วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2561 : 36 (1) : 77-86

ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็กที่มีต่อการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus dimorphus*

Effect of Nitrogen : Iron Ratio on Growth and Lipid Production of Green Alga, *Scenedesmus dimorphus*

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์[1] และจันทรา ดีมาก[2]
Suneerat Ruangsomboon[1] and Jantra Deemak

บทคัดย่อ

การเลี้ยงสาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* นอกห้องปฏิบัติการ ในอาหารที่ผันแปรอัตราส่วนของไนโตรเจน (N) ต่อเหล็ก (Fe) วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (5x5) โดยมีปริมาณไนโตรเจน (KNO_3) และเหล็ก ($FeSO_4.7H_2O$) อย่างละ 5 ระดับคือ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เท่า ของอาหารสูตร *Chlorella* medium (ชุดควบคุมเทียบเป็น 1.0 เท่า) พบว่าที่ N:Fe 0.5:0.1 เท่า สาหร่ายมีผลผลิตชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 3.40±0.38 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ N:Fe 2.0:1.0 เท่า สาหร่ายมีปริมาณไขมันสูงที่สุดคือ 30.48±0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ N:Fe 2.0:2.0 เท่า สาหร่ายมีผลผลิตไขมันสูงที่สุดคือ 0.83±0.05 กรัมต่อลิตร และที่ N:Fe 2.0:0.1 เท่า สาหร่ายมีกำลังการผลิตไขมันมากที่สุดเท่ากับ 22.79±1.19 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ผลการทดลองแสดงว่า N และ Fe มีปฏิสัมพันธ์กันต่อการเจริญจำเพาะ ชีวมวล ปริมาณไขมัน และกำลังการผลิตไขมัน ของสาหร่าย *S. dimorphus* ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *S. dimorphus* มีผลผลิตไขมันสูง สามารถใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกในการนำมาเป็นแหล่งผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้

คำสำคัญ : ไนโตรเจน เหล็ก ไขมัน แฟคทอเรียล ซีนีเดสมัส ไดมอร์ฟัส

Abstract

The ratio of nitrogen (N) to iron (Fe) on growth and lipid accumulation of *Scenedesmus dimorphus* was studied during outdoor cultivation. The experiment was performed as factorial design (5x5) with 5 concentrations of nitrogen (KNO_3) and iron ($FeSO_4.7H_2O$) as followed; 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 times. The concentration of N and Fe in *Chlorella* medium was used as the control (1.0 times N and Fe). The maximum biomass of *S. dimorphus* was 3.40±0.38 g/L when it was cultivated in N:Fe 0.5:0.1 times. The maximum lipid content 30.48±0.85 % was obtains in alga under N:Fe 2.0:1.0 times. The maximum lipid yield (0.83±0.05 g/L) and lipid productivity (22.79±1.19 g/L/d) were obtained in alga under N:Fe 2.0:2.0 and 2.0:0.1 times, respectively. The result showed the interaction of nitrogen and iron on specific growth rate, biomass, lipid content and lipid productivity of *S. dimorphus*. The present study indicated *S. dimorphus* is high lipid productivity, which can be used as an potential source for biodiesel production.

Keywords: nitrogen, iron, lipid, factorial, *Scenedesmus dimorphus*

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[2]ศูนย์วิจัยร่วมภาครัฐและเอกชน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป ต้องใช้ระยะเวลานานในการสร้างขึ้นมาใหม่ทดแทน การใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลยังส่งผลให้เกิดปัญหาการเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ ซึ่งส่งผลให้ภาวะโลกร้อนมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น จึงเป็นแรงผลักดันให้นักวิจัย พยายามหาแหล่งอื่นมาทดแทนเชื้อเพลิงที่กำลังหมดไป (Liu *et al.,* 2012) โดยเชื้อเพลิงเหลวเป็นเชื้อเพลิงที่มีความต้องการสูงเพราะนิยมใช้ในเครื่องจักรของโรงงานอุตสาหกรรมและยานพาหนะส่วนใหญ่ โดยเชื้อเพลิงทางเลือกที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบันคือไบโอดีเซล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ในอดีตผลิตได้จากน้ำมันถั่วเหลือง ปาล์ม สบู่ดำและพืชน้ำมันต่างๆ เป็นต้น โดยต้องผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (Trans-esterification) เพื่อเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล (Nigam *et al.,* 2011) แต่ปัญหาพบว่าพืชต่าง ๆ เหล่านั้นจำเป็นต้องใช้ที่ดินที่ค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ในการเพาะปลูก จึงมีการบุกรุกพื้นที่ป่าตามมา นอกจากนี้พืชบางชนิดยังเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสำหรับมนุษย์ เมื่อเปลี่ยนไปเป็นแหล่งผลิตพลังงาน จึงทำให้อาหารมนุษย์มีราคาสูงมาก–ขึ้น จึงมีการต่อต้านการนำพืชเหล่านี้ไปเป็นวัตถุดิบสำหรับแหล่งพลังงาน

