รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง
การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชัง: องค์ประกอบของกรดไขมัน

ผู้รับผิดชอบโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์

รายงานฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของหมู่เกาะแสมสาร และเกาะสีชัง: องค์ประกอบของกรดไขมัน

Isolation and Culture of Microalgae from Marine Ecosystems of Samaesarn Islands and Sichang Island: Fatty Acids Composition

อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำและสาหร่ายขนาดเล็ก เจ้าหน้าที่และนิสิตภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
สารบัญเรื่อง	Ii
สารบัญตาราง	Iii
สารบัญรูป	iv
บทนำ	4
วัตถุประสงค์	8
วิธีดำเนินการวิจัยและแผนการปฏิบัติงาน	8
ผลการดำเนินงาน	9
สรุปและวิจารณ์ผล	17
เอกสารอ้างอิง	19

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. องค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีประโยชน์ทางโภชนาการของสาหร่ายขนาดเล็กในคลาสต่างๆ. 5

ตารางที่ 2. องค์ประกอบของกรดไขมันประเภทต่าง ๆ ที่พบในไดอะตอมชนิดต่าง ๆ (เรียงจากปริมาณมากไปหาน้อยในแต่ละกลุ่ม) 7

ตารางที่ 3 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกจากเกาะแสมสารและเกาะสีชังและนำมาเพาะเลี้ยงได้ 9

ตารางที่ 4 น้ำหนักแห้งและปริมาณไขมันของไดอะตอม Actinocyclus normanii ที่เพาะเลี้ยงในอาหารไนเตรท-ไนโตรเจนต่ำ (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) จากจำนวนตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง 13

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกรดไขมันในไดอะตอมสี่ชนิดที่ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท 16

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.	ไดอะตอมที่แยกจากเกาะสีชังและเกาะแสมสารและนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้	10
รูปที่ 2.	กราฟการเติบโตของไดอะตอม *Actinocyclus normanii* ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน	11
รูปที่ 3.	ไดอะตอม *Actinocyclus normanii* (ก และ ข) และ *Amphora sp.1* (ค และ ง) อายุ 15 วัน ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน	12
รูปที่ 4.	การเติบโตของไดอะตอมที่ศึกษาในช่วงเวลา 15 วัน ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน (RF แทนค่า การเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ *เอ* ในเซลล์หรือ relative fluorescence และ density แทน ความหนาแน่น ในหน่วย เซลล์/มิลลิลิตร)	14
รูปที่ 5.	องค์ประกอบของกรดไขมันในไดอะตอมทั้งสี่ชนิดที่อายุการเลี้ยง 15 วัน ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน	15

การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลของหมู่เกาะแสมสารและเกาะสีชัง: องค์ประกอบของกรดไขมัน

Isolation and Culture of Microalgae from Marine Ecosystems of Samaesarn Islands and Sichang Island: Fatty Acids Composition

อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์

Ajcharaporn Piumsomboon[1,2]

[1] สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[1] Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[2] Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

บทสรุป

ทำการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศทางทะเลของเกาะแสมสารและเกาะสีชังโดยการคัดแยกสาหร่ายขนาดเล็กจากธรรมชาติมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ทั้งสิ้น 20 สายพันธุ์ เป็นสาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศของหมู่เกาะแสมสารรวม 8 สายพันธุ์ และจากกลุ่มเกาะสีชัง 12 สายพันธุ์ การศึกษาในปี 2557 ที่ผ่านมาพบว่าสาหร่ายส่วนใหญ่สามารถสะสมไขมันที่เป็นกลางในรูปของหยดไขมันในเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์ได้ การศึกษาในช่วงปีนี้จึงเป็นการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันที่สะสมไว้โดยสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมที่สะสมกรดไขมันได้ดีกว่าชนิดอื่น 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Actinocyclus noemanii* (MS-SC-56) และ *Amphora* sp. 1 (MS-SC-02) ที่แยกจากเกาะสีชังและไดอะตอมชนิด *Amphora* sp2. (MS-SS-10) และ *Actinocyclus octanarius* (MS-SS-13) ซึ่งคัดแยกมาจากบริเวณเกาะแสมสาร เลี้ยงไดอะตอมเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัดและพบว่าไดอะตอมทุกสายพันธุ์สามารถสร้างและสะสมไขมันที่เป็นกลางได้ในช่วงของการเติบโตคงที่ซึ่งปริมาณสารอาหารลดลง ไดอะตอมสายพันธุ์ *Actinocyclus noemanii* และ *Amphora* sp. 2 มีปริมาณของไขมันประมาณร้อยละ 6-13 ของน้ำหนักแห้ง ไดอะตอมทุกสายพันธุ์มีกรดไขมันอิ่มตัวโดยเฉพาะ Myristic acid (C14:0) และ Palmitic acid (C16:0) สูงกว่ากรดไขมันประเภทอื่น นอกจากนี้ยังพบการสะสมของกรดไขมันที่สามารถนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซล คือ กรดไขมันอิ่มตัวหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวที่มีคาร์บอนอะตอมระหว่าง 14-18 อะตอม ถึงกว่าร้อยละ 80 ของกรดไขมันทั้งหมด ส่วนกรดไขมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่พบได้แก่ Eicosapentaenoic acid หรือ EPA กรดไขมัน Linoleic

acid (C18:2 n-6 cis) หรือ โอเมก้า-6 และกรดไขมัน Docosahexaenoic acid (DHA) นั้นพบได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ

บทนำ

สาหร่ายขนาดเล็กทั้งที่ดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนและที่อาศัยอยู่หน้าดินหรือเกาะติดกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มีประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตทั้งในกลุ่ม Prokaryotes และ Eukaryotes ซึ่งมีบทบาทในการเป็นผู้ผลิตในระบบนิเวศทางทะเล สร้างสารอินทรีย์จากสารอนินทรีย์โดยอาศัยพลังงานจากแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสงและเป็นตัวตั้งต้นของสายใยอาหารแบบผู้ล่าในทะเลทำให้สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในทะเลสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายขนาดเล็กมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีคุณค่าทางโภชนาการ คือ โปรตีน (ร้อยละ 25-40 ของน้ำหนักแห้ง) คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ 5-30 ของน้ำหนักแห้ง) ไขมัน (ร้อยละ 10-30 ของน้ำหนักแห้ง) แต่ปริมาณขององค์ประกอบชีวเคมีเหล่านี้ผันแปรตามชนิดของสาหร่ายและสภาวะการเลี้ยง สาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มของไดอะตอมจัดเป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการสังเคราะห์และสะสมสารชีวเคมีกลุ่มน้ำมันและไขมัน เนื่องจากปัญหาเรื่องราคาน้ำมันรวมทั้งการลดลงของปริมาณน้ำมันสำรองในโลก ทำให้เกิดความสนใจในการหาแหล่งพลังงานทางเลือกอื่น ๆ ซึ่งสาหร่ายก็เป็นตัวเลือกในการผลิตน้ำมันที่มีศักยภาพสูง นอกจากนี้กรดไขมันบางชนิดที่ได้จากสาหร่ายมีความสำคัญในด้านโภชนาการ เช่น EPA และ DHA ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กจากระบบนิเวศทางทะเลในประเทศไทย สำหรับการศึกษาด้านชีววิทยาและชีวเคมี การคัดเลือกสายพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวปัจจัยสภาพแวดล้อมที่สนับสนุนให้สาหร่ายเติบโตดีและสามารถสะสม/สร้างสารประกอบที่มีประโยชน์กับมนุษย์ เพื่ออนุรักษ์สายพันธุ์และนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตสารชีวเคมีที่มีคุณค่า ประกอบกับการที่เกาะแสมสารและกลุ่มเกาะใกล้เคียงเป็นพื้นที่เป้าหมายในการศึกษาของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตน์ ฯ ส่วนเกาะสีชังนั้นก็เป็นเกาะที่มีความสำคัญมาแต่อดีตทั้งในด้านภูมิศาสตร์ ประวัติศาสตร์ และพาณิชยนาวี และมีพื้นที่ส่วนที่อยู่ในความรับผิดชอบของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงเหมาะสมต่อการเป็นพื้นที่ศึกษาเพื่อการคัดแยกสายพันธุ์สำหรับการเพาะเลี้ยงและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์และการอ้างอิง รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นผู้ผลิตในสายใยอาหารแบบผู้ล่าในมวลน้ำและที่พื้นทะเลเป็นอาหารธรรมชาติของสัตว์ทะเลในระบบนิเวศทางทะเล มนุษย์รู้จักนำสาหร่ายขนาดเล็กมาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำหรือเป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์เพื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์น้ำอีกทีหนึ่งในการเพาะเลี้ยงและผลิตลูกสัตว์น้ำ เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา หรือการเพาะเลี้ยงหอยทะเล นอกจากนี้สาหร่ายขนาดเล็กยังเป็นแหล่งของสารประกอบชีวเคมีอีกหลายประเภท ได้แก่ รงควัตถุต่าง ๆ วิตามิน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดไขมัน ซึ่งอาจใช้ผลิตเป็นอาหารเสริม ยา และปุ๋ย ฯลฯ สาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นอาหารในการผลิตสัตว์น้ำและ/หรือสัตว์ทะเลเพื่อเป็นอาหารของมนุษย์ สาหร่ายเหล่านี้มีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีคุณค่าทางโภชนาการได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันในสัดส่วนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยเฉพาะไดอะตอมซึ่งอยู่ในคลาส Bacillariophyceae หลายชนิดเป็นชนิดที่พบกระจายในทะเลไทยและเป็นอาหารที่สำคัญของแพลงก์ตอนสัตว์ในทะเล เนื่องจากไดอะตอมเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็นสองชนิด คือ eicosapentaenoic (EPA) และ docosahexaenoic (DHA) ซึ่งสัตว์ทะเลและมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ (Liang, 2000)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางชีวเคมีที่มีประโยชน์ทางโภชนาการของสาหร่ายขนาดเล็กในคลาสต่าง ๆ (ที่มา: Lavens and Sorgeloos, 1996)

Algal class/species	Dry weight ($pg.cell^{-1}$)	Percent of dry weight			
		Chl_a	Protein	Carbohydrate	Lipid
Bacillariophyceae					
Chaetoceros calcitrans	11.3	3.01	34	6.0	16
Chaetoceros gracilis	74.8	1.04	12	4.7	7.2
Nitzchia closterium	-	-	26	9.8	13
Phaeodactylumtricornutum	76.7	0.53	30	8.4	14
Skeletonema costatum	52.2	1.21	25	4.6	10
Thalassiosira pseudonana	28.4	0.95	34	8.8	19
Chlorophyceae					
Dunaliella tertiolecta	99.9	1.73	20	12.2	15
Nannochloris atomus	21.4	0.37	30	23.0	21
Cryptophyceae					
Choomonas salina	122.5	0.80	29	9.1	12
Eustigmatophyceae					
Nannochloropsis oculata	6.1	0.89	35	7.8	
Prasinophyceae					
Tetraselmis chui	269.0	1.42	31	12.1	
Tetraselmis suecica	168.2	0.97	31	12.0	
Tetraselmis suecica	168.2	0.97	31	12.0	10
Prymnesiophyceae					
Isochrysis galbana	30.5	0.98	29	12.9	23
Isochrysis aff. *Galbana* (T-iso)	29.7	0.98	23	6.0	20
Pavlova lutheri	102.3	0.84	29	9.0	12
Pavlova salina	93.1	0.98	26	7.4	12

การศึกษาในไดอะตอมหลายชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร f/2 แสดงว่าปริมาณของไขมันทั้งหมด (total lipids) ในไดอะตอมทะเลนั้นอาจผันแปรอยู่ระหว่างร้อยละ 3 ถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักไขมันทั้งหมด (Parson *et al*., 1961; Thomas *et al*., 1984; Liang, *et al*., 2000 และ Prartono, *et*

al., 2013) การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในไดอะตอมหลายชนิดแสดงให้เห็นว่ากรดไขมันที่พบประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFA) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีคาร์บอนจำนวน 14 อะตอม และ 16 อะตอม คือ C14:0 และ C16:0 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids, MUFAs) ชนิด C16:1 และ C18:1 และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกรดไขมันประเภทต่าง ๆที่พบในไดอะตอมชนิดต่าง ๆ (เรียงจากปริมาณมากไปหาน้อยในแต่ละกลุ่ม)

