

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็กด้วยการก่อการกลายพันธุ์

Enhancing lipid productivity in microalgae by mutation induction

เสาวนีย์ มีชาว¹, ปติรุจ จิรกลางวงศ์^{2,3} และ อรุณา ตนะคุลย์^{1,2,3*}

Saowanee Meechao¹, Patiruj Jirakranwong^{2,3} and Orn-u-ma Tanadul^{1,2,3*}

บทคัดย่อ: การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืช quizalofop ในการเพิ่มปริมาณน้ำมันภายในเซลล์สาหร่าย เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 ไมโครโมลาร์ คัดเลือกเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตได้และนำไปเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นสารกำจัดวัชพืชเป็น 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15 ไมโครโมลาร์ (ตามลำดับ) หลังจากชักนำการกลายพันธุ์และคัดเลือกจำนวน 7 รอบ สามารถคัดเลือกสาหร่ายที่เจริญเติบโตอยู่ในสารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 ไมโครโมลาร์ กำหนดชื่อใหม่เป็น M5, M7.5 และ M10 (ตามลำดับ) วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิตชีวมวล ปริมาณน้ำมัน และประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่า สาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ M10 มีปริมาณน้ำมันและประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 0.9% และ 0.15 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งสูงกว่าในสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญถึง 34.33% และ 36.36% (ตามลำดับ) ดังนั้นสรุปได้ว่าการชักนำสาหร่ายให้กลายพันธุ์ด้วยสารกำจัดวัชพืชสามารถใช้เป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์สาหร่ายเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันภายในเซลล์ จึงมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อผลิตเป็นพลังงานทดแทนในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: สารกำจัดวัชพืช, สาหร่ายขนาดเล็ก, ประสิทธิภาพการผลิตน้ำมัน

ABSTRACT: The aim of this study was to examine the ability of herbicide quizalofop on increasing the intracellular lipid accumulation in microalgae. *Chlorella* sp. was cultured in liquid media containing quizalofop at the start concentration of 1 μ M. The survival cells were selected and continue cultured in 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 and 15 μ M quizalofop-containing media (respectively). After seven rounds of mutation-selection, three mutagenized treatments at 5, 7.5 and 10 μ M quizalofop were selected and named as M5, M7.5 and M10, respectively. The selected microalgae were cultured for determine the specific growth rate, biomass yield, biomass productivity, lipid content and lipid productivity compared with the wild type. The results showed that mutagenized microalgae M10 yielded the highest lipid content 0.9% and lipid productivity 0.15 g/L/d which were significantly higher than the wild type up to 34.33 and 36.36%, respectively. This study highlights the ability to enhance intracellular lipid accumulation in microalgae using random mutagenesis by herbicide. This approach can be used to improve lipid productivity in microalgae as potential feedstock for biodiesel production in future breeding programs.

