

# Conteúdo lipídico e biomassa de *Chlorella homosphaera* cultivada de modo heterotrófico sob diferentes concentrações de carbono e nitrogênio

Pires Ferreira, Shana<sup>1,2</sup> & Jorge Alberto Vieira Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), Avenida Itália KM 8, CEP: 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil; <sup>2</sup>shanaferreira@gmail.com

Pires Ferreira, Shana; Jorge Alberto Vieira Costa (2017) Conteúdo lipídico e biomassa de *Chlorella homosphaera* cultivada de modo heterotrófico sob diferentes concentrações de carbono e nitrogênio. Rev. Fac. Agron. Vol 116 (1): 19-28.

O crescente interesse no estudo do cultivo de microalgas tem sido realizado visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos bioativos e medicinais com alto valor no mercado mundial. Estes são empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da concentração das fontes de carbono (glicose, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) e nitrogênio (N-NO<sub>3</sub>) no crescimento heterotrófico e na produtividade lipídica da microalga *Chlorella homosphaera*. O planejamento fatorial fracionário utilizado foi do tipo 3<sup>2</sup>, o qual totaliza 9 combinações, das quais foram utilizadas apenas 5 combinações sendo uma delas em triplicata. Os fatores de estudo foram as concentrações de glicose (5, 10 e 15 g.L<sup>-1</sup>) e de N-NO<sub>3</sub> (82,5; 165 e 247,5 mg.L<sup>-1</sup>) e as respostas analisadas foram as concentrações de lipídeos totais e de biomassa. O cultivo realizado com 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 247,5 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub> foi o que apresentou maior produção de biomassa (1,22 g.L<sup>-1</sup>) e maior produtividade lipídica (13,07 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), com predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0 - 23,6 %p/p) e linoléico (C18:1n9 - 22,4 %p/p). A interação entre a concentração de glicose e de N-NO<sub>3</sub> influenciou significativamente as respostas concentração de lipídeos totais e a concentração máxima de biomassa. A microalga em estudo produziu a maior concentração de lipídeos quando cultivada com a menor concentração de glicose associada a maior concentração de nitrogênio do planejamento experimental, o que é muito promissor para a indústria.

**Palavras-chave:** *Chlorella homosphaera*, óleo de microalga, glicose, nitrogênio, batelada alimentada.

Pires Ferreira, Shana; Jorge Alberto Vieira Costa (2017) Lipid content and *Chlorella homosphaera* biomass grown under heterotrophic conditions and different carbon and nitrogen concentrations. Rev. Fac. Agron. Vol 116 (1): 19-28.

The increasing interest in the study of microalgae cultivation has been oriented to biomass production in order to use it in food preparation, as well as in bioactive compounds with high medicinal value in the world markets. They are especially used in functional food development, owing to their nutritional and pharmaceutical properties. The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of the carbon source (glucose) and nitrogen source (N-NO<sub>3</sub>) in heterotrophic growth and lipid productivity of microalga *Chlorella homosphaera*. The fractional factorial design used was of type 3<sup>2</sup>, which offers 9 combinations, only 5 were used and one of them in triplicate. The factors were glucose (5, 10 and 15 g.L<sup>-1</sup>) and N-NO<sub>3</sub> (82.5; 165 and 247.5 mg.L<sup>-1</sup>) concentrations and the response variables were the total lipid and the biomass concentrations. The treatment with 5 g.L<sup>-1</sup> of glucose and 247.5 mg.L<sup>-1</sup> of N-NO<sub>3</sub> showed the highest biomass yield (1.22 g.L<sup>-1</sup>) and the highest lipid productivity (13.07 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), predominantly composed of palmitic (C16:0 - 23.6 %w/w) and linoleic (C18:1n9 - 22.4 %w/w) fatty acids. The interaction between the concentration of glucose and N-NO<sub>3</sub> concentration influenced significantly the responses of total lipids and the maximum concentration of biomass. The microalga studied produced a higher concentration of lipids when grown with the lowest concentration of glucose associated with a higher concentration of nitrogen experimental design, which is very promising at the industrial.

**Key words:** *Chlorella homosphaera*, microalga oil, glucose, nitrogen, fed batch culture.

Recibido: 31/03/2015

Aceptado: 26/12/2016

Disponibile on line: 31/07/2017

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

## INTRODUÇÃO

O acúmulo de lipídeos pelas microalgas a fim de fornecer recursos alternativos na obtenção de matéria oleosa é uma área de pesquisa que está chamando atenção para produção de biodiesel, bem como para obtenção de ácidos graxos poli-insaturados para nutrição humana, devido à sua alta eficiência de produção e menor demanda de terras agrícolas (Heredia-Arroyo et al., 2010).

Nas microalgas, o armazenamento de material oleoso ocorre no meio intracelular, e a concentração varia de acordo com a cepa e condições de crescimento. Há muitos fatores nutricionais e ambientais que controlam o crescimento celular e a biossíntese de bioprodutos, como por exemplo de lipídeos (Heredia-Arroyo et al., 2010; Huang et al., 2010). Dentre estes fatores estão as fontes de carbono inorgânico e orgânico (Morais & Costa, 2007; Perez-Garcia et al., 2011), concentrações de nitrogênio (Aslan & Kapdan, 2006), salinidade (Alyabyev et al., 2007), temperatura, pH, velocidade de agitação, oxigênio dissolvido (Heredia-Arroyo et al., 2010), etc. Além destes, a relação C/N também é importante pois influencia no conteúdo lipídico armazenado nas células microalgais (Heredia-Arroyo et al., 2010).

