยละ 26.09 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ปริมาณไขมันทั้งหมด 1.2 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 14 ของการทดลอง แต่มีการเจริญลดลง คือมีปริมาณเซลล์ 20.42X10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลล์ 1.536 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้ง 4.6 กรัมต่อลิตร (Fig.2) แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *Ankistrodesmus* sp. W53 มีการสะสมปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่การเจริญคงที่ การขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนจะกระตุ้นให้เกิดการสะสมไขมัน (Feng *et al*., 2012) ดังนั้นการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัด สาหร่ายจะมีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น (Roleda *et al*., 2013) การเจริญและการผลิตไขมัน

ของสาหร่ายขนาดเล็กขึ้นกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายเช่น ความเข้มข้นของธาตุอาหาร อุณหภูมิ ความเข้มแสงและระยะเวลาในการให้แสง ดังการทดลองของ Kalita *et al.* (2011) รายงานว่า *Ankistrodesmus falcatus* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BB เจริญดีกว่าอาหารสูตร BG 11 และมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 45.2 ในวันที่ 24 ของการทดลอง สภาวะที่แหล่งฟอสฟอรัสจำกัด *Ankistrodesmus falcatus* มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น ไขมันส่วนใหญ่เป็นประเภทไตรกลีเซอไรด์ (Kilham *et al.*, 1997) ความเข้มแสงก็มีผลในการผลิตไขมันเช่นกันซึ่ง Sakamoto *et al.*, (2012) ตรวจสอบปริมาณไขมันภายในเซลล์ด้วยการย้อมสีไนล์เรดและรายงานว่าการเพิ่มความเข้มแสงในการเลี้ยง *Botryococcus braunii* BOT-22 ทำให้มีปริมาณหยดไขมันเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในสภาวะที่มีสารอาหารจำกัด สาหร่ายจะมีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้น (Roleda *et al.*, 2013) กรดไขมันที่พบใน *Ankistrodesmus braunii* ส่วนใหญ่คือกรดปาล์มมิติก โอเลอิก และไลโนเลนิก กรดไขมันที่พบส่วนน้อยคือกรดคาไพรลิก คาพริก ปาล์มมิโตเลอิก และลอริก (Williams and McMillan,1961)

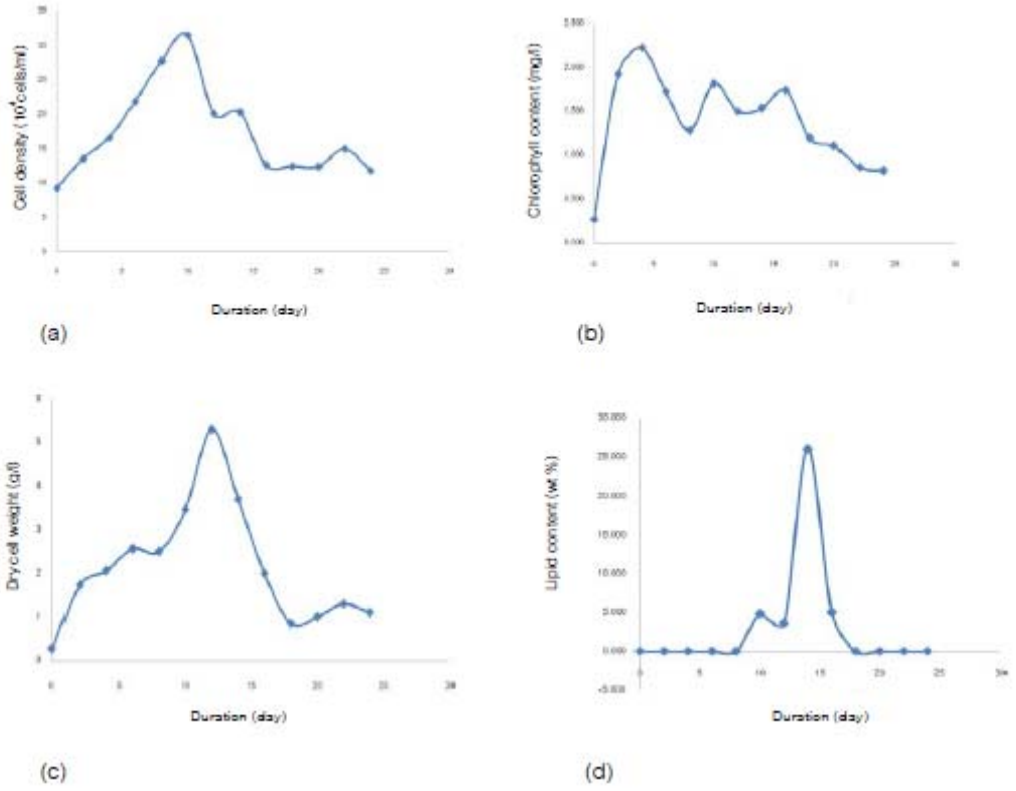

Fig.2 Growth and lipid production of *Ankistrodesmus* sp. W53 a. cell density b. chlorophyll content c. dry cell weight d. lipid content