Keywords: Herbicide, microalgae, lipid productivity

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: agromt@ku.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันจำนวนประชากรมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อความต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ทำให้เกิดปัญหาตามมาคือ ราคาเชื้อเพลิงที่สูงขึ้นเนื่องจากปริมาณเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่ลดลง อีกทั้งการผลิตปิโตรเลียมยังส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อนจากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจก เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และมีเทน เป็นต้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาพลังงานในรูปแบบใหม่ขึ้นมาทดแทน ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางด้านภูมิศาสตร์ ในแต่ละภูมิภาคของประเทศมีพื้นที่การเกษตรที่อุดมสมบูรณ์ แนวความคิดทางด้านการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) จึงได้เกิดขึ้น การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสามารถแบ่งได้เป็น 3 ยุค ตามประเภทของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คือ ยุคที่ 1 การนำพืชอาหารทั้งของมนุษย์และสัตว์ เช่น ข้าวโพด ปาล์มน้ำมัน อ้อย ถั่วเหลือง มะพร้าว งา ทานตะวัน และมันสำปะหลังมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ แต่มีการเล็งเห็นปัญหาในอนาคตหากต้องการเพิ่มการผลิตเชื้อเพลิงให้เพียงพอต่อความต้องการนั้น จะส่งผลให้อาหารและเนื้อสัตว์มีราคาแพงขึ้น ดังนั้น การผลิตพลังงานชีวภาพจึงเริ่มเข้าสู่ยุคที่ 2 ที่เน้นไปยังวัตถุดิบที่ไม่เป็นอาหารของมนุษย์ และใช้แหล่งของเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบในการผลิต เช่น หญ้า หรือวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร อย่างไรก็ตาม การผลิตพลังงานในยุคนี้ก็ยังคงส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากการปลูกหญ้า หรือแม้กระทั่งใช้เศษวัสดุจากการเกษตร เกษตรกรยังจำเป็นต้องใช้ที่ดินที่อุดมสมบูรณ์ในการเพาะปลูกพืชเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต biofuel และเมื่อมีความต้องการพลังงานชีวภาพมากขึ้น ที่ดินการเกษตรย่อมเป็นที่ต้องการมากขึ้น จึงก่อให้เกิดปัญหาการแย่งชิงที่ดินกับพืชที่ปลูกเป็นอาหาร มุมมองใหม่ในการผลิตวัตถุดิบสำหรับเชื้อเพลิงชีวภาพจึงควรผลิตจากพืชอื่น ๆ ที่ไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่ดินที่อุดมสมบูรณ์ ไม่ต้องการน้ำมาก และไม่ต้องการการดูแลรักษาเหมือนการปลูกพืชเพื่อการบริโภค ดังนั้นเชื้อเพลิงชีวภาพในยุคที่ 3 จึงได้มุ่งวิจัยเกี่ยวกับการนำสาหร่ายมาเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตพลังงาน

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารเองได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง พบได้ในทุกสภาพแวดล้อมที่มีความชื้น โดยเฉพาะในน้ำ ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม หรือแม้กระทั่งน้ำเสีย ภายในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กจะมีสัดส่วนของโปรตีนประมาณ (6-52%) ไขมัน (7-23%) และคาร์โบไฮเดรต (5-23%) ทั้งนี้จะมีสัดส่วนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย (Chisti, 2007) สาหร่ายจัดเป็นผู้ผลิตที่สำคัญในระบบนิเวศน์สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น นำมาผลิตเป็นอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่นด้านเภสัชกรรม ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ และนำมาผลิตพลังงานชีวภาพ

สาหร่ายขนาดเล็กถือเป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีศักยภาพในการแทนที่เชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมได้ ซึ่งแตกต่างกับพืชน้ำมันชนิดอื่น เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สะสมน้ำมันได้ 20-50% ของน้ำหนักแห้ง และอาจสูงถึง 77% ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สาหร่ายบางสายพันธุ์สามารถเพิ่มชีวมวลได้ถึง 2 เท่า ภายในเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง เช่น *Goldieria* sp., *Euglena gracilis* และ *Chlorococcum* sp. (Sankaran et al., 2015) มีช่วงอายุการเจริญเติบโตที่สั้น เก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลายครั้งในหนึ่งปี ทำให้เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ได้จากพืชพลังงานอื่น ๆ กับสาหร่ายขนาดเล็กพบว่า น้ำมันที่ได้จากพืชพลังงานนั้นจะมีปริมาณที่น้อยกว่าน้ำมันที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก (Chisti, 2007) อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์สาหร่ายที่สะสมน้ำมันได้ในปริมาณสูงยังมีอยู่อย่างจำกัด ทำให้ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุนเมื่อนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล การปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นแนวทางหนึ่งที่เหมาะสมความสำเร็จในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด แต่เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นพืชที่มีเซลล์เดียวจึงทำให้ไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิมได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยการชักนำการกลายพันธุ์มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สาหร่าย

การก่อกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้โดยใช้รังสี เช่น รังสี UV, X-ray, gamma หรือสารเคมี colchicines, ethyl methane sulfonate (EMS) และสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับ nucleic acid (Lim and Schenk, 2017)