Uma alternativa para aumentar a produtividade lipídica e de biomassa é o cultivo heterotrófico, no qual é realizado na ausência de luz e por isso torna-se necessário a utilização de compostos orgânicos, como fonte de carbono e energia, para o crescimento celular dentre outras funções celulares (Perez-Garcia et al., 2011). Este aumento drástico de lipídeos e de biomassa é importante para diminuir o custo de produção em relação aos cultivos autotróficos. Por este motivo, a seleção de cepas de microalgas e otimização de seus crescimentos para produção de biomassa e de lipídeos, por meio do cultivo heterotrófico têm despertado interesse de vários pesquisadores (Liang et al., 2009; Perez-Garcia et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012).

As fontes de carbono são os elementos mais importantes no cultivo heterotrófico de microalgas para produção de lipídeos. Segundo Wu et al., (1994) a microalga *Chlorella protothecoides* quando cultivada de modo heterotrófico utilizando acetato, glicose ou outros compostos orgânicos como fonte de carbono, produziu elevada concentração de biomassa, bem como de lipídeos. Além disso, microalgas heterotróficas podem utilizar outras fontes de carbono tal como etanol, glicerol e frutose dependendo da espécie (Yokochi et al., 1998). Além do carbono, o nitrogênio é quantitativamente o elemento mais importante que contribui para a matéria seca de células de microalgas, o que representa de 1 a 10 % do peso seco. Isso exclui as diatomáceas, onde o silício desempenha papel mais importante do que o nitrogênio (Martin-Jezequel et al., 2000). Segundo Richmond (2004) as microalgas tendem a fazer reservas de energia, tal como o acúmulo de lipídeos, quando encontram-se em meio com limitação da fonte nitrogenada, com exceção da microalga *Dunaliella* (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Conforme mencionam estes autores, a ausência e/ou limitação de nitrogênio no meio de cultivo propicia a obtenção de lipídeos neutros. Além disso, os valores

limitantes de nitrogênio variam de acordo com gênero, espécie e até mesmo cepa de microalga.

De acordo com Wu et al. (1994), algumas espécies de *Chlorella* têm a capacidade de crescer em ambiente fotoautotrófico ou heterotrófico, como por exemplo, a *Chlorella protothecoides*. Xu et al. (2006) cultivaram esta microalga nos dois modos, autotrófico e heterotrófico, e o conteúdo de lipídeos foi de 14,57 % e 55,20 %, respectivamente.

Os resultados de diferentes pesquisadores desde 2006 até a atualidade mostram que o cultivo heterotrófico propicia maior acúmulo de lipídeos nas células de microalgas quando comparados com os cultivos realizados na presença de luz. No entanto, deve-se alterar as condições de cultivo quando deseja-se obter maior concentração de ácidos graxos saturados, para produção de biodiesel, ou de ácidos graxos poli-insaturados, quando a intenção é utilizá-los em alimentos funcionais. Sabendo-se que a microalga do gênero *Chlorella* (Div. Chlorophyta) é excelente produtora de lipídeos quando se trata de cultivo em modo heterotrófico e tem sido extensivamente estudada mostrando grande potencial para a produção de lipídeos (Liang et al., 2009; Shen et al., 2010; O'Grady & Morgan, 2011), decidiu-se escolher a microalga *Chlorella homosphaera* do banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para realizar o estudo.

Tendo-se em vista que, em cultivos realizados na ausência de luz, a fonte de carbono é determinante para o desenvolvimento da microalga e consequente produção de bioprodutos e a redução da fonte nitrogenada influencia na produção de lipídeos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da concentração das fontes de carbono (glicose) e de nitrogênio (N-NO<sub>3</sub>) no crescimento de biomassa e na produtividade lipídica da microalga *Chlorella homosphaera* em condições heterotróficas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga utilizada neste estudo foi *Mychonastes homosphaera* (Krienitz et al., 2011; Costa et al., 2006), pertencente à Coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) registrada com o nome, sinônimo, de *Chlorella homosphaera*. A microalga foi mantida e cultivada em Meio BG11 (Rippka et al., 1979).

### Condições de cultivo

Anteriormente à realização dos experimentos, o inóculo foi colocado em estufa termostatizada a 30 °C com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, iluminância de 2500 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo luz do dia e circulação de ar estéril, para aumentar a concentração celular. Posteriormente, foi realizado acompanhamento em microscópio a fim de constatar se havia somente a microalga de interesse para os cultivos. Logo a seguir, as microalgas foram adaptadas à condição dos experimentos. O término da adaptação foi considerado o momento em que a microalga consumiu totalmente a glicose, o que variou conforme

concentração da fonte de carbono. A adaptação dos ensaios realizados com 5, 10 e 15 g.L<sup>-1</sup> de glicose chegaram ao fim em 1, 2 e 3 dias, respectivamente. Sendo assim, os experimentos foram iniciados logo após o período de adaptação da microalga à glicose em que a microalga foi cultivada nas concentrações de glicose e nitrogênio selecionadas.