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็ก 8 สายพันธุ์ด้วยการตรวจปริมาณไขมันด้วยวิธีย้อมสีไนล์เรดพบว่า *Ankistrodesmus* spp. W53 สามารถผลิตไขมันได้สูงสุด เมื่อนำ *Ankistrodesmus* sp. W53 มาเลี้ยงในถังปฏิกรชีวภาพ ที่มีปริมาตรอาหาร 15 ลิตรมีการให้อากาศและให้แสงต่อเนื่องเป็นเลา 25 วัน พบว่า *Ankistrodesmus* spp. W53 สามารถผลิตไขมันได้สูงสุดร้อยละ 26.09 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีปริมาณเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง 20.42 X 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและ 4.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

Brennan, L. and Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew. Sust. Energy Rev. 14: 557 – 577.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Canadian J. Biochem. and Physiol. 37: 911–917.

Chen, L., Liu, T., Zhang, W., Chen, X. and Wang, J. 2012. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. Bioresour. Techol. 111: 208 – 214.

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. and Hu, Q. 2009. A high throughout Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. J. Microbiol. Method 77 (1): 41–47.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. 25: 294– 306.

Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K. 2010 Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae Bioresour. Technol . 101: 4499 – 4507.

Feng, P., Deng, Z., Hua, Z., Fan, L. 2012. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. J. Biosci. Bioeng 114 : 405– 410.

Gabriel O.J., Charles HH., Warwick H., Hancai C., Farzaneh K., Dean P.G., Michael A.D. 2010. Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. Bioresour. Technol. 102:3343 – 3351.

Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F.M., Mrejen, S., Cardosp, M.T., Palavra,A.F. and Mendes, R.L. 2007. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO_2. Food Chem. 101: 717-723.

Govender T., Ramanna L., Rawat I., Bux F. 2012. BODIPY staining, an alternative to the Nile red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. Bioresour. Technol. 114 : 507 – 511.

Guschina, I.A. and Harwood, J.L. 2006. Lipid and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog. Lipid. Res. 45: 160-186.

Huang, G., Chen, G., and Chen, F. 2009. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. Biomass and Bioenergy. 33 : 386 - 392.

Kalita, N., Baruah, G., Goswami, R.C.D., Talukdar, J., and Kalita, M.C. 2011. *Ankistrodesmus falcatus* : A promising candidate for lipid production , its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity. J. Microbiol. Biotechnol. Res. 1(4): 148-157.

Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Goulden, C.E., and Lynn, S.G. 1997. Effect of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. Freshwater Biol. 38: 591-596.

Lv, H., Qu, G., Qi, X., Lu, L., Tian, C., and Ma, Y. 2013. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. Genomics. 101 : 229 – 237.

Msanne, J., Xu, D., Konda, A.R., Casas-Mollano, J,A., Awada, T., Cahoon, E.B., and Cerutti, H. 2012. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. Phytochem. 75 : 50 – 59.

Ramanan, R., Kim, B.H., Cho, D.H., Ko, S.R., Oh, H.M., and Kim, H.S. 2013. Lipid droplet synthesis is limited by acetate availability in starchless mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett. J. 587:370 – 377.

Roleda, M.Y., Slocombe, S.P., Day, J.G., Bell, E.M. and Stanley, M.S. 2013. Effects of Temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. Bioresour. Technol. 129: 439-449.

Sakamoto,K., Baba, M., Suzuki, I., Watanabe, M.M., and Shiraiwa, Y. 2012. Optimization of light for growth, photosynthesis and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii* BOT-22. Bioresour. Technol. 110: 474-479.

Thomson, G.A.Jr. 1996. Lipids and membrane function in green algae. Biochim. Biophys. Acta. 1302 (1):17-45.

White, S., Anandraj, A., and Bux, F. 2010. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitorcellular neutral lipids. Bioresour. Technol. 102:1675 – 1682.

Wilkie, A.C., Edmundson, S.J., Duncan, J.G. 2011. Indigenous algae for local Bioresour. production : Phycoprospecting. Energy Sustain. Development. 15 : 365 – 371.

Williams, V.R. and McMillan, R. 1961. Lipids of *Ankistrodesmus braunii*. Science. 133: 459-460.

Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J., and Chang, J.S. 2013. Microalgae-based biorefinery – from biofuels to natural products. Bioresour. Technol. 135:166-174.