ด้วยสาเหตุนี้นักวิจัยทั่วโลกจึงพยายามหาแหล่งวัตถุดิบแหล่งใหม่ซึ่งไม่กระทบต่อมนุษย์ โดยพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่ที่ไม่อุดมสมบูรณ์ก็สามารถเพาะเลี้ยงได้ สาหร่ายเจริญเติบโตได้เร็ว (Converti *et al.,* 2009; Liu *et al.,* 2012) นอกจากนี้ในระหว่างที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายยังดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งสามารถช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศและช่วยแก้ปัญหาภาวะเรือนกระจกได้อีกด้วย (Mandal and Mallick, 2009) และยังพบว่าแม้ปริมาณน้ำมันที่ผลิตจากสาหร่ายจะมีเปอร์เซ็นต์ประมาณ 20 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าพืชบก แต่เมื่อเทียบที่ระยะเวลาและพื้นที่การเพาะเลี้ยงหรือเพาะปลูกที่เท่ากัน สาหร่ายจะให้ชีวมวลที่สูงกว่าจึงให้ผลผลิตไขมันสูงกว่าพืชบก (Chisti, 2007)

สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Scenedesmus dimorphus* เป็นสาหร่ายที่พบในแหล่งน้ำจืดโดยทั่วไป มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย จึงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้สูง โดยพบรายงานว่าสาหร่ายสกุลนี้มีไขมันประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ (Singh and Gu, 2010) โดยปริมาณไขมันในสาหร่ายสามารถผันแปรเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ตามสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Liu *et al.,* 2012) ทั้งทางด้านกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ หรือด้านเคมี เช่น ธาตุอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยไนโตรเจน (N) ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) มีหน้าที่ช่วยในการสร้างรงควัตถุ กรดนิวคลิอิก ช่วยในการทำงานเอมไซม์นั้น พบว่าสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการไนโตรเจนที่จะทำให้มีปริมาณไขมันในสาหร่ายสูงสุดในปริมาณที่แตกต่างกัน (Converti *et al*., 2009; Hsieh and Wu, 2009) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าสาหร่ายสกุล *Scenedesmus* สามารถสะสมปริมาณไขมันภายในเซลล์ได้มากเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่นสภาวะการขาดไนโตรเจน (Chen *et al.,* 2012) โดยการขาดไนโตรเจนในอาหารจะมีผลต่อปริมาณไขมันเนื่องจากมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งทำให้เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์น้ำมันทำงานได้ดีขึ้น (Shen *et al.,* 2009)

ส่วนเหล็ก (Fe) ซึ่งเป็นธาตุอาหารรอง (Micronutrients) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุ การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงและการหายใจ ถ้าขาดเหล็กจะทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงและปริมาณอาหารสะสมลดลงด้วย (Lin *et al*., 2012) โดยสาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการเหล็กที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตหรือสร้างไขมันในปริมาณที่แตกต่างกัน (Liu *et al*., 2008; Wang *et al*., 2010)

สาหร่ายมีความต้องการทั้งไนโตรเจนและเหล็กในการเจริญเติบโต โดยพบว่าได้มีการศึกษาระดับที่เหมาะสมของไนโตรเจนหรือของเหล็กต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิด *S. dimorphus* นี้ไว้แล้ว (จิรรัตน์ และ สุนีรัตน์, 2556; วัฒนา และสุนีรัตน์, 2556) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ของธาตุอาหารสองชนิดนี้ต่อสาหร่าย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาปฏิสัมพันธ์ของไนโตรเจนและเหล็กที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. dimorphus เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้สำหรับเป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซลต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่าย

เพาะเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่าย *S. dimorphus* strain KMITL ที่คัดแยกโคโลนีเดี่ยวมาจากบ่อเลี้ยงปลา ด้วยอาหารสูตร *Chlorella* medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±0.5 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อใช้สาหร่ายเป็นหัวเชื้อในการศึกษาขั้นต่อไป

2. ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร *Chlorella* medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้อาหารสูตรปกตินี้เป็นชุดควบคุม เทียบปริมาณไนโตรเจนและเหล็กในสูตรปกติเป็น 1.0 เท่า และทำการผันแปรปริมาณไนโตรเจนและเหล็กในอาหารนี้อย่างละ 5 ระดับ ใช้แผนการทดลองแบบ Factorial (5x5) โดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจน (KNO_3) 5 ระดับคือ 0.1, 0.5, 1.0 (ชุดควบคุม), 1.5 และ 2.0 เท่า หรือเทียบเท่ากับ KNO_3 ที่ 0.125, 0.625, 1.250 (ชุดควบคุม), 1.875, 2.50 กรัมต่อลิตร และผันแปรเหล็ก ($FeSO_4.7H_2O$) 5 ระดับคือ 0.1, 0.5, 1.0 (ชุดควบคุม), 1.5 และ 2.0 เท่า หรือเทียบเท่ากับ $FeSO_4$ ที่ 0.005, 0.025, 0.050 (ชุดควบคุม), 0.075, 0.10 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ ได้รับแสงและอุณหภูมิตามธรรมชาติ โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงมีความเข้มแสงในช่วงเวลากลางวันเฉลี่ย 20.45 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิรอบวันเฉลี่ย 29-33 องศาเซลเซียส (วัดในรอบวันทุกสองชั่วโมง และหาค่าเฉลี่ยต่อวัน) เพาะเลี้ยงจนเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (ประมาณ 30 วัน, Fig.1C N:Fe 1.0:1.0 เท่า) วิเคราะห์น้ำหนักแห้ง (ชีวมวล) ทุก 2 วัน โดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณไขมันในสาหร่ายที่สิ้นสุดการทดลอง ตามวิธีของ Bligh and Dyer (1959) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติและปฏิสัมพันธ์ของข้อมูลทั้งหมดด้วยวิธี ANOVA: two factor with replication และ ANOVA: single factor โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel 2013 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

สาหร่าย *S. dimorphus* ที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับอัตราส่วนของ N:Fe แตกต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงในความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 5 ระดับ โดยลดลงจากสูตรปกติ 0.1 และ 0.5 เท่า และเพิ่มจากสูตรปกติ 1.5 และ 2.0 เท่า พบว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.09±0.00 ต่อวัน ในสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 1.0:0.1 เท่า โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของ N:Fe 0.1:0.1, 0.1:0.5, 0.1:1.5, 1.5:0.1, 1.5:0.5, 1.5:1.5, 1.5:2.0, 2.0:0.5, 2.0:1.0, 2.0:2.0 เท่า ($p<0.05$) (Table 1)

ในทุกชุดการทดลอง สาหร่ายมีการเจริญเติบโต (ชีวมวล) เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น และมีการผันแปรของชีวมวลค่อนข้างสูง ในชุดที่ได้รับไนโตรเจน 0.1 เท่า และผันแปรเหล็กระดับต่าง ๆ ทุกระดับ (Figure 1A) โดยที่สิ้นสุดการทดลองพบว่าสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 0.5:0.1 เท่า มีชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 3.40±0.38 กรัมต่อลิตร (Figure. 1B, Table 1) แต่พบว่าน้ำหนักสูงสุดของชุดการทดลองนี้จะพบที่วันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนัก 3.82±0.32 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงว่าสาหร่ายในชุดการทดลองนี้เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ ที่ 28 วันของการเพาะเลี้ยง และที่ 30 วัน คือสาหร่ายเข้าสู่ระยะการตาย น้ำหนักของสาหร่ายจึงลดลง โดยการควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้คงที่ที่ 0.5 เท่า และผันแปรเหล็ก พบว่าเมื่อเหล็กมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น สาหร่ายมีแนวโน้มที่จะมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าปริมาณเหล็กนั้นอาจมากเกินไป ไม่สมดุลกับปริมาณไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 Biomass and lipid production of *S. dimorphus* cultured in *Chlorella* medium under different N:Fe ratios.