#### Delineamento experimental

Para o estudo foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionário 3<sup>2</sup>, totalizando nove combinações possíveis, porém realizou-se cinco combinações onde uma delas fez-se três repetições. As variáveis estudadas foram concentração de glicose (X<sub>1</sub>) (5, 10 e 15 g.L<sup>-1</sup>) e concentração de N-NO<sub>3</sub> (X<sub>2</sub>) (82,5; 165 e 247,5 mg.L<sup>-1</sup>), conforme mostra a Tabela 1. As respostas analisadas foram concentração de lipídeos totais e concentração celular máxima (X<sub>max</sub>). Os níveis propostos para cada variável foram baseados em ensaios preliminares (dados não mostrados). Assumido que a normalidade e homogeneidade de variâncias foram verificados, o teste estatístico foi seguido por análise de regressão e ANOVA. Posteriormente, foi possível calcular os modelos codificados (Equações 1 e 2) que descrevem as superfícies de resposta da concentração de lipídeos totais (Figura 2) e da concentração máxima de biomassa (Figura 3). O efeito das variáveis estudadas sobre as respostas foi analisado estatisticamente com nível de significância de 90 % (p≤0,10).

$$(1) \text{ Lipídeos totais} = 8,53 + 1,33 \cdot X_2 - 1,25 \cdot X_1 \cdot X_2$$

$$(2) \text{ Biomassa máxima} = 0,85 - 0,16 \cdot X_1 \cdot X_2$$

Os cultivos foram realizados em modo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono e energia. A adição de glicose aos cultivos foi realizada diariamente em modo batelada alimentada na proporção de 1/10 da concentração total de glicose (conforme delineamento experimental) durante 10 dias de experimento. Os cultivos foram realizados em agitador orbital (INNOVA®44, USA) a 150 rpm e 30 °C utilizando biorreatores fechados de 2 L com volume útil de 1,6 L. A concentração inicial da biomassa foi 0,15 g.L<sup>-1</sup>. Ao final dos cultivos, as amostras foram centrifugadas e posteriormente liofilizadas.

#### Determinações analíticas

A amostragem dos cultivos foi realizada a cada 24 h. Amostras foram coletadas assepticamente para determinação da concentração celular, obtida por meio da análise de densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro (Femto Plus 700, Brasil) com auxílio de curva de calibração pré-determinada.

A concentração de glicose foi determinada no meio de cultivo a cada 24 h utilizando kit enzimático colorimétrico (Doles, Brasil), com leitura em absorvância a 510 nm e conversão à concentração de glicose por curva de calibração.

O pH das culturas foi determinado diariamente utilizando pHmetro digital (Quimis Q400HM, Brasil). A concentração de nitrogênio foi determinada diariamente no meio de cultivo utilizando método colorimétrico proposto por Cataldo et al., (1975).

#### Quantificação de lipídeos totais e perfil de ácidos graxos

Para a quantificação de lipídeos totais foi utilizada a metodologia proposta por Folch et al. (1957) com etapa prévia de rompimento da parede celular através de banho ultrassônico. A fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia adaptada de Metcalfe et al. (1966).

A determinação de ácidos graxos foi realizada em Cromatógrafo Gasoso Varian 3400CX, equipada com detector de ionização de chama e coluna ZB-WAX com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme. O gás de arraste foi hidrogênio a 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 300 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 40 °C aumentando 6 °C.min<sup>-1</sup> até 100 °C permanecendo 1 min, após a 160 °C permanecendo 5 min e a 230 °C permanecendo 10 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões de ácidos graxos (Sigma Supelco; Belle-fonte, EUA) e quantificados por normalização de áreas.

#### Produtividade lipídica

A produtividade lipídica dos diferentes ensaios foi calculada levando-se em consideração a concentração celular de cada experimento, concentração de lipídeos do inóculo de onde partiram os experimentos e ao final dos 10 dias de cultivo, e o tempo de cultivo.

A produtividade lipídica foi calculada através da Equação 3.

$$(3) \quad P = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0}$$

Onde:

X<sub>f</sub> = concentração celular final \* concentração lipídica inicial (mg<sub>lip</sub>. L<sup>-1</sup>);

X<sub>i</sub> = concentração celular inicial \* concentração lipídica final (mg<sub>lip</sub>. L<sup>-1</sup>);

t<sub>f</sub> = tempo final (d<sup>-1</sup>);

t<sub>i</sub> = tempo inicial (d<sup>-1</sup>).

#### Fatores de conversão

O cálculo dos fatores de conversão Y<sub>P/S1</sub> (glicose em lipídeos), Y<sub>P/S2</sub> (nitrogênio em lipídeos), Y<sub>X/S1</sub> (glicose em biomassa) e Y<sub>X/S2</sub> (nitrogênio em biomassa) foi realizado com base nas Equações 4 e 5, respectivamente.

$$(4) \quad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

$$(5) \quad Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Onde:

$P$  = produto, no caso, lipídeos;

$S$  = substrato.  $S_1$  = glicose e  $S_2$  = nitrogênio;

$X$  = biomassa.