นอกจากนี้ สารกำจัดวัชพืชสามารถจัดเป็นสารเคมีที่ใช้ก่อนการกลายพันธุ์ในพืชได้เช่นเดียวกัน สารกำจัดวัชพืชที่มีกลไกการทำลายพืชโดยยับยั้งการสังเคราะห์ไขมัน (Lipid synthesis inhibitors) เช่น quizalofop สารกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการทำงานของ Acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCase) ซึ่งเอนไซม์เริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในพืช ทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตผิดปกติ เยื่อหุ้มเซลล์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติและส่งผลให้พืชตายในที่สุด (ทศพล, 2554)

จากกลไกการทำงานของสารกำจัดวัชพืชมดังกล่าว จึงนำมาสู่สมมติฐานที่ว่า สาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไขมัน อาจจะมีกลไกในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้ยังสามารถสร้างไขมันได้ และน่าจะสังเคราะห์ไขมันได้มากกว่าเซลล์ดั้งเดิม ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะชักนำการกลายพันธุ์ในสาหร่ายขนาดเล็กด้วยสารกำจัดวัชพืช quizalofop จากนั้นศึกษาปริมาณน้ำมันที่สะสมภายในเซลล์สาหร่ายโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

วิธีการศึกษา

สายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella* sp. ด้วยอาหารเหลวสูตร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ในสภาพปิดที่ให้แสงด้วยหลอด Fluorescent ชนิด cool white ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

การคัดเลือกสาหร่ายในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช

นำสาหร่ายที่ผ่านการเพาะเลี้ยงประมาณ 4 วัน ซึ่งจะเจริญอยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ เติมสารกำจัดวัชพืช quizalofop ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์ นำไปเลี้ยงที่ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ และให้อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วประมาณ 100 รอบ/นาที บันทึกการ

เปลี่ยนแปลงสีของสาหร่ายในอาหารเหลวในแต่ละวัน และตรวจสอบเซลล์สาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตได้ ทุก ๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 10 วัน โดยนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง จากนั้นนำเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ไปเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชเพิ่มขึ้นเป็น 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15 ไมโครโมลาร์ (ตามลำดับ) คัดเลือกเซลล์สาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช และนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) และวัดการเจริญเติบโต

นำสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิม และสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงใน Bioreactor ขนาด 700 มิลลิลิตร ในสภาวะให้แสง 16 ชั่วโมง และมีด 8 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ข้าง วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยการหาน้ำหนักแห้งโดยสุ่มตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจาก Bioreactor ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้งและคำนวณหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายทุกวันเป็นเวลานาน 7 วัน การคำนวณน้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดังสมการ 1 และ 2

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)} &= \text{น้ำหนักกระดาษกรองและเซลล์ (กรัม)} - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)} \quad \text{สมการที่ 1} \\ \text{ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ} &= (\ln X_2 - \ln X_1) / t \quad \text{สมการที่ 2} \end{aligned}$$

เมื่อ X_1 และ X_2 คือ น้ำหนักแห้งในวันแรกและวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ
 t คือ จำนวนวันของการเพาะเลี้ยง

การสกัดน้ำมันด้วยเครื่องอัลตราโซนิก

เก็บเกี่ยวสาหร่ายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที ล้างตัวอย่างสาหร่ายด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer สกัดน้ำมันตามวิธีที่รายงานโดย ผกามาศ และคณะ (2560) โดยนำตัวอย่างสาหร่ายที่ทำให้แห้งด้วย freeze dryer ปริมาตร 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง

ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำ Folch solvent (คลอโรฟอร์ม: เมทานอล; 2:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้สารผสมกัน จากนั้นนำเข้าเครื่องอัลตราโซนิก ที่ความถี่ 20 KHz ระดับพลังงาน 40 วัตต์ ระยะเวลา 10 นาที จำนวนหลอดละ 4 รอบ จากนั้นเติม 0.9% โซเดียม คลอไรด์ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมสารด้วยเครื่อง vortex นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากส่วนใสที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการดูดของเหลวชั้นล่างสุดเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมัน

การวิเคราะห์น้ำมัน

วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันตามวิธีที่รายงานโดย Tanadul et al. (2014) โดยนำตัวอย่างน้ำมันที่ได้จากการสกัดน้ำมัน ด้วยเครื่องอัลตราโซนิกปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบน PCR plate ตัวอย่างละสามหลอด และหยด lipid standards ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 3 หลอดเช่นกัน จากนั้นทำการระเหยสาร folch solvent ออกจากตัวอย่างด้วย heating block ที่ 90 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวอย่างจะแห้ง จากนั้นเติมกรด ซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรด้วย multiple pipette ผสมสารให้เข้ากันจำนวน 10 ครั้ง จากนั้นนำไปใส่ใน heating block ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer-plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หลังจากนั้นเติมกรดวานิลลิน-ฟอสฟอริก ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จำนวน 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อีกครั้งหนึ่ง คำนวณหาปริมาณน้ำมันโดยการหาค่าการดูดกลืนแสงก่อนเติมกับค่าการดูดกลืนแสงหลังเติม กรดวานิลลิน-ฟอสฟอริกจะได้เป็นค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ แทนค่าลงในสมการเส้นตรง lipid standard หน่วย มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณน้ำมันจากการเพาะเลี้ยง สาหร่ายใน bioreactor จำนวน 3 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม R วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน

ทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Fisher's LSD test (Fisher's Least significant Difference test)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การชักนำการกลายพันธุ์แก่สาหร่าย *Chlorella* sp.

การชักนำการกลายพันธุ์แก่สาหร่ายขนาดเล็กโดยการเติมสารกำจัดวัชพืช quizalofop ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงในสภาวะเขย่า สังเกตการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 10 วัน และเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็นลำดับ ผลการทดลองแสดงใน Figure 1 พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 มีการเจริญเติบโตที่ปกติ ซึ่งสังเกตได้จากเซลล์สาหร่ายที่ยังมีสีเขียวพบว่าเซลล์เริ่มมีการตายบ้างเล็กน้อยในวันที่ 5 และวันที่ 6 ทำให้เซลล์สาหร่ายมีสีเขียวที่อ่อนลง อย่างไรก็ตาม เซลล์ได้กลับมาสีเขียวเป็นปกติในวันที่ 7 จนถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกในสารกำจัดวัชพืช 1 ไมโครโมลาร์ มาเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็น 2.5 ไมโครโมลาร์ พบว่าเซลล์สาหร่ายมีสีอ่อนลง ในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 3 และเริ่มกลับมาสีเขียวปกติในวันที่ 4 จนถึงวันสิ้น สุดของการเพาะเลี้ยง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็น 5 ไมโครโมลาร์ พบว่า เซลล์สาหร่ายเริ่มมีสีเขียวที่อ่อนลง ในวันที่ 2 และอ่อนลงเพิ่มขึ้น และในวันที่ 4 เซลล์ได้เปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเขียวน้ำตาล แสดงว่าเซลล์มีการตายเพิ่มมากขึ้น และเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 7 สังเกตได้ว่าเซลล์สาหร่ายเริ่มกลับมาสีเขียวอ่อน ๆ อีกครั้ง จากนั้นเซลล์สาหร่ายได้มีสีเขียวเข้มเพิ่มขึ้นเป็นระยะ ๆ จนถึงวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็น 7.5 ไมโครโมลาร์ พบว่า เซลล์สาหร่ายมีสีอ่อนลงตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำตาลในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดในวันที่ 4 อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์เริ่มกลับมาสีเขียวอ่อน และพัฒนามาเป็นสีเขียวปกติจนถึงวันสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า ในวันที่ 2 เซลล์สาหร่ายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำตาล และเซลล์