สกุล-ชนิด	กรดไขมันอิ่มตัว	กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว	กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน	ที่มา
Thalassiosira sp.	**C16:0**; C14:0; C18:0	**C16:1**; C18:1; C20:1	**C20:5**; C16:2; C16:3; C18:4	2
	C16:0; C14:0; C15:0; C24:0; C18:0	**C16:1**; C14:1; C18:1	C18:2	4
Thalassiosira weissflogii	**C16:0; C14:0**; C18:0	**C16:1**; C18:1	**C16:4**; C20:5; C18:3; C22:6	3
Skeletonema costatum	**C14:0**; C16:0; C18:0; C24:0: C22:0	**C16:1**; C18:1; C24:1	C16:2	4
Chaetoceros gracilis	**C16:0**; C14:0; C18:0; C22:0; C24:0; C20:0	**C16:1**; C18:1	C16:2	4
Phaeodactylum tricornutum	**C16:0**; C14:0; C18:0	**C16:1**; C18:1	**C20:5**; C16:4; C16:3; C20:4; C22:5; C16:2	1
	C16:0; C14:0; C18:0	**C16:1**; C18:1	**C20:5**; C18:2; C18:3; C16:2; C22:6; C18:4	3
Nitzschia closterium	**C16:0**; C14:0; C18:0	**C16:1**; C18:1	**C20:5**; C16:4; C22:5; C16:3; C20:4; C22:6	1
Nitzschia incerta	**C16:0**; C18:0; C14:0	**C16:1**; C18:1	**C20:5**; C16:3; C16:4; C22:6; C22:5; C22:4	1
Nitzschia frustrula	**C16:0**; C18:0; C14:0	**C16:1**; C18:1	**C20:4**; C22:6; C20:5; C16:4; C16:3C18:3; C22:5; C16:2	1
Nitzschia cf. *ovalis*	**C16:0**; C14:0; C18:0	**C16:1**; C18:1	**C20:5**; C16:3; C20:4; C22:6;	2

			C16:2; C22:5	
Nitzschia pelliculosa	**C16:0**; C14:0; C18:0	**C16:1**; C18:1	**C20:5**; C22:6; C22:5; C16:4; C16:2; C16:3; C18:2; C18:3; C20:4	1
Synedra fragilaroides	**C16:0**; C14:0; C18:0	**C16:1**; C18:1	**C20:5**; C16:3; C16:4; C22:6; C22:4; C22:5	1

ที่มา: 1. Liang *et al*., 2000; 2. Pratoomyot *et al*., 2005; 3. Lang *et al*., 2011; 4. Prartono *et al*., 2013

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมที่ได้คัดแยกสายพันธุ์จากกลุ่มเกาะแสมสารและเกาะสีชังที่มีความสามารถในการสร้างและสะสมกรดไขมัน

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. **การเก็บสายพันธุ์และขยายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการใช้ประโยชน์**

   เลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร F/20 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เจือจางจากสูตร F/2 ของ Guillard (Anderson et. Al., 2005) เพื่อให้เหมาะสมต่อการเติบโตให้ห้องปฏิบัติการและสะดวกแก่การถ่ายหัวเชื้อภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและแสง

2. **การคัดเลือกไดอะตอมที่มีการสะสมไขมันและศึกษาการสะสมของไขมันในช่วงอายุที่แตกต่างกัน**

   คัดเลือกไดอะตอมที่เพาะเลี้ยงไว้ 4 ชนิด โดยใช้อัตราการเติบโตและการสะสมไขมันเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป เลี้ยงไดอะตอมที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับลดปริมาณไนโตรเจนลงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสะสมไขมันอย่างน้อยสาม generation ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

   ศึกษาการสะสมของไขมันในช่วงการเติบโตที่ต่างกันในไดอะตอม 1-2 ชนิด เพื่อหาระยะเวลาที่ไดอะตอมสะสมไขมันได้สูงสุดเพื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน ทำการเพาะเลี้ยงไดอะตอมนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2 ที่ลดปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนลง 1 ใน 10 ส่วน ปริมาตร 1.2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 27-31 องศาเซลเซียส ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ให้แสงความเข้ม 28.78±0.04 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน สุ่มเซลล์มาวัดการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ *เอ* และนับจำนวนและหาความหนาแน่น (Guillard, 1973) เป็นระยะเวลา 15 วัน เมื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีอายุ 7 วัน (ระยะ late exponential phase) และอายุ 15 วัน (ระยะ stationary phase) นำเซลล์มาย้อมสี Nile red เพื่อตรวจสอบปริมาณ neutral lipid ที่สะสมในเซลล์ (Chen *et al*., 2009) ถ่ายรูปเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยกล้อง epi-fluorescence

microscope เปรียบเทียบการติดสีของหยดน้ำมัน หรือ น้ำมันในเซลล์ เมื่อพบว่าไดอะตอมที่เลี้ยงมีการสะสมไขมันแล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์หรือมวลของไดอะตอมโดยการกรองด้วยผ้ากรองขนาดตา 15 ไมโครเมตร นำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry หรือล้างเซลล์ด้วยสารละลาย ammonium formate 0.5 M น้ำไปอบให้แห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นทำการสกัดไขมันตามวิธีของ Bligh and Dyer (1959)