A concentração celular inicial de lipídeos ( $P_0$ ), foi considerada àquela obtida do inóculo de *C. homosphaera*, de onde partiram os experimentos do delineamento experimental. A quantificação dos lipídeos totais do inóculo foi realizada mediante metodologia proposta por Folch et al. (1957), obtendo-se um valor de 3,17 %p/p.

A concentração inicial de glicose ( $S_0$ ) foi considerada igual à concentração total de glicose adicionada no cultivo (5, 10 ou 15 g.L<sup>-1</sup>), mesmo que a adição de glicose tenha sido realizada em batelada alimentada na proporção de 1/10 da concentração total.

## RESULTADOS

A microalga *C. homosphaera* apresentou comportamento diferenciado com relação à produção de biomassa e consumo de glicose e nitrogênio nos diferentes ensaios. A Figura 1 mostra as curvas de crescimento da microalga *Chlorella homosphaera* em função da concentração de nitrogênio e glicose consumida ao longo dos 10 dias de cultivo, nos diferentes experimentos realizados. A microalga consumiu toda a glicose nos ensaios 1, 3, 5, 6 e 7 do planejamento experimental, os quais correspondem a menor concentração de glicose (5 g.L<sup>-1</sup>) adicionada (ensaios 1 e 3) e a concentração intermediária (10 g.L<sup>-1</sup>) (ensaios 5, 6 e 7). O consumo total de nitrogênio do meio de cultivo foi observado somente no 3º dia de experimento dos ensaios 5, 6 e 7.

Nota-se, para os ensaios 1, 3, 5, 6 e 7, que a microalga foi se multiplicando à medida em que foi consumida a glicose. O maior crescimento celular (1,22 g.L<sup>-1</sup>) e maior conteúdo lipídico (11,70 %p/p) foram observados no ensaio 3 (Tabela 1), quando a microalga utilizou como substrato a menor concentração de glicose testada (5 g.L<sup>-1</sup>). A microalga consumiu 64 % do nitrogênio e 100 % da glicose disponibilizados para manter suas funções celulares e crescer.

Os ensaios 1, 2, 3 e 4 apresentaram nitrogênio disponível para a microalga *C. homosphaera* até o décimo dia de cultivo, porém em concentrações diferentes. No ensaio 1 é possível notar que a medida em que a microalga consome nitrogênio sua concentração celular aumenta, porém, a concentração de lipídeos ao final deste ensaio foi de 5,94 %p/p (Tabela 1), a menor de todos os ensaios do planejamento fatorial.

No terceiro dia de experimento, quando a microalga *C. homosphaera* foi cultivada nas condições dos ensaios 5, 6 e 7, a concentração de biomassa foi de aproximadamente 0,40 g.L<sup>-1</sup> (Figura 1). Posteriormente, a microalga continuou se multiplicando (fase exponencial), atingindo 0,77 g.L<sup>-1</sup>, mostrando um incremento de 0,37 g.L<sup>-1</sup> após cessar a fonte de nitrogênio.

Os ensaios 2 e 4 apresentaram fase estacionária de crescimento celular e acúmulo de glicose no meio de cultivo a partir do 4º e 3º dias, respectivamente. O crescimento celular máximo foi de 0,93 e 0,77 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 1) com consumo de nitrogênio de 61 e 49 % e produção de lipídeos de 9,54 e 9,70 %p/p (Tabela 1) para os ensaios 2 e 4, respectivamente.

A Tabela 2 apresenta os fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ). Da análise da referida tabela é possível verificar que a conversão de glicose em lipídeos ocorreu no experimento 3 ( $Y_{P/S1} = 0,0261$ ). Com relação ao substrato nitrogênio, a maior conversão deste em lipídeos deu-se nos experimentos 2 ( $Y_{P/S2} = 1,6459$ ) e 4 ( $Y_{P/S2} = 1,1838$ ).

No experimento 2, além da maior conversão de nitrogênio em lipídeo observa-se também a maior conversão de nitrogênio em biomassa ( $Y_{X/S2} = 15,29$ ). No experimento 3, além de haver a maior conversão de glicose em lipídeos também há maior conversão de glicose em biomassa ( $Y_{X/S1} = 0,21$ ).

Nos experimentos 2 e 4, o substrato glicose não foi consumido completamente pela microalga *C. homosphaera*. O mesmo é observado nos experimentos 1, 2, 3 e 4 com relação ao substrato nitrogênio.

A Tabela 3 apresenta o perfil cromatográfico da microalga *C. homosphaera* cultivada na condição de menor concentração da fonte de carbono e maior concentração da fonte de nitrogênio. Neste perfil é possível verificar que o ácido palmítico (C16:0), apareceu em maior concentração (23,6 %p/p) dentre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Dentre os ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oléico (C18:1n9), apareceu na concentração de 22,4 %p/p.

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, ácido *cis*-5,8,11,14,17-icosapentaenóico (C20:5n3) (EPA, C20:5n3) e ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (C22:6n3) (DHA, C22:6n3) apareceram em menores concentrações, 0,4 e 0,3 %p/p, respectivamente.