N (Times)	Fe (Times)	μ (/day)	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Lipid yield (g/L)	Lipid productivity (mg/L/d)
0.1	0.1	0.04±0.01^{ab}	1.48±0.41^{a}	18.00±0.08^{cde}	0.21±0.01^{a}	8.00±1.26^{abcd}
	0.5	0.04±0.01^{ab}	1.24±0.12^{a}	16.38±0.04^{bc}	0.20±0.00^{a}	6.19±0.76^{ab}
	1.0	0.05±0.00^{abc}	1.91±0.08^{a}	12.75±0.05^{a}	0.25±0.00^{ab}	6.45±0.19^{abc}
	1.5	0.03±0.00^{a}	2.43±0.42^{ab}	12.27±0.11^{a}	0.27±0.00^{ab}	3.90±0.14^{a}
	2.0	0.05±0.00^{abc}	1.73±0.11^{a}	12.56±0.01^{a}	0.23±0.00^{a}	6.40±0.15^{abc}
0.5	0.1	0.07±0.00^{abc}	3.40±0.38^{b}	14.90±0.13^{b}	0.50±0.00^{abcd}	10.32±0.19^{abcde}
	0.5	0.06±0.00^{abc}	2.30±0.23^{ab}	17.62±0.14^{cde}	0.38±0.01^{ab}	10.23±0.52^{abcde}
	1.0	0.06±0.00^{abc}	2.14±0.08^{ab}	17.03±0.40^{cd}	0.36±0.00^{ab}	10.39±0.21^{abcde}
	1.5	0.07±0.00^{abc}	2.00±0.36^{ab}	17.29±0.66^{cde}	0.33±0.02^{ab}	12.22±0.36^{abcdef}
	2.0	0.05±0.00^{abc}	1.91±0.25^{a}	17.46±0.60^{cde}	0.34±0.01^{ab}	9.57±0.59^{abcde}
1.0	0.1	0.09±0.00^{c}	2.26±0.38^{ab}	21.89±0.15^{hi}	0.48±0.05^{ab}	20.59±1.10^{fg}
	0.5	0.07±0.01^{abc}	2.49±0.39^{ab}	22.85±0.57^{i}	0.60±0.04^{ab}	17.00±1.28^{efg}
	1.0	0.07±0.00^{abc}	2.73±0.47^{ab}	21.92±0.54^{hi}	0.66±0.04^{ab}	15.88±1.11^{defg}
	1.5	0.05±0.00^{abc}	2.48±0.43^{ab}	21.88±0.15^{hi}	0.60±0.03^{ab}	12.00±0.71^{abcdef}
	2.0	0.06±0.00^{abc}	2.98±0.19^{ab}	21.04±0.15^{ghi}	0.66±0.00^{ab}	12.23±0.43^{abcdef}
1.5	0.1	0.04±0.01^{ab}	2.05±0.30^{ab}	19.14±0.29^{efg}	0.40±0.02^{ab}	6.91±1.25^{abc}
	0.5	0.05±0.01^{ab}	2.39±0.23^{ab}	20.30±0.09^{fgh}	0.49±0.02^{abcd}	9.27±1.16^{abcde}
	1.0	0.07±0.00^{abc}	2.16±0.23^{ab}	18.62±0.04^{def}	0.40±0.01^{ab}	12.20±0.58^{abcdef}
	1.5	0.04±0.00^{ab}	1.91±0.13^{a}	17.98±0.06^{cde}	0.33±0.00^{ab}	7.29±0.61^{abc}
	2.0	0.04±0.00^{ab}	2.57±0.22^{ab}	18.59±0.15^{def}	0.46±0.01^{abc}	6.92±0.60^{abcd}
2.0	0.1	0.08±0.00^{bc}	1.80±0.31^{a}	29.21±0.54^{jk}	0.56±0.04^{bcde}	22.79±1.19^{g}
	0.5	0.05±0.00^{ab}	2.76±0.70^{ab}	28.19±0.49^{j}	0.78±0.12^{de}	12.77±1.36^{abcdef}
	1.0	0.05±0.00^{ab}	2.61±0.08^{ab}	30.48±0.85^{k}	0.78±0.02^{de}	14.88±0.92^{bcdefg}
	1.5	0.05±0.00^{abc}	3.37±0.42^{b}	27.74±0.38^{j}	0.75±0.03^{cde}	15.16±1.61^{cdefg}
	2.0	0.04±0.00^{ab}	3.05±0.29^{b}	27.43±0.40^{j}	0.83±0.05^{e}	12.22±0.49^{abcdef}

Values are mean ± S.D. within the same column, significant differences are indicated by different superscripts (p< 0.05).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This document is provided for educational purposes only and may not be used for commercial purposes. Any modification of the content is prohibited, and the author must be credited in all cases of use.