3. **การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในไดอะตอม**

ศึกษาเปรียบเทียบการสะสมกรดไขมันในไดอะตอม 4 ชนิดที่คัดเลือกไว้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2 ที่ลดปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจนลง 1 ใน 10 ส่วน ปริมาตร 1.2 ลิตร ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 2. จำนวน 3 ซ้ำ สุ่มเซลล์มาวัดการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ *เอ* และนับจำนวนและหาความหนาแน่น (Guillard, 1973) เมื่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในระยะ stationary phase (อายุครบ 15 วัน) เก็บเกี่ยวไดอะตอมทั้งสามซ้ำมารวมกันโดยการกรองและทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แบ่งเซลล์ที่แห้งไปสกัดกรดไขมันและวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเครื่อง GC/MS/MS ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Lepage and Roy (1986)

ผลการดำเนินงาน

1. **การเก็บสายพันธุ์และขยายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการใช้ประโยชน์**

สาหร่ายขนาดเล็กที่แยกจากระบบนิเวศชายฝั่งของเกาะแสมสารและเกาะสีชังและถูกเก็บรักษาไว้มีจำนวนทั้งสิ้น 20 สายพันธุ์ เป็นสาหร่ายขนาดเล็กจากเกาะแสมสาร 8 สายพันธุ์ และจากเกาะสีชัง 12 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่แยกจากเกาะแสมสารและเกาะสีชังและนำมาเพาะเลี้ยงได้

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เพาะเลี้ยงได้		
	ไซยาโนแบคทีเรีย	เซนทริคไดอะตอม	เพนเนตไดอะตอม
หมู่เกาะแสมสาร		*Odontella mobiliensis* *Odontella sinensis* *Actinocyclus octonarius* *Actinocyclus* sp.	*Pleurosigma* sp. *Bellerochea sp.* *Amphora* sp. 2
กลุ่มเกาะสีชัง	*Oscillatoria* sp.	*Chaetoceros* sp. 1 *Chaetoceros* sp. 2 *Coscinodiscus* sp. *Triceratium* sp.	*Amphora* sp. 1 *Amphora* sp. 3 *Thalassiophysa* sp. *Cylindrotheca* sp.

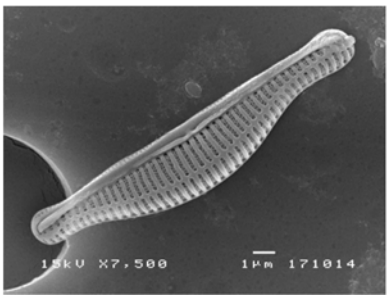
Ditylum sol

Odontella rhombus

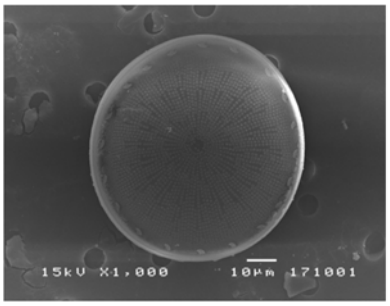
Actinocyclus normanii

2. การคัดเลือกไดอะตอมที่มีการสะสมไขมันและศึกษาการสะสมของไขมันในช่วงอายุที่แตกต่างกัน

คัดเลือกไดอะตอมที่ใช้ในการศึกษา 4 ชนิด คือ *Amphora* sp.1 (สายพันธุ์ MS-SC-02) *Actinocyclus normanii* (สายพันธุ์ MS-SC-56) ที่แยกจากเกาะสีชังและชนิด *Amphora* sp.2 (สายพันธุ์ MS-SS-10) และ *Actinocyclus octanarius* (สายพันธุ์ MS-SS-13) ที่แยกจากเกาะแสมสาร (รูปที่ 1) และนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร f/2 ที่ปรับลดปริมาณสารอาหารไนโตรเจนลง 1 ส่วน 10 ที่อุณหภูมิ 28±1 องศาเซลเซียส และความเค็ม 30 psu โดยให้แสงความเข้ม 28.78 ± 0.04 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที วันละ 12 ชั่วโมง