Analisando-se os dados de concentração de lipídeos totais segundo metodologia estatística (Tabela 4), foi possível verificar que houve efeito significativo ( $p \leq 0,10$ ) da variável concentração de N-NO<sub>3</sub> e de sua interação com a concentração de glicose. A interação entre as variáveis foi considerada significativa ( $p = 0,1022$ ), uma vez que o valor de  $p$  está muito perto do limite de aceitação, se distanciando apenas na terceira casa decimal.

No cálculo da análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para a concentração de lipídeos totais os parâmetros estatisticamente não significativos foram incorporados aos resíduos. Além disso, com exceção da concentração de glicose, as outras variáveis foram significativas a um nível de confiança

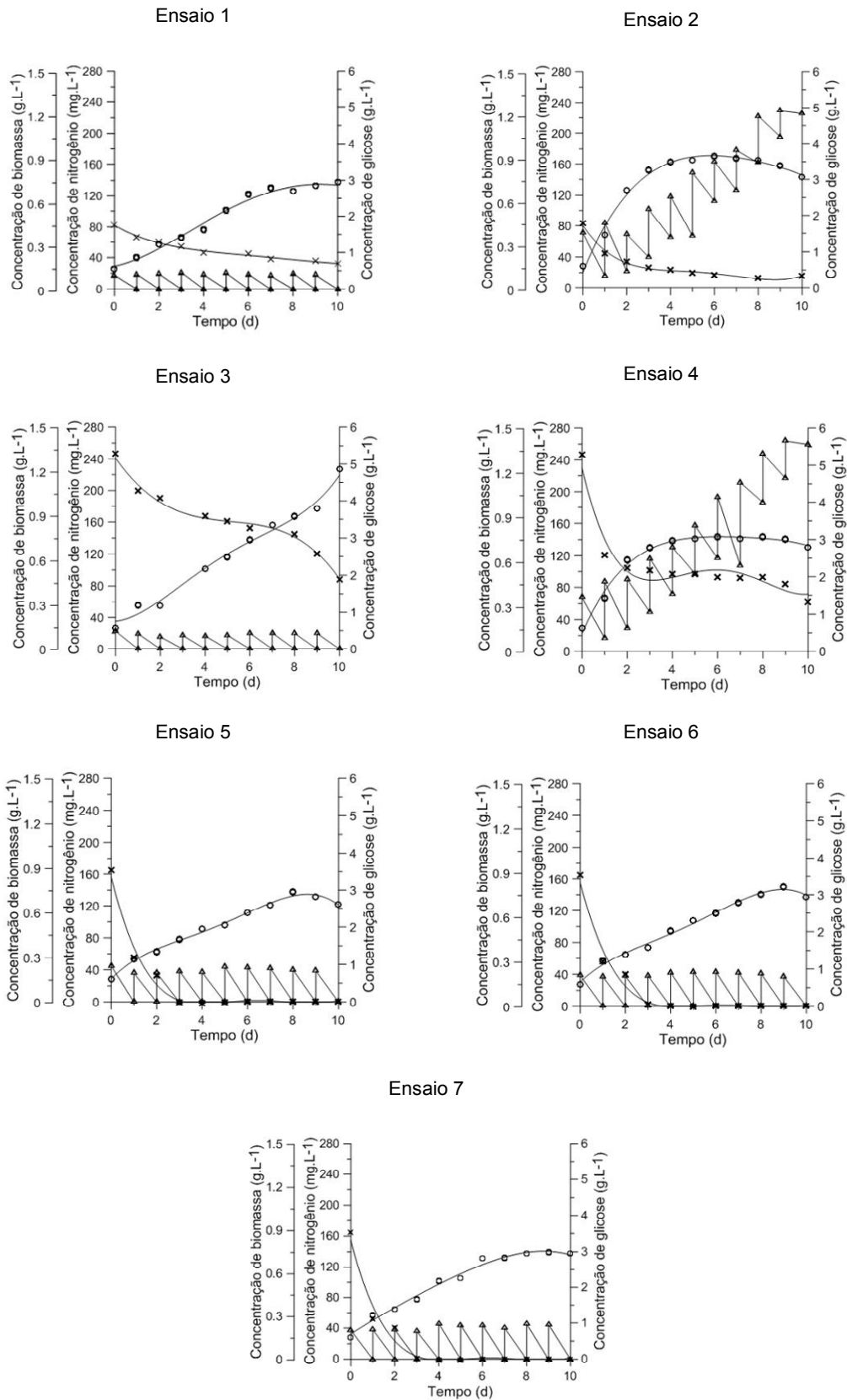


Figura 1. Curvas de crescimento celular em função do consumo de glicose e de nitrogênio. O (concentração de biomassa), Δ (concentração de glicose) e x (concentração de nitrogênio).

Tabela 1. Concentração máxima de biomassa, concentração de lipídeos totais e produtividade lipídica.