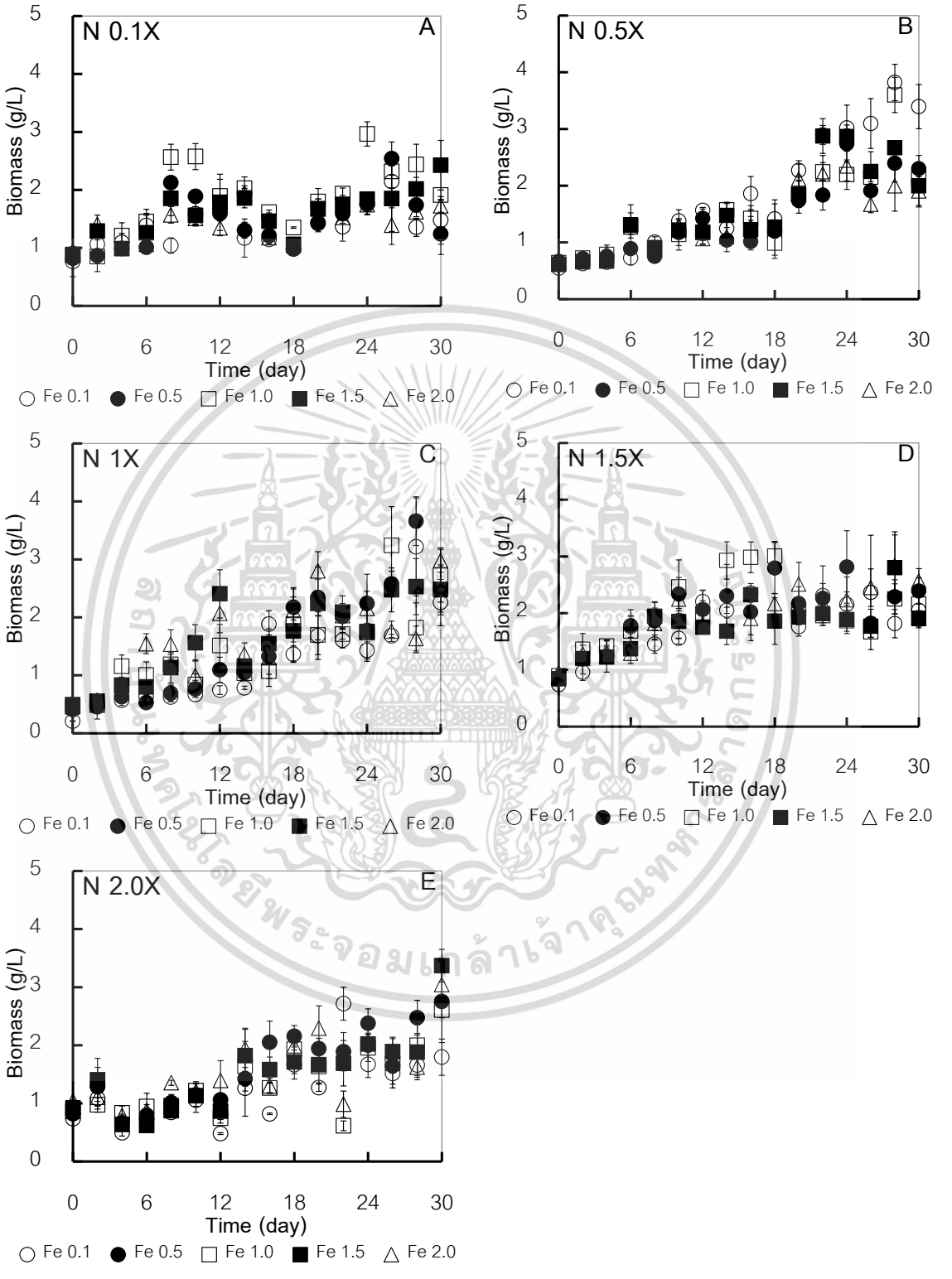

Figure 1 Biomass of *S. dimorphus* cultured in *Chlorella* medium under various N:Fe ratio.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This document is for educational use only, not for commercial use. Modification and citation are required.

จากการทดลองนี้พบว่า การผันแปรอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อเหล็กส่งผลให้สาหร่ายชนิดนี้มีชีวมวลสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ภายใต้ความเข้มแสง ระยะเวลารับแสง อุณหภูมิ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมือนกันกับการทดลองนี้ โดยผันแปรไนโตรเจนหรือเหล็กในสูตรอาหารเพียงอย่างเดียว โดยหากผันแปรไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวสาหร่ายจะมีชีวมวลสูงที่สุดเพียง 1.6 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ที่ระดับไนโตรเจน 2.0 เท่า (จิรรัตน์ และ สุนีรัตน์, 2556) และหากมีการผันแปรเหล็กอย่างเดียว พบว่ามีชีวมวลสูงที่สุด 1.4 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ที่ระดับเหล็ก 2.0 เท่า (วัฒนา และ สุนีรัตน์, 2556)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราส่วนของ N:Fe ที่ต่างกัน มีผลทำให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ต่างกัน โดยที่ระดับไนโตรเจน 0.5 เท่า และเหล็ก 0.1 เท่า ของสูตรอาหารปกติ ส่งผลให้สาหร่ายมีชีวมวลสูงสุด ซึ่งแสดงว่าระดับนี้คือระดับที่เหมาะสมต่อสาหร่ายชนิดนี้ โดยปกติแล้วเหล็กเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญมากต่อสาหร่ายขนาดเล็ก ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบพื้นฐานของเอนไซม์ต่างๆ เข้าร่วมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงในระบบแสง 2 การขาดเหล็กทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายทอดอิเล็กตรอน การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ ดังนั้นอัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจึงมีค่าต่ำ สาหร่ายจึงมีการเจริญเติบโตลดลง (Terry and Abadia, 1986) เหล็กมีอิทธิพลต่อการใช้ไนโตรเจนของสาหร่าย และเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ของเซลล์สาหร่าย ภาวะการขาดหรือมีปริมาณธาตุเหล็กมากเกินไปของในเซลล์สาหร่ายมีผลทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายลดลง (Lin *et al*., 2012) แม้พบว่าที่ระดับเหล็ก 0.1 เท่า คือระดับที่ต่ำสุด แต่สาหร่ายกลับมีการเจริญเติบโตดีที่สุด แสดงว่าไนโตรเจนมีอิทธิพลร่วมกับเหล็กต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายอย่างชัดเจน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายต่ำที่สุด เมื่อสาหร่ายได้รับไนโตรเจนต่ำสุดคือ 0.1 เท่า (Figure 1A) ทั้งนี้เนื่องจากไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบหลักของ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เอนไซม์และกรดอะมิโน ซึ่งเป็นส่วนประกอบในคลอโรพลาสต์ที่ทำหน้าที่สร้างคลอโรฟิลล์ เอ ของสาหร่าย (Neill *et al.,* 2003) การขาดไนโตรเจนจะมีผลทำให้การสร้างกรดอะมิโนมีปริมาณลดลง โดยกรดอะมิโนบางชนิดมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยตรงต่อสาหร่าย เช่นกรดอะมิโนไกลซีนซึ่งทำหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์โดยรวมตัวกับ Succinyl-Coenzyme A เกิดการสังเคราะห์ delta-Aminolevulinic acid จนได้สารคลอโรฟิลล์ เอ การขาดไนโตรเจนอาจทำให้ปริมาณไกลซีนลดลง โดยอาจจะส่งผลต่อความสามารถในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ ของเซลล์สาหร่าย ทำให้เซลล์สาหร่ายมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลง การสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง สาหร่ายจึงมีการเจริญเติบโตลดลง (Lewin, 1962) การขาดไนโตรเจนจึงทำให้ชีวมวล มีปริมาณลดลง