ได้ตายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดในวันที่ 7 อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์สาหร่ายกลับมามีสีเขียวอ่อนอีกครั้งหนึ่ง และพัฒนามาเป็นสีเขียวเข้มจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็น 12.5 ไมโครโมลาร์ พบว่าเซลล์สาหร่ายมีสีอ่อนเพิ่มขึ้นเป็นระยะ ๆ และกลายเป็นสีขาวจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และไม่สามารถกลับมาเป็นสีเขียวได้อีกเลย อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ ให้ผลเช่นเดียวกับการเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชเข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์ แต่สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนว่า สาหร่ายมีอัตราการตายที่เร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชเข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า สาหร่ายที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเหลวจะมีสีเขียวเป็นปกติ เนื่องจากเซลล์สาหร่ายสามารถเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเหลวได้ แต่เมื่อเติมสารกำจัดวัชพืชลงในอาหารในความเข้มข้นที่ต่ำ (1-2.5 ไมโครโมลาร์) จะเห็นได้ว่าอาหารได้เปลี่ยนสีเป็นสีเขียวย่อเนื่อง เนื่องจากมีสาหร่ายบางเซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนสาหร่ายที่เจริญเติบโตได้ก็จะมี การแบ่งเซลล์ตลอดเวลา และเมื่อเวลาผ่านไปสาหร่ายที่เจริญเติบโตนี้ได้แบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ในขณะที่เดียวกันสารกำจัดวัชพืชเริ่มหมดฤทธิ์ จึงทำให้เห็นอาหารกลับมาเป็นสีเขียวดังปกติ เมื่อเติมสารกำจัดวัชพืชที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น (5-10 ไมโครโมลาร์) ทำให้สาหร่ายตายอย่างรวดเร็ว อาหารจึงกลายเป็นสีเขียวน้ำตาล และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดในเวลาต่อมา หากแต่สารกำจัดวัชพืชนั้น ๆ ไม่สามารถทำให้สาหร่ายทุกเซลล์ตายได้หมด ก็ยังคงทำให้สาหร่ายแบ่งเซลล์ได้ และทำให้อาหารกลับมาเป็นสีเขียวได้อย่างปกติ หากในอาหารมีการเติมสารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้นสูง (12.5-15 ไมโครโมลาร์) จะมีผลทำให้สาหร่ายตายอย่างรวดเร็ว สังเกตได้จากสีอาหารที่เปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำตาล น้ำตาลอ่อน เหลืองซีด และเปลี่ยนเป็นสีขาวในที่สุด แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายทุกเซลล์ได้ตายหมด อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้ได้คัดเลือกสาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชที่ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นนี้มีสาหร่ายบางเซลล์ที่ไม่สามารถสร้างกรดไขมันไปใช้ในการเจริญเติบโตได้จึงทำให้ตายในที่สุด และยังคง

คงมีบางเซลล์ที่สามารถสร้างกรดไขมันได้จึงเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ การทดลองครั้งนี้ให้ผลที่คล้ายคลึงกับการทดลองที่เผยแพร่โดย American Museum of Natural History (2013) ที่ชักนำการกลายพันธุ์ให้แก่สาหร่าย *Nannochloropsis salina* โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช sethoxydim ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ถึง 400 มิลลิโมลาร์ และพบว่า *N. salina* ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารกำจัดวัชพืชจะมีสีเขียวเข้ม แต่เมื่อใส่สารกำจัดวัชพืชลงไปในอาหารทำให้เซลล์สาหร่ายเริ่มตายและทำให้เห็นอาหารกลายเป็นสีเหลืองพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ ยังคงมีเซลล์สาหร่ายที่เจริญเติบโตได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชมากขึ้นจะทำให้อาหารกลายเป็นสีขาวหรือสีส้มซึ่งไม่มีเซลล์สาหร่ายใดที่สามารถเจริญเติบโตได้ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า sethoxydim และ quizalofop เป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในนั้นแตกต่างกัน อาจจะเป็นไปได้ว่า *N. salina* มีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ดีกว่า *Chlorella* sp.

อัตราการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวลและประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลของสาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์

อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และปริมาณเซลล์ของสาหร่ายที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน จาก Table 1 แสดงให้เห็นว่า อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งเดิมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.18-0.20 % สอดคล้องกับ Wang et al. (2016) ที่ชักนำการกลายพันธุ์แก่สาหร่าย *Nannochloropsis oceanica* ด้วย EMS พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์กลาย LAMB001, LAMB002, LAMB003 ไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม

เมื่อพิจารณาผลผลิตชีวมวล และประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลดัง Table 1 พบว่า สาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์และสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมมีผลผลิตชีวมวล 0.64-0.69 กรัม/ลิตร และมีประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Zhu et al. (2014)