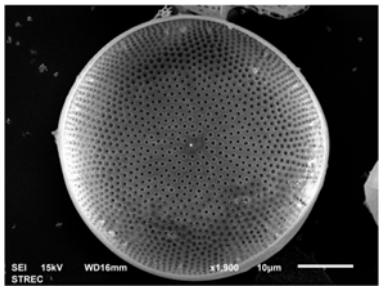


Amphora sp. 1



Actinocyclus normanii

Amphora sp. 2

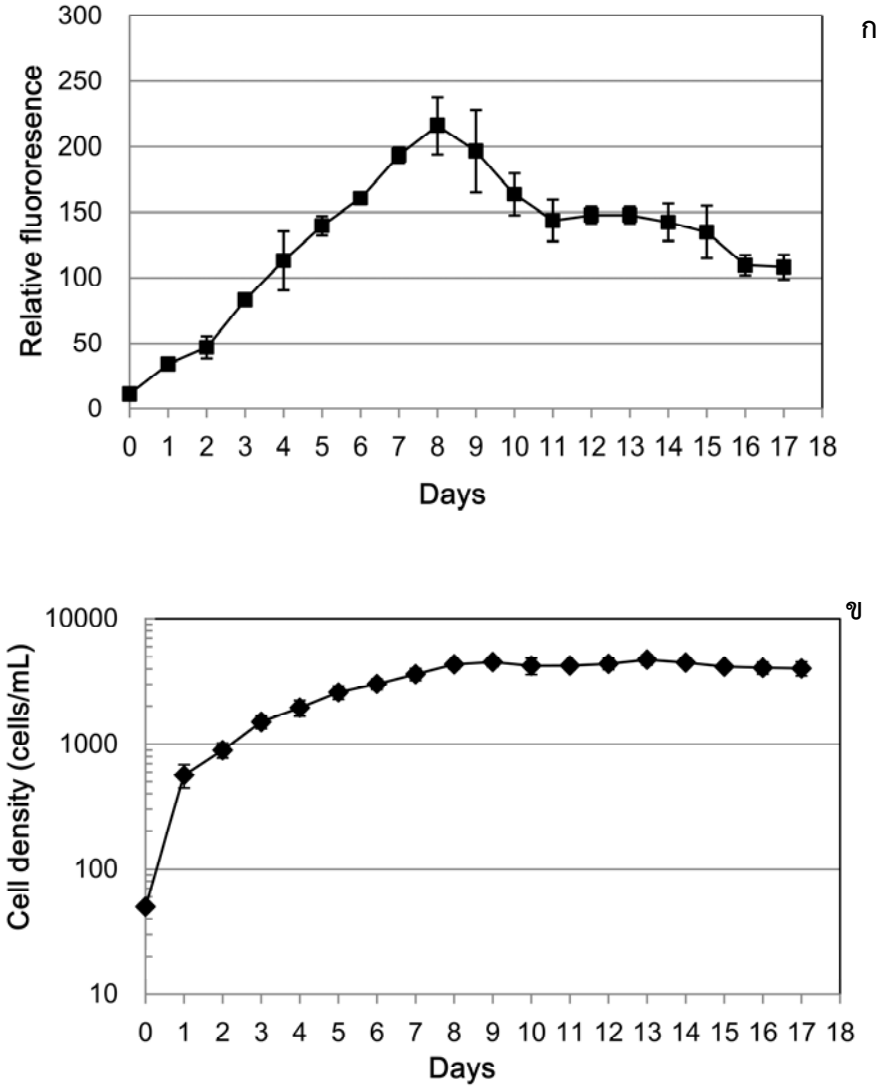


Actinocyclus octanarius

รูปที่ 1 ไดอะตอมที่แยกจากเกาะสีชังและเกาะแสมสารและนำมาใช้ในการศึกษานี้

เมื่อนำไดอะตอม *Actinocyclus normanii* ในจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 50 เซลล์/มิลลิลิตร มาศึกษาช่วงเวลาที่มีการสะสมไขมันพบว่าไดอะตอมชนิดนี้มีการเติบโตดีตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง เซลล์ที่มีอายุ 8 วันมีความหนาแน่นสูงสุดประมาณ 18,000 เซลล์/มิลลิลิตร (รูปที่ 2 ก) และค่าการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ *เอ* ในเซลล์ที่มีชีวิต (*in vivo* fluorescence) มีค่าสูงสุด

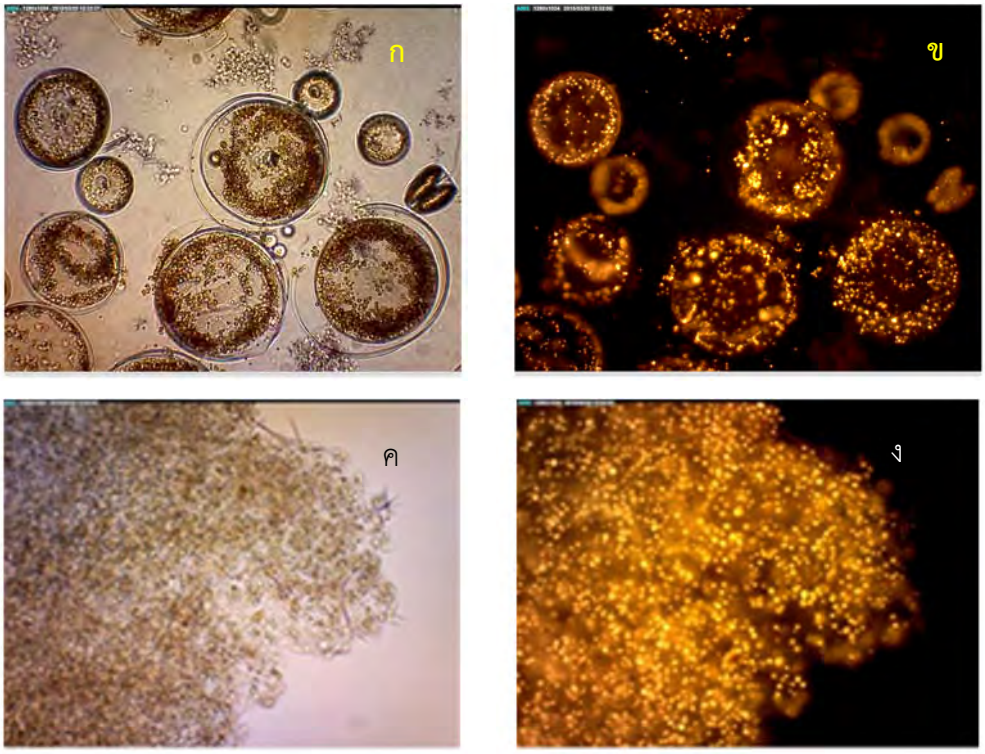
เป็น 216.2 (รูปที่ 2 ข) เมื่อเซลล์มีอายุ 9 วัน ค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (specific growth rate หรือ μ) ในช่วงการเติบโตแบบ exponential มีค่าประมาณ 0.40 ต่อวัน และเมื่อตรวจสอบการสะสมไขมันพบว่าเซลล์ที่มีอายุ 7 วัน ไม่มีการสะสมไขมัน แต่เมื่อเซลล์มีอายุ 15 วัน พบการสะสมไขมัน เช่นเดียวกับที่พบใน *Amphora* sp. 1 (รูปที่ 3) เช่นเดียวกับที่มีรายงานว่า การสร้างและสะสมไขมันจะเกิดในสาหร่ายที่อยู่ในสภาพที่ขาดสารอาหารไนโตรเจนซึ่งอาจเป็นช่วงท้ายของการเติบโตในระยะการเติบโตคงที่หรือระยะที่จำนวนเซลล์ลดลง



รูปที่ 2 กราฟการเติบของไดอะตอม *Actinocyclus normanii* ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน

ก) ค่า Relative Fluorescence

ข) ความหนาแน่น



รูปที่ 3 ไดอะตอม *Actinocyclus normanii* (ก และ ข) และ *Amphora* sp. 1 (ค และ ง) อายุ 15 วัน ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน

ก) และ ค) ภาพถ่ายด้วยแสงสีขาว

ข) และ ง) ภาพถ่ายเซลล์ในตำแหน่งเดียวกันภายใต้แสงสีฟ้าแสดงการสะสม neutral lipid ที่ติดสีย้อม Nile red เป็นสีเหลือง