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเพิ่มหรือลดปริมาณไนโตรเจนหรือเหล็ก ในการศึกษาครั้งนี้กับอดีต ไม่สามารถทำการเปรียบเทียบได้โดยตรง เนื่องจากการศึกษาในเรื่องธาตุอาหารกับการเจริญเติบโตหรือการผลิตไขมันของสาหร่ายในอดีตส่วนใหญ่จะทำเพียงการผันแปรความเข้มข้นธาตุอาหารเพียงประเภทเดียว เช่น การศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้น มีรายงานว่าขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย บางชนิดเจริญเติบโตได้ดีแม้ในไนโตรเจนมีความเข้มข้นต่ำ แต่บางชนิดจะโตได้ดีเมื่อไนโตรเจนมีความเข้มข้นสูง เช่นการศึกษาของ Converti *et al*. (2009) ที่ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยให้ $NaNO_3$ ที่ 1.500 - 0.375 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายนี้มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทดลองกับสาหร่าย *Nannochloropsis oculata* โดยผันแปร $NaNO_3$ ที่ 0.075-0.300 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ไนโตรเจนเข้มข้นสูงสุด ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้นของเหล็กต่างกัน 4 ระดับที่ 3.07-24.6 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ระดับเหล็กต่ำสุด (Wang *et al*., 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อการผลิตไขมันของสาหร่าย

สาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 2.0:1.0 เท่า ให้ปริมาณไขมัน (Lipid content) สูงสุด 30.48±0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลองยกเว้นที่ N:Fe 2.0:0.1 เท่า เท่านั้น ซึ่งพบว่าในสาหร่ายชนิดนี้หากทำการผันแปรไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (โดยปัจจัยในการเพาะเลี้ยงอื่นๆ เหมือนกับการทดลองนี้ทุกประการ) จะทำให้ได้ไขมันสูงสุดเท่ากับ 25.72±0.66 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ที่ระดับไนโตรเจน 2.0 เท่า (จิรรัตน์ และ สุนีรัตน์, 2556) หรือหากผันแปรเหล็กอย่างเดียวจะได้ไขมันสูงสุดเท่ากับ 26.13 ± 1.19 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ที่ระดับเหล็ก 2.0 เท่า (วัฒนา และ สุนีรัตน์, 2556) แสดงให้เห็นว่าหากอัตราส่วน N:Fe เหมาะสม ย่อมให้ไขมันสูงกว่าการผันแปรธาตุอาหาร N หรือ Fe เพียงอย่างเดียว

ส่วนผลผลิตไขมัน (lipid yield) ในการศึกษาครั้งนี้พบมากที่สุดเท่ากับ 0.83±0.05 กรัมต่อลิตร ในสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 2.0:2.0 เท่า โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดที่ได้รับ N 2.0 เท่า ส่วนกำลังการผลิตไขมัน (lipid productivity) พบมากที่สุด 22.79±1.19 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ในสาหร่ายที่ได้รับ N:Fe 2.0:0.1 เท่า

จากผลการทดลองพบว่าควรเลือกเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ระดับ N:Fe 2.0:2.0 เท่า เพราะทำให้ได้ผลผลิตไขมันต่อการเพาะเลี้ยงต่อหนึ่งลิตรมากที่สุด หรืออาจใช้ N ที่ 2.0 เท่า ส่วน Fe ใช้ได้ทุกระดับตั้งแต่ 0.1-2.0 เท่า เนื่องจากผลผลิตไขมันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และจากการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ N ต่อ Fe พบว่าธาตุอาหารทั้งสองชนิดมีอิทธิพลร่วมกันต่อ การเจริญเติบโตจำเพาะ (p = 0.048), ชีวมวล (p = 0.035), ปริมาณไขมัน (p = 0.000) และกำลังการผลิตไขมัน (p = 0.000) ของสาหร่าย *S. dimorphus*

ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ไนโตรเจนสูงให้ไขมันที่สูง ซึ่งให้ผลการศึกษาต่างจากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ผันแปรไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว โดยได้มีรายงานการศึกษาไว้ว่าการลดปริมาณไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะทำให้สาหร่ายเพิ่มปริมาณไขมัน เช่นการศึกษาของ Hsieh and Wu (2009) ทำการเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็ก *Chlorella* sp. โดยผันแปรไนโตรเจน (ยูเรีย) ที่ 0.025 – 0.200 กรัมต่อลิตร พบว่าสาหร่ายที่ได้รับไนโตรเจนต่ำสุดจะให้ปริมาณไขมันสูงสุดคือ 0.661 กรัมต่อกรัมสาหร่ายแห้ง เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีการแบ่งตัวที่ช้าลง ซึ่งเกิดจากสารอาหารที่ไม่เพียงพอทำให้เซลล์เลือกที่จะสะสมอาหารในรูปของไขมัน เพราะเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์ไขมันสามารถทนต่อการขาดไนโตรเจนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้การขาดไนโตรเจนยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้ดีมากขึ้น เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกลไกการสังเคราะห์ไขมันคือ Diacylglycerol transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน Diacylglyceral เป็น Triacylglyceriade (TAG) ดังนั้นโมเลกุลคาร์บอนที่ได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์หรือสารอินทรีย์จึงถูกชักนำให้เปลี่ยนไปเป็นไขมันมากกว่าคาร์โบไฮเดรต ทำให้สามารถพบปริมาณไขมันสูงในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด (Xin *et al.*, 2010b) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าปริมาณน้ำมันมีค่าสูงสุด พบในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารมีไนโตรเจนสูงสุด 2.0 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของเหล็กเข้ามาส่งผลร่วมกับไนโตรเจนในการผลิตไขมันของสาหร่าย

ในการศึกษาครั้งนี้ปริมาณเหล็กปานกลางหรือที่ 1.0 เท่า ให้ผลผลิตไขมันสูง ส่วนรายงานการศึกษาของ Liu *et al*. (2008) ซึ่งทำการทดลองเลี้ยง *Chlorella vulgaris* โดยได้รับความเข้มข้นของเหล็กแตกต่างกัน 0- 1.2x10^{-5} โมลต่อลิตร พบว่าสาหร่ายนี้ที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับเหล็ก 1.2 x 10^{-5} โมลต่อลิตร หรือได้รับเหล็กสูงที่สุด มีไขมันสูงกว่าระดับอื่นถึง 56.6 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะทั่วไปแล้วความเข้มข้นเหล็กที่สูงมักมีผลให้เกิดการกระตุ้นการสะสมน้ำมันของสาหร่าย แต่ในกรณีที่ระดับความเข้มข้นเหล็กที่มากเกินไป มักจะส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน ในสภาวะที่สาหร่ายขาดเหล็ก จะส่งผลทำให้สาหร่ายไม่สามารถดึงไนโตรเจนจากอาหารไปใช้ได้ทำให้เซลล์เกิดความเครียด เซลล์สาหร่ายจะปรับตัวโดยเปลี่ยนรูปอาหารที่เก็บจากคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำมัน (Shen *et al.*, 2009) การศึกษาของ Lin *et al.* (2012) พบว่าสาหร่าย *Scenedesmus rubescen* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นเหล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Fe^{2+}) ต่ำ (0.05-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีปริมาณน้ำมันสูงมากกว่าเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นเหล็กสูง (5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเหล็กที่เหมาะสมต่อการผลิตไขมันจะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายด้วยเช่นกัน

ปริมาณน้ำมันที่พบในสาหร่ายขนาดเล็กเป็นหนึ่งในดัชนีชี้วัดที่สำคัญมาก เนื่องจากเป็นดัชนีที่สามารถใช้ในการประเมินศักยภาพของสาหร่ายขนาดเล็กในฐานะแหล่งผลิตไบโอดีเซลได้ (Shen *et al.*, 2009) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันจากการศึกษานี้กับการทดลองอื่นๆ ซึ่งปรากฏใน Table 2 พบว่า *S. dimorphus* จากการศึกษานี้ นับว่าเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ในอนาคต และรายงานผลการทดลองในครั้งนี้ยังแสดงให้ทราบว่าไนโตรเจนมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับเหล็กต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไขมันของ *S. dimorphus* ดังนั้นจึงควรมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในอัตราส่วนของ N:Fe ที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มผลผลิตไขมันของสาหร่ายได้

Table 2 Comparison of lipid content of *Scenedemus dimorphus* with other *Scenedemus* strains reported in the literature.