ที่ได้ชักนำการกลายพันธุ์ในสาหร่าย *Nannochloropsis oceanica* โดยใช้สารกำจัดวัชพืช quizalofop-ethyl และพบว่า สายพันธุ์กลาย 4-38, KA2 และ 75B1 มีผลผลิตชีวมวลไม่แตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์ดั้งเดิม Vigeeolas

et al. (2012) ศึกษาสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* โดยการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลในสายพันธุ์กลาย C4, C5, C6 และ C7 ไม่มีความแตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

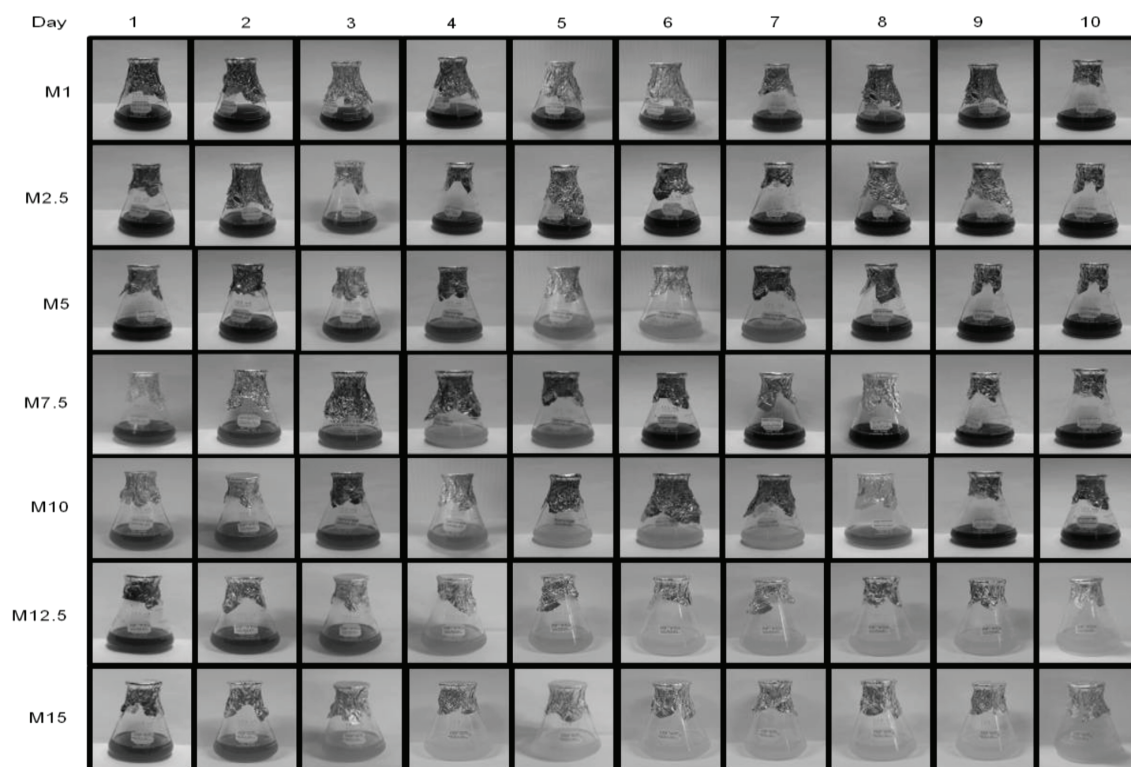


Figure 1 The growth of microalgae cultured in media containing quizalofop at the concentration of 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, and 15 μ M for 10 days

ปริมาณน้ำมัน และประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันของสาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์

วิเคราะห์การสะสมน้ำมันในสาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์จำนวน 3 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยนำตัวอย่างสาหร่ายแห้งปริมาตร 20 มิลลิกรัม มาสกัดน้ำมันโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก และวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับน้ำมันมาตรฐาน จาก Table 1 พบว่า สาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ M7.5 และ M10 สามารถสะสมปริมาณน้ำมันได้สูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยให้ปริมาณน้ำมัน 0.85 และ 0.9% (ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีปริมาณน้ำมันอยู่ 0.67% ถึง 26.87 และ 34.33% (ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม สาหร่ายสายพันธุ์กลาย M5 มีปริมาณน้ำมัน 0.62% ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีปริมาณน้ำมัน 0.67%