หลังจากเก็บเกี่ยวเซลล์และทำให้แห้งแล้วได้น้ำหนักแห้งของเซลล์รวม 12.285 กรัมและเมื่อนำไปสกัดไขมันพบว่าไดอะตอม *Actinocyclus normanii* มีปริมาณไขมัน ร้อยละ 6.14±2.67 ของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4) ในขณะที่ไดอะตอม *Amphora* sp. 1 มีปริมาณไขมัน ร้อยละ 13.05±4.30 ของน้ำหนักแห้ง

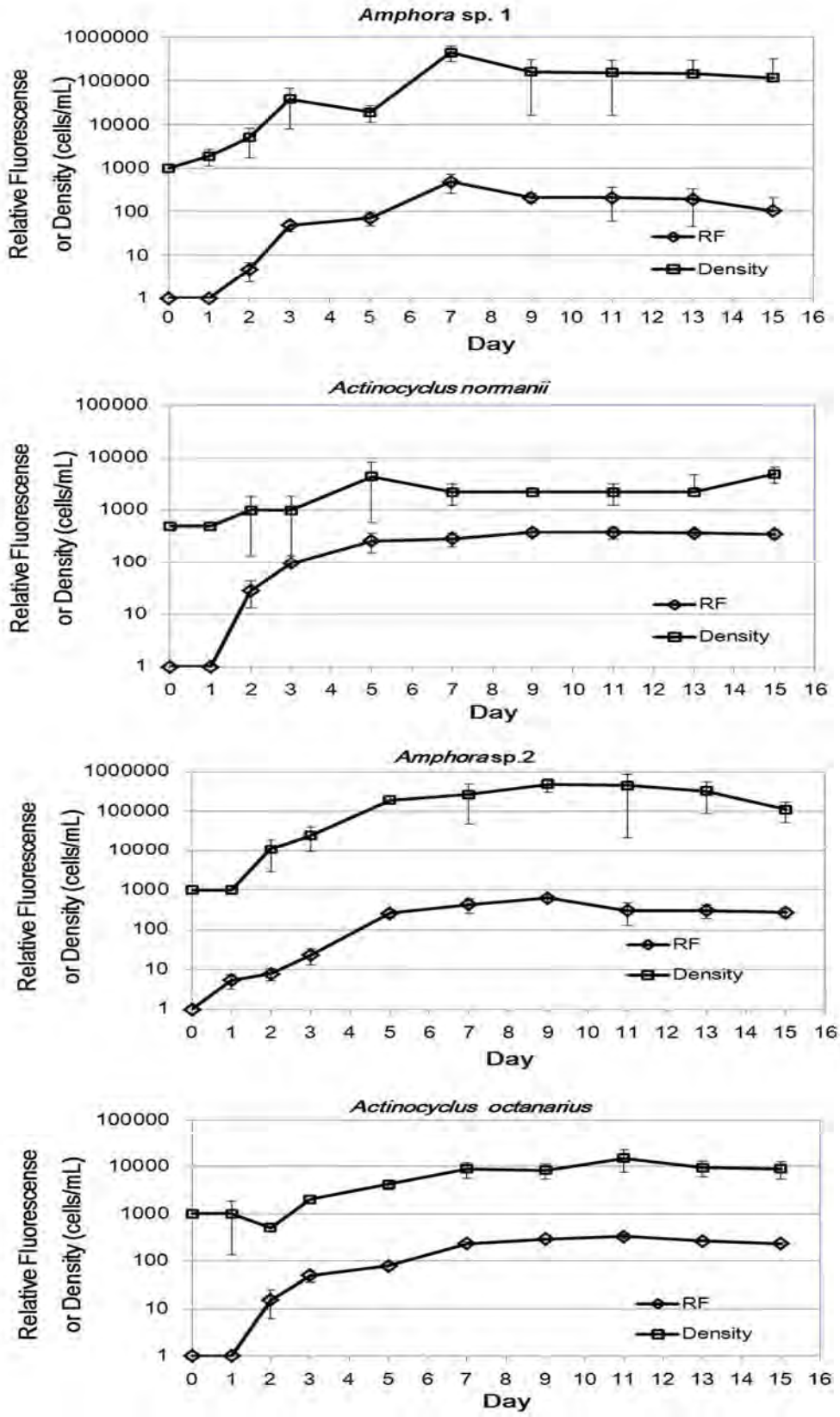
ตารางที่ 4 น้ำหนักแห้งและปริมาณไขมันของไดอะตอม *Actinocyclus normanii* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนเตรท-ไนโตรเจนต่ำ (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากจำนวนตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง)

พารามิเตอร์	*Actinocyclus normanii*
น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร (mg/mL)	0.086 ± 0.001
น้ำหนักแห้งต่อเซลล์ (mg/cell)	0.026 ± 0.001
ปริมาณไขมันต่อปริมาตร (μg/mL)	3.639 ± 1.134
ปริมาณไขมันต่อเซลล์ (μg/cell)	1.085 ± 0.364
ร้อยละของไขมันต่อน้ำหนักแห้ง (%DW)	6.14±2.67

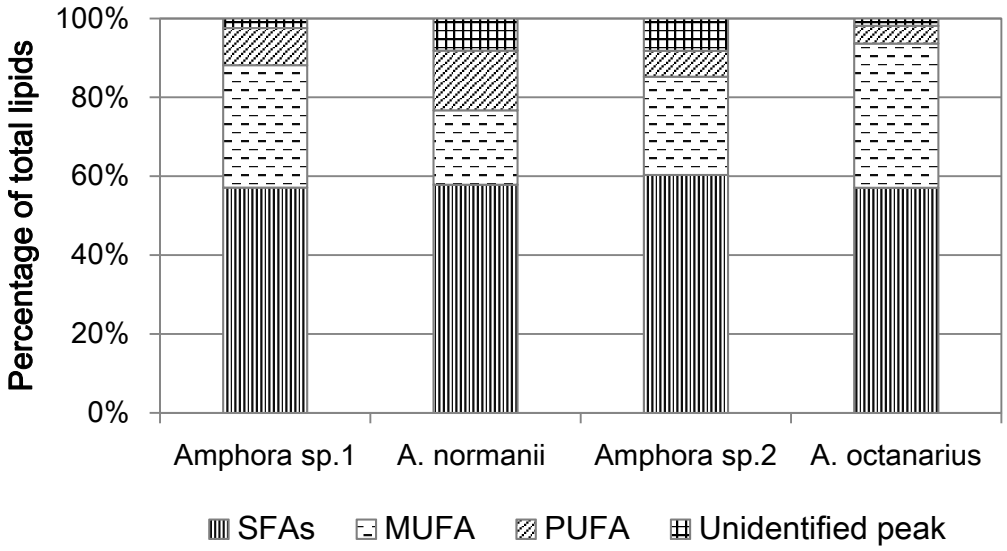
3. การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในไดอะตอม

ไดอะตอมทั้งสี่สายพันธุ์ที่ใช้ศึกษามีการเติบโตแบบทวีคูณ (exponential growth) ในระหว่างวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 หรือวันที่ 7 ของการศึกษาโดยไดอะตอม *Amphora* sp. 2 ที่แยกได้จากเกาะแสมสารมีการเติบโตดีที่สุด มีสัมประสิทธิ์การเติบโต (specific growth rate, μ) เป็น 1.04 ต่อวัน ไดอะตอมที่เติบโตได้ดีรองลงมาตามลำดับ คือ *Amphora* sp. 1 (μ = 0.92 ต่อวัน) *Actinocyclus normanii* (μ = 0.75 ต่อวัน) และ *Actinocyclus octanarius* (μ = 0.37 ต่อวัน) ไดอะตอมทุกสายพันธุ์เข้าสู่ระยะการเติบโตคงที่หลังวันที่ 7 ของการศึกษา (รูปที่ 4)

ไดอะตอมทั้งสี่สายพันธุ์ที่มีอายุ 15 วัน มีการสะสมไขมันในเซลล์ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids, SFAs) เป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 60 ของกรดไขมันทั้งหมด รองลงมาคือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (mono-unsaturated fatty acids, MUFA) ประมาณร้อยละ 18 ถึงร้อยละ 37 และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (poly-unsatuarated fatty acids, PUFA) ในอัตราส่วนต่ำกว่าร้อยละ 15 ของกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ต่ำกว่าร้อยละ 9 ของกรดไขมันทั้งหมด (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 การเติบโตของไดอะตอมที่ศึกษาในช่วงเวลา 15 วัน ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน (RF แทนค่า การเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ *เอ* ในเซลล์หรือ relative fluorescence และ density แทน ความหนาแน่น ในหน่วย เซลล์/มิลลิลิตร)



รูปที่ 5 องค์ประกอบของกรดไขมันในไดอะตอมทั้งสี่ชนิดที่อายุการเลี้ยง 15 วัน ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท-ไนโตรเจน

การสะสมไขมันในเซลล์ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันทั้งสิ้นไม่ต่ำกว่า 15 ชนิด (ตารางที่ 5) มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสองชนิด คือ Myristic acid หรือ tetradecanoic acid (C14:0) และ Palmitic acid (C16:0) ในปริมาณสูงคือร้อยละ 27-50 ของกรดไขมันทั้งหมด และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว Palmitoteic acid (C16:1) ประมาณร้อยละ 18 ถึง 30 ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบในปริมาณสูงสุด ได้แก่ Eicosapentaenoic acid หรือ EPA (C20:5 n-3) ที่พบในอัตราส่วนประมาณร้อยละ 2 ถึง 4 ของกรดไขมันทั้งหมดซึ่งค่อนข้างต่ำกว่าทีรายงานไว้โดย Liang et al. (2000) ที่พบกรดไขมันชนิดนี้ถึงร้อยละ 6.5 ถึง 19 ของไขมันทั้งหมด ไดอะตอม *Actinocyclus normanii* มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงกว่าไดอะตอมอื่น ๆ ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ Arachidonic acid (C20:4 n-6) ถึงร้อยละ 7.05 รองลงมาคือ EPA ร้อยละ 4.15 และ Linoleic acid (C18:2 n-6 cis) หรือ โอเมก้า-6 ซึ่งเป็น essential fatty acidสำหรับมนุษย์อีกร้อยละ 3.07 ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ไดอะตอม *A. normanii* และ *Amphora* sp.2 ยังมีกรดไขมัน Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) อีกด้วย

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกรดไขมันในไดอะตอมสี่ชนิดที่ในอาหารเลี้ยงที่ปรับลดสารอาหารไนเตรท

ประเภทกรดไขมัน	ชนิดของกรดไขมัน	*Amphora* sp.1	*Actinocyclus normanii*	*Amphora* sp.2	*Actinocyclus octanarius*
กรดไขมันอิ่มตัว	Myristic acid C14:0	√	√	√	√
	Palmitic acid C16:0	√	√	√	√
	Pentadecanoic acid C15:0	√	√	√	√
	Stearic acid C18:0	√	√	√	√
	Arachidic acid C20:0	-	-	-	√
	C24:0	√	√	-	√
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว	Palmitoteic acid C16:1	√	√	√	√
	Oleic acid C18:1 n-9 cis	√	√	√	√
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน	Linoleic acid C18:2 n-6 cis	√	√	√	√
	γ-Linolenic acid (ALA) C18:3 n-6	√	√	√	√
	Eicosadienoic acid C20:2 n-6	-	-	-	√
	Dihomo-gamma-linolenic acid C20:3 n-6	√	-	-	√
	Arachidonic acid (ARA) C20:4 n-6	√	√	-	√
	Eicosapentaenoic acid (EPA) C20:5 n-3	√	√	√	√
	Docosahexaenoic	-	√	√	-

	acid (DHA) C22:6 n-3				
Unidentified peak		√	√	√	√

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

เมื่อเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มไดอะตอม 4 ชนิด คือ *Amphora* sp.1 (สายพันธุ์ MS-SC-02) *Actinocyclus normanii* (สายพันธุ์ MS-SC-56) ที่แยกจากเกาะสีชังและชนิด *Amphora* sp.2 (สายพันธุ์ MS-SS-10) และ *Actinocyclus octanarius* โดยลดปริมาณสารอาหารไนโตรเจนลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ พบการสะสมของกรดไขมันเมื่อสาหร่ายมีอายุ 15 วัน ซึ่งเป็นช่วงท้ายของการเติบโตในระยะการเติบโตคงที่หรือระยะที่จำนวนเซลล์ลดลง