Experimento	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	X <sub>máx</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Lipídeos (%p/p)	Produtividade Lipídica (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
1	5	82,5	0,75	5,94±1,04	3,98
2	15	82,5	0,93	9,54±1,09	8,40
3	5	247,5	1,22	11,10±0,46	13,07
4	15	247,5	0,77	9,70±0,39	6,99
5	10	165,0	0,74	7,76±0,19	5,27
6	10	165,0	0,81	7,24±0,35	5,03
7	10	165,0	0,75	8,43±1,24	5,85

Tabela 2. Fatores de conversão calculados para os diferentes experimentos do planejamento fatorial. Referências: Y<sub>P/S1</sub>: fator de conversão de glicose em lipídeos; Y<sub>P/S2</sub>: fator de conversão de nitrogênio em lipídeos; Y<sub>X/S1</sub>: fator de conversão de glicose em biomassa; Y<sub>X/S2</sub>: fator de conversão de nitrogênio em biomassa; S<sub>1</sub>: concentração de glicose (g.L<sup>-1</sup>); S<sub>2</sub>: concentração de nitrogênio (g.L<sup>-1</sup>).

Experimento	Fatores de Conversão			
	Y <sub>P/S1</sub>	Y <sub>P/S2</sub>	Y <sub>X/S1</sub>	Y <sub>X/S2</sub>
1	0,0079	0,7949	0,12	12,00
2	0,0082	1,6459	0,08	15,29
3	0,0261	0,9331	0,21	7,64
4	0,0073	1,1838	0,07	10,51
5	0,0052	0,6420	0,06	7,20
6	0,0050	0,6053	0,06	7,35
7	0,0058	0,7041	0,06	7,23

Tabela 3. Perfil cromatográfico (%p/p) da microalga *Chlorella homosphaera* cultivada com 5 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 247,5 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub> (Experimento 3). Referências: AG: Ácidos graxos; n3: ácido graxo ω3; n6: ácido graxo ω6; n9: ácido graxo ω9; \*: não detectado.

AG	Concentração (%p/p)	AG	Concentração (%p/p)
C12:0	2,5	C18:3n6	0,4
C14:0	1,6	C18:3n3	0,3
C14:1	0,9	C20:1n9	0,6
C15:0	1,7	C20:5	*
C15:1	0,8	C20:3n6	*
C16:0	23,6	C20:3n3	*
C16:1	8,1	C20:4n6	0,2
C17:0	1,6	C22:2	0,2
C17:1	*	C20:5n3	0,4
C18:0	2,4	C24:0	0,2
C18:1n9	22,4	C24:1n9	0,6
C18:2n6	16,9	C22:6n3	0,3
C20:0	14,6		

de 90 % (p=0,07). O valor do F<sub>calculado</sub> (F<sub>cal</sub>=5,73) para regressão foi maior que o F<sub>tabelado</sub> (F<sub>tab</sub>=4,32). O modelo possui um percentual de variação explicado de 80 % (R<sup>2</sup>). A Figura 2 apresenta a superfície de resposta onde é possível verificar as melhores condições de concentração de glicose e concentração de N-NO<sub>3</sub> que proporcionam o maior teor de lipídeos totais.

Os valores de concentração máxima de biomassa obtidos no planejamento experimental foram analisados, obtendo-se os resultados da Tabela 5. A

partir dos dados foi possível verificar que houve efeito significativo (p≤0,10) apenas da interação das variáveis concentração de glicose e concentração de N-NO<sub>3</sub> na resposta concentração máxima de biomassa.

No cálculo da análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para a concentração máxima de biomassa os parâmetros estatisticamente não significativos foram incorporados aos resíduos. Além disso, somente a interação entre as duas variáveis estudadas (concentração de glicose e concentração de N-NO<sub>3</sub>) foi significativa a um nível de confiança de 90 %

( $p=0,06$ ). O valor do  $F_{\text{calculado}}$  ( $F_{\text{cal}}=5,90$ ) para regressão foi maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{\text{tab}}=4,06$ ). O modelo possui um percentual de variação explicado de 77 % ( $R^2$ ). A Figura 3 apresenta a superfície de resposta onde é possível verificar as melhores condições de concentração de glicose e concentração de  $N-NO_3$  que proporcionam a maior concentração de biomassa em que a microalga *Chlorella homosphaera* produziu maior concentração de biomassa, com valores próximos de  $1,1 \text{ g.L}^{-1}$ , nas extremidades da superfície.

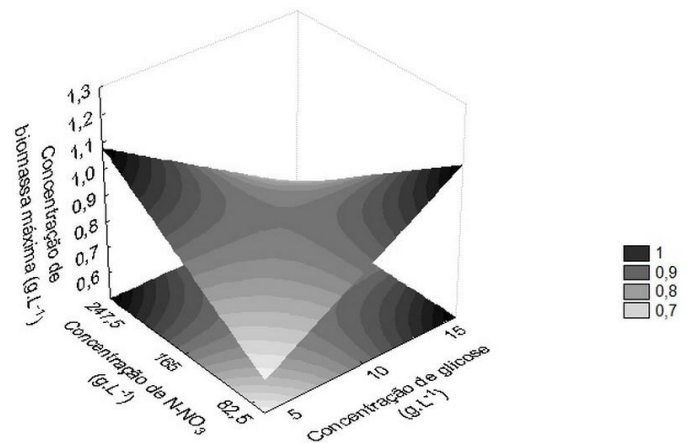


Figura 3. Superfície de resposta da concentração máxima de biomassa em relação as variáveis estudadas concentração de glicose e concentração de  $N-NO_3$ .