Patel et al. (2016) ศึกษาการกลายพันธุ์ในสาหร่าย *Synechocystis* PCC 6803 ด้วยวิธี EMS พบว่า สายพันธุ์กลาย D7 มีปริมาณน้ำมันสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 32.8% ซึ่งให้เห็นว่าสาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ส่งผลให้มีปริมาณน้ำมันภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น Zhang et al. (2016) ศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์ในสาหร่าย *Desmodesmus* sp. S81 และ G41 โดยวิธี EMS พบว่า สายพันธุ์กลาย S5 และ G3 มีปริมาณน้ำมันสูงสุด 48.41% และ 46.01% (ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิม *Desmodesmus* sp. S81 และ G41 (ตามลำดับ) Doan และ Obbard (2012) ทำการชักนำการกลายพันธุ์ด้วย EMS ในสาหร่าย *Nannochloropsis* sp พบว่า สายพันธุ์กลาย MT-15 มีปริมาณน้ำมันสูงสุดในระยะ exponential phase (10 วัน) และ stationary phase (18 วัน) เท่ากับ 16.2 และ 50.8% ซึ่งสูงกว่าในสาหร่ายพันธุ์ดั้งเดิม 7.6 และ 34% (ตามลำดับ)

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการผลิตน้ำมัน พบว่าสาหร่ายที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ M7.5 และ M10 มีประสิทธิภาพการผลิตน้ำมัน 0.14 และ 0.15 กรัม/ลิตร/วัน (ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีประสิทธิภาพการผลิตน้ำมัน 0.11 กรัม/ลิตร/วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการทดลองเห็นได้ว่า สาหร่าย M10 มีประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันสูงสุดและสูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 36.36% สอดคล้องกับการทดลองของ Mehtani et al. (2017) ที่ชักนำการกลายพันธุ์ในสาหร่าย *Chlorella minutissima* ด้วยวิธี EMS และพบว่า สายพันธุ์กลาย CM7 มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำมันสูงสุด 0.1 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งสูงกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำมัน 0.04 กรัม/ลิตร/วัน Zhang et al. (2016)

ศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์ในสาหร่าย *Desmodesmus* sp. S81 และ G41 โดยวิธี EMS พบว่าสายพันธุ์กลาย S5 และ G3 มีประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันสูงสุด 0.019 และ 0.0017 กรัม/ลิตร/วัน (ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าในสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิม Lee et al. (2014) ศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี EMS กับสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* พบว่า สายพันธุ์กลาย #128 มีประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันสูงสุด 1.28 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 1.01 กรัม/ลิตร/วัน ถึง 25% Ma et al. (2013) ศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี heavy-ion irradiation mutagenesis กับสาหร่าย *Nannochloropsis oceanica* IMET1 พบว่าสายพันธุ์กลาย HP-1 มีประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้น 28% จาก 0.21 กรัม/ลิตร/วัน เป็น 0.27 กรัม/ลิตร/วัน

Table 1 Specific growth rate, Biomass, Biomass productivity, Lipid content and Lipid productivity of wild type and mutagenized cells

Algal strain	Specific growth rate (%)	Biomass (g/L)	Biomass productivity (g/L/d)	Lipid content (%)	Lipid productivity (g/L/d)
WT	0.18 ± 0.02a	0.68 ± 0.06a	0.10 ± 0.01a	0.67 ± 0.03b	0.11 ± 0.00a
M5	0.20 ± 0.03a	0.64 ± 0.03a	0.10 ± 0.01a	0.62 ± 0.04b	0.10 ± 0.01a
M7.5	0.20 ± 0.01a	0.67 ± 0.07a	0.10 ± 0.00a	0.85 ± 0.67a	0.14 ± 0.01b
M10	0.20 ± 0.01a	0.69 ± 0.04a	0.10 ± 0.01a	0.90 ± 0.09a	0.15 ± 0.01b
F test	ns	ns	ns	**	**

Data in the column followed by different letter are significantly different based on Fisher's LSD test