ปริมาณไขมันที่สกัดได้จากไดอะตอมทั้งสองสายพันธุ์มีค่ามากกว่า ร้อยละ 6 ถึงร้อยละ 13 ของน้ำหนักแห้งซึ่งใกล้เคียงกับผลที่รายงานโดย Lavens and Sorgeloos (1996) ดังแสดงในตารางที่ 1 รวมทั้งการศึกษาจากไดอะตอม 8 ชนิด โดย Liang และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาไดอะตอม *Nitzschia frustrula*, *Nitzschia closterium*, *Nitzschia incerta*, *Navicula pelliculosa*, *Phaeodactylum tricornutum* และ *Synedra fragilariodes* และรายงานว่ามีปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 2.4 ถึงร้อยละ 21.3 ของน้ำหนักแห้ง โดย *P. tricornutum* สามสายพันธุ์มีปริมาณไขมันสูงสุดคือ ร้อยละ 8.1, 10.3 และ 21.3 ส่วน *N. frustrula* *N. incerta* และ*S. fragilariodes* มีไขมันต่ำกว่าร้อยละ 3.6 ของน้ำหนักแห้ง ต่อมา Wawrik และ Harriman (2010) ได้ทำการศึกษาไดอะตอม *Phaeodactylum tricornutum* และสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* และรายงานว่ามีปริมาณไขมันร้อยละ 9.4 ของน้ำหนักแห้งร้อยละ 12.0 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับทั้งนี้ความแตกต่างในปริมาณไขมันทั้งหมดรวมถึงองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในการศึกษาครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ อาจเป็นผลมาจากสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณแสง สารอาหารและและช่วงอายุของเซลล์ (Guihéneuf et al., 2008)

การที่ไดอะตอมที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีองค์ประกอบของกรดไขมัน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในทางโภชนาการและการพัฒนาพลังงานทางเลือก เนื่องจากกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในไดอะตอมเป็นกรดไขมันอิ่มตัวหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวที่มีคาร์บอนอะตอมระหว่าง 14-18 อะตอม ถึงกว่าร้อยละ 80 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งกรดไขมันกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตไบโอดีเซลได้ (Thang Duong et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการได้แก่ โอเมก้า 6 EPA และ DHA ในไดอะตอม *Actinocyclus normanii* ซึ่งอาจพัฒนาเป็นอาหารเสริมได้หากสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก โดยสรุปไดอะตอมที่แยกจากเกาะแสมสารและเกาะสีชังมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของไขมันโดยมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แต่ปริมาณกรดไขมันที่สร้างค่อนข้างต่ำกว่าที่เคยมีผู้ศึกษาไว้ในอดีต ทั้งนี้เนื่องจากกรดไขมันเป็นผลผลิตของการสังเคราะห์แสงของไดอะตอม

และสาหร่าย ดังนั้นปริมาณของกรดไขมันจึงขึ้นกับสภาวะการเติบโต การขาดแคลนสารอาหารและ/หรือปริมาณแสง รวมทั้งปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่มีผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการสังเคราะห์แสง จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตสารชีวเคมีจากสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อพัฒนาต่อยอดสู่การนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Anderson, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J. and Watanabe, M. M. 2005. Recipes for freshwater and seawater media. In: Anderson, R. A. (ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier, Amsterdam, pp. 429-538.

Bligh, E. G and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem.Physiol. 37(8): 911-917.

Cheng, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. and Hu, Q. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. J. Microb. Methods. 77:41-47.

Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulman, I. 2008. Environmental factors affecting growth and omega 3 fatty acid composition and *Skeletonema costatum*. The influences of irradiant and carbon source. Diatom Research 23(1): 93-103

Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. In: J. R. Stein (ed.) Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 289-311.

Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 361.FAO, Rome. 295 p. (http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e07.htm เข้าถึงเมื่อ 10 ส.ค. 2556)

Lepage, G. and Roy, C. C. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. J. Lipid Res. 27(1):114-120.

Liang, Y., Mai, K., and Sun, S. 2000. Total lipid and fatty acid composition of marine diatoms. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 18(4):345-349.

McLachlan, J., 1973. Growth media-marine. In: J. R. Stein (ed.) Handbook of Phycological Methods: Culture methods and Growth Measurements**.** Cambridge University Press**.** pp. 25-51.

Parsons, T.R. Stephen, K. and Strickland, J.D.H. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada 18(6):1001-1016.

Patoomyot, J., Srivilas, P. and Noiraksar, T. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin J. Sci.Tech. 27(6):1179-1187.

Prartono, T., Kawaroe, M. and Katili, V. 2013. Fatty acids composition of three diatoms species *Skeletonema coastatum*, *Thalasssiosira* sp. and *Chaetoceros gracilis*. International Journal of Environment and Bioenergy. 6(1):28-43

Thang Duong, V., Thomas-Hall, S. R. and Schenk, P. M. 2015. Growth and lipid accumulation of microalgae from fluctuating brackish and seawater locations in South East Queensland-Australia. Plant Sci. 6(359): 8 p. http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00359

Thomas, W. H., Siebert, D. L. R., Alden, M., Neori, A. and Eldridge, P. 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaedactylum tricornutum* experiment. Biomass 5:181-209.

Wawrik, B., Harriman, B.H., Rapid, colorimetric quantification of lipid from algal cultures, Journal of Microbiological Methods (2010), doi:10.1016/j.mimet.2010.01.016

Zhao F, Liang J, Gao Y, Luo Q, Yu Y, et al. 2016. Variations in the Total Lipid Content and Biological Characteristics of Diatom Species for Potential Biodiesel Production. J Fundam Renewable Energy App 6:201. doi:10.4172/2090-4541.1000201

http://gce-lter.marsci.uga.edu/public/files/pubs/Thoresen_SEERS_2004.pdf