Tabela 4. Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração de lipídeos totais. Referências:  $X_1$ : concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $X_2$ : concentração de  $N-NO_3$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ); \* variáveis estatisticamente significativas (90 % de confiança).

Variável	Coefficientes de Regressão	Desvio	t(3)	p
Média*	8,53	0,40	21,07	0,0002
$X_1$	0,55	0,54	1,02	0,3806
$X_2$	1,33	0,54	2,48	0,0888*
$X_1 \cdot X_2$	-1,25	0,54	-2,33	0,1022*

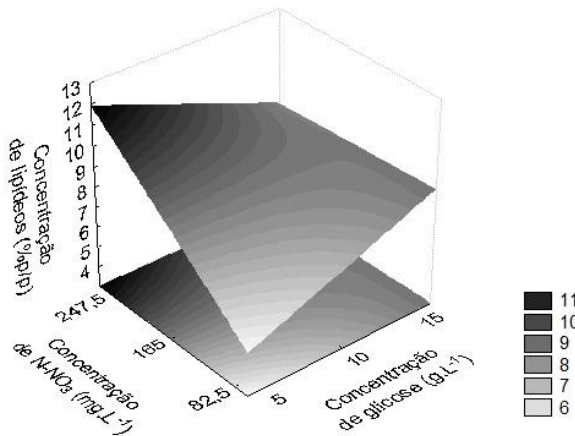


Figura 2. Superfície de resposta da concentração de lipídeos totais em relação as variáveis estudadas, concentração de glicose e concentração de  $N-NO_3$ .

Tabela 5. Coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração máxima de biomassa.  $X_1$ : concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $X_2$ : concentração de  $N-NO_3$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ); \* variáveis estatisticamente significativas (90 % de confiança).

Variável	Coefficientes de Regressão	Desvio	t(3)	p
Média*	0,85	0,04	19,10	0,0003
$X_1$	-0,07	0,06	-1,14	0,3361
$X_2$	0,08	0,06	1,31	0,2809
$X_1 \cdot X_2$	-0,16	0,06	-2,67	0,0759*

## DISCUSSÃO

A glicose é a fonte de carbono mais comumente utilizada para cultivos heterotróficos de microalgas, como é o caso de muitas outras espécies microbianas. Elevadas taxas de crescimento e respiração são obtidas quando utiliza-se a glicose como substrato (Perez-Garcia et al., 2011).

Apesar da alimentação de glicose ter sido realizada diariamente na proporção de 1/10 da concentração total de cada ensaio do planejamento experimental, é possível verificar que nos ensaios 2 e 4 a microalga não conseguiu consumir toda a glicose. Isto indica que a concentração diária adicionada (equivalente a  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi elevada para esta espécie de *Chlorella* podendo ter ocasionado a saturação da célula microalgal. Sendo assim, estes ensaios ficaram mais susceptíveis à contaminação por outros micro-organismos, uma vez que desde o primeiro dia de cultivo houve o acúmulo de glicose no meio e sua concentração aumentou até o décimo dia de cultivo. Porém, isto não quer dizer que tais ensaios estavam contaminados por bactérias ou fungos e sim que havia maior probabilidade de contaminação por micro-organismos não fotossintéticos em função da disponibilidade de glicose no meio de cultivo.

Sabe-se que o carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para microalgas, e que sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, tal como os lipídeos. No entanto, nossos resultados mostram que as maiores concentrações de lipídeos foram encontradas nos ensaios 2 ( $15 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose), 3 ( $5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose) e 4 ( $15 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose). Nesse sentido, é possível verificar que a maior concentração de lipídeos não depende somente da utilização da maior concentração de glicose no cultivo da microalga em estudo, mas sim da interação das concentrações de glicose e de nitrogênio. Esses resultados podem ser observados na Figura 1 e são comprovados

estatisticamente, conforme mostram as Tabela 4 e Figura 2.

Os resultados mostrados na Figura 1, também indicam que a microalga obteve fase exponencial quando consumiu maior concentração de nitrogênio. Além disso, observa-se que a maior concentração de lipídeos e de biomassa ocorreu no cultivo 3, que continha a maior concentração de  $N-NO_3$  ( $247,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e que a microalga não consumiu totalmente o nitrogênio disponível. Tal fato pode ter ocorrido em função da quantidade insuficiente de glicose no meio de cultivo, que em determinado momento acabou impedindo a microalga de se multiplicar e conseqüentemente, de usar a fonte nitrogenada. Essa peculiaridade está relacionada especificamente as quantidades de glicose e nitrogênio utilizadas em tal experimento.