Strain	Lipid content (%)	Reference
S. dimorphus KMITL	30.48±0.85	This study
S. dimorphus KMITL	25.72±0.66	Jirarat and Suneerat (2013)
S. dimorphus KMITL	26.13 ± 1.19	Wattana and Suneerat (2013)
S. dimorphus KMITL	25	Ruangsomboon *et al.* (2012)
Scenedemus sp. LX1	53	Xin *et al.* (2010b)
Scenedemus sp. LX1	31-33	Xin *et al.* (2010a)
Scenedemus sp. LX1	35	Xin *et al.* (2011)
S. dimorphus EPS-5	8	Ho *et al.* (2012)
S. dimorphus CNW-N	22	Ho *et al.* (2012)
S. dimorphus SJTE-3	15-24	Tang *et al.* (2011)
S. *rubescens*	21-27	Lin and Lin (2011)

สรุป

ไนโตรเจนและเหล็กมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่อ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ชีวมวล, ปริมาณไขมัน และกำลังการผลิตไขมัน ของสาหร่าย *S. dimorphus* โดยระดับ N:Fe ที่ทำให้สาหร่ายมีชีวมวลและผลผลิตไขมันสูงสุดคือ 0.5:0.1 และ 2.0:2.0 เท่า ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (A118-59-064)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This document is for study purposes only, not for commercial use. No modification and must cite the author in all uses.

เอกสารอ้างอิง

จิรรัตน์ พรหมนารถ และสุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. 2556. ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus*. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 7: 92-101.

วัฒนา นุชชอและ และสุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. 2556. ผลของความเข้มข้นของเหล็กที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus*. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 7: 14-24.

Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Phys.37: 911–917.

Chen, Z., Y. Gong, X. Fang and H. Hu. 2012. *Scenedesmus* sp. NJ-1 isolated from Antarctica: a suitable renewable lipid source for biodiesel production. World J. Microbiol. Biotechnol. 28:3219–3225.

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

Converti, A., A.A. Casazza, E.Y. Ortiz, P. Perego and M.D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chem. Eng. Process. 48: 1146-1151.

Ho, SH., CY. Chene and JS. Chang. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_2 fixation and lipid/ carbohydrate pro-duction of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Bioresour. Technol. 113: 244–252.

Hsieh, C.H. and W.T. Wu. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. Bioresour. Technol. 100: 3921-3926.

Lewin, R.A. 1962. Physiology and Biochemisty of Algae. Academic press inc. (London) LTD. New York. 929.

Lin, Q. and J. Lin. 2011. Biomass and oil productivity of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga, a promising candidate for biodiesel production. Bioresour. Technol.102: 1615–1621.

Lin, Q., N. Gu and J. Lin. 2012. Effect of ferric ion on nitrogen consumption, biomass and oil accumulation of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. Biooresour. Technol. 112: 242–247.

Liu, J., C. Yuan, G. Hu and F. Li. 2012. Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. Appl. Biochem. Biothechnol. 166: 2127-2137.

Liu, Z.Y., G.C. Wang and B.C. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresour. Technol. 99: 4717–4722.

Mandal, S. and N. Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquusas* a potential source for biodiesel production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84: 281-291.

Neill, S.J., R. Desikan and J.T. Hancock. 2003. Nitric oxide signalling in plants. New Phytologist. 159:11-35.

Nigam, S., M.P. Rai and R. Sharma. 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. American J. Biochem. Biotechnol. 7: 124-129.

Ruangsomboon, S., M. Ganmanee and S. Choochote. 2013. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. J. Appl. Phycol. 25: 867-874.

Shen, Y., Z. Pei, W. Yuan and E. Mao. 2009. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. Int. J. Agric. & Biol. Eng. 2:51-57.

Singh, J. and S. Gu. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renew. Sustain. Energ. Reviews. 14:2596-2610.

Tang, D., W. Han, P. Li, X. Miao and J. Zhong. 2011. CO_2 biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO_2 levels. Bioresour. Technol. 102: 3071–3076.

Terry, N. and J. Abadia. 1986. Function of iron in chloroplasts. J. Plant Nutrition. 9: 609-646.

Wang, C., H.N. Kong, X.Z. Wang, H.D Wu, Y.Lin and S.B. He. 2010. Effects of Iron on Growth and Intracellular Chemical Conntens of *Microcystis aeruginosa*. Biomed. Environ. Sci. 23: 48-52

.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xin, L., H. Hong-ying and Z. Yu-ping. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. Bioresour. Technol. 102: 3098-3102.

Xin, L., H. Hong-Ying and Y. Jia. 2010a. Lipid accumulation and nutrients removal properties in secondary effluent of a newly-isolated freshwater microalga *Scenedesmus* sp.LX1. New Biotechnol. 27: 59–63.

Xin, L., H. Hong-ying, G. Ke and S. Ying-Xue. 2010b. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. Bioresour. Technol. 101: 5494-5500.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
Permission is granted for using this document for educational purpose only, commercial use is not allowed and all copies must be credited.