**Significant difference at (P < 0.01)

สรุป

สาหร่ายสายพันธุ์ M7.5 และ M10 ที่ผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยการเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช 7.5 และ 10 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณน้ำมันและประสิทธิภาพการผลิตน้ำมันสูงกว่าสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 34.33% และ 36.36% (ตามลำดับ) จากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า การปรับปรุงพันธุ์สาหร่ายด้วยการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารกำจัดวัชพืชสามารถทำให้สาหร่ายผลิตน้ำมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้นได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กเพื่อเพิ่มความสามารถในการสะสมน้ำมันของสาหร่าย เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในอนาคตได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนอุดหนุนวิจัยพืชไร่ 2561 ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย ขอขอบคุณ ผศ.ดร. จินตนา อันอาดมิ่งงาม และ ผศ.ดร. ชัยณรงค์รัตนกริฑากุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ทศพล พรพรม. 2554. สารป้องกันกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการเข้าทำลายพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ผกามาศ ชิดเชื้อ, ปติรุจ จิรกาลวงศ์ และอรอุมา ตนะดุลย์. 2560. วิธีการทำให้เซลล์แตกเพื่อการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก. วารสารเกษตร. 33(2): 185-191.
- American Museum of Natural History. 2013. Optimizing Algae Biofuels: applied natural selection to improve lipid synthesis. Available: <https://goo.gl/c5tRu7>. Accessed Sep. 15, 2017.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25(3): 294-306.
- Doan, T.T.Y. and J.P. Obbard. 2012. Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. Algal Res. 1: 17-21.
- Lee, B., G. Choi, Y. Choi, M. Sung, M.S. Park, and J. Yang. 2014. Enhancement of lipid productivity by ethyl methane sulfonate-mediated random mutagenesis and proteomic analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Korean J. Chem. Eng. 31(6): 1036-1042.
- Lim, D.K.Y., and P.M. Schenk. 2017. Microalgae selection and improvement as oilcrops: GM vs non-GM strain engineering. AIMS Bioengineering. 4(1): 151-161.
- Ma, Y., Z. Wang, M. Zhu, C. Yu, Y. Cao, D. Zhang, and G. Zhou. 2013. Increased lipid productivity and TAG content in *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis. Bioresour. Technol. 136: 360-367.
- Mehtani, J., N. Arora, A. Patel, P. Jain, P.A. Pruthi, K.M. Poluri, and V. Pruthi. 2017. Augmented lipid accumulation in ethyl methyl sulphonate mutants of oleaginous microalgae for biodiesel production. Bioresour. Technol. 242: 121-127.
- Patel, V.K., D. Maji, S.S. Pandey, P.K. Rout, S. Sundaram, and A. Kalra. 2016. Rapid budding EMS mutants of *Synechocystis* PCC 6803 producing carbohydrate or lipid enriched biomass. Algal Res. 16: 36-45.
- Sankaran, K., C. Naveen, K.K. Vasumathi, M. Premalatha, M. Vijayasekaran, and V.T. Somasundaram. 2015. CDM potential through phycoremediation of industrial effluents. Marine Bioenergy: Trends and Developments. pp. 627-637.
- Tanadul, O., J.S. VanderGheynst, D.M. Beckles, A.L.T. Powell and J.M. Labavitch. 2014. The impact of elevated CO₂ concentration on the quality of algal starch as a potential biofuel feedstock. Biotechnol. Bioeng. 111(7): 1323-1331.
- Vigeolas, H., F. Duby, E. Kaymak, G. Niessen, P. Motte, F. Franck, and C. Remacle. 2012. Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. J. Biotechnol. 162: 3-12.
- Wang, S., L. Zhang, G. Yang, J. Han, L. Thomsen, and K. Pan. 2016. Breeding 3 elite strains of *Nannochloropsis oceanica* by nitrosoguanidine mutagenesis and robust screening. Algal Res. 19: 104-108.
- Zhang, Y., M. He, S. Zou, C. Fei, Y. Yan, S. Zheng, A.A. Rajper, and C. Wang. 2016. Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by ethylmethane sulfonate-induced mutation. Bioresour. Technol. 207: 268-275.
- Zhu, B., F. Sun, M. Yang, L. Lu, G. Yang, and K. Pan. 2014. Large-scale biodiesel production using flue gas from coal-fired power plants with *Nannochloropsis* microalgal biomass in open raceway ponds. Bioresour. Technol. 174: 53-59.