A maior produção de lipídeos e menor multiplicação celular normalmente estão intimamente ligados a limitação da fonte de nitrogênio, quando se trata de cultivo heterotrófico descontínuo. Isto foi observado nos estudos com outras espécies de *Chlorella* (Xu et al., 2006; Liu et al., 2008; Hsieh & Wu, 2009; Perez-Garcia et al., 2011; Isleten-Hosoglu et al., 2012; Wang et al., 2012), ao passo que no nosso estudo, com a *Chlorella homosphaera* (experimento 3), isto não foi observado. Tão pouco foi observado nos experimentos 5, 6 e 7, nos quais a fonte nitrogenada se esgotou no 3º dia de cultivo. Ademais, nesses três experimentos (5, 6 e 7), nota-se que a microalga conseguiu manter suas funções e apresentar multiplicação celular até pelo menos o oitavo ou nono dia. Este resultado não era esperado, uma vez que sabe-se que a limitação da fonte nitrogenada é diretamente proporcional a redução da multiplicação celular, em cultivo na ausência de luz. Porém, acredita-se que essa cepa estudada seja capaz de manter intracelularmente reserva de nitrogênio.

Ainda analisando-se a limitação da fonte nitrogenada no meio de cultivo, quando faz-se uma comparação entre os experimentos 2 e 3 os resultados justificam que a redução de  $N-NO_3$  no meio de cultivo resulta em menor crescimento celular ( $0,93 \text{ g.L}^{-1}$ ), o que já era esperado. No entanto, o conteúdo lipídico foi reduzido ( $9,54 \text{ \%p/p}$ ), o que pode estar associado, em particular, a espécie de *Chlorella* utilizada no estudo, já que normalmente esta condição levaria a um aumento da concentração lipídica.

A produtividade lipídica máxima dos diferentes ensaios realizados neste trabalho com a microalga *Chlorella homosphaera* cultivada em modo heterotrófico foi de  $13,07 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Song et al., (2013), realizou estudo em modo autotrófico com *Chlorella vulgaris* e obteve produtividade lipídica máxima de  $7,96 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Com a mesma espécie microalgal sendo o cultivo realizado também na presença de luz, porém com modificações nas variáveis do cultivo, Lee et al., (2010) obtiveram produtividade lipídica máxima de  $11,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Já Chen et al., (2013) cultivando *Chlorella* autotroficamente obteve produtividade lipídica máxima de  $12,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *Chlorella emersonii* CCAP211/11N e de  $42,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. F&M-M48. Os valores máximos de produtividade lipídica dos cultivos autotróficos são menores que o valor máximo obtido nesse estudo, com exceção do cultivo da microalga *Chlorella* sp. F&M-M48.

No que diz respeito aos fatores de conversão de substrato em produto, no experimento 2, é possível observar que 1 g de nitrogênio produz  $1,6459 \text{ g}$  de lipídeos e  $15,29 \text{ g}$  de biomassa. Além disso, indicam que a limitação de nitrogênio no meio de cultivo ( $0,066 \text{ g.L}^{-1}$ ) estimulou a produção de lipídeos ( $9,54 \text{ \%p/p}$ ), como já era esperado. No entanto, não se esperaria que a microalga se multiplicasse  $520 \text{ \%}$ , uma vez que a restrição de algum nutriente do meio de cultivo restringe também seu crescimento, apesar de estressar a microalga e estimular a biossíntese de bioprodutos de alto valor agregado. Já no experimento 3, verifica-se que 1 g de glicose (substrato) produziu  $0,0261 \text{ g}$  de lipídeos e  $0,21 \text{ g}$  de biomassa. Esse resultado não era esperado uma vez que nesse experimento (3) a microalga *C. homosphaera* foi cultivada com a maior concentração de nitrogênio no meio de cultivo e, que normalmente não se esperaria maior concentração lipídica. Porém, era esperado a maior concentração celular, como de fato ocorreu.

Estudos com a microalga *Chlorella*, porém de diferentes espécies, tal como a *Chlorella saccharophila* (Isleten-Hosoglu et al., 2012) e *Chlorella kessleri* (Wang et al., 2012), cultivadas em modo heterotrófico, encontraram-se elevadas concentrações de ácidos graxos. O ácido palmítico (C16:0), o qual é o precursor dos demais ácidos graxos saturados e insaturados (Nelson & Cox, 2011) foi produzido por estas microalgas em uma concentração de  $24,2 \text{ \%p/p}$  e  $30,4 \text{ \%p/p}$ , respectivamente. O ácido graxo oléico (C18:1n9), no qual é o precursor dos ácidos graxos da família  $\omega 9$  e é insaturado por uma insaturase  $\Delta^{12}$  para formar o ácido linoléico (C18:2  $\omega 6$ ), que por sua vez origina os ácidos graxos  $\alpha$ -linoléico e  $\gamma$ -linoléico, formando assim, os demais ácidos graxos poli-insaturados foram produzidos em uma porcentagem de  $32,2 \text{ \%p/p}$  e  $20,96 \text{ \%p/p}$ , respectivamente. Em nosso estudo encontramos valores de  $23,6 \text{ \%p/p}$  de ácido palmítico (C16:0), o qual é  $0,6 \text{ \%p/p}$  e  $6,86 \text{ \%p/p}$  inferior aos encontrados para as espécies *C. saccharophila* e *C. kessleri*, respectivamente. Já o ácido graxo oléico (C18:1n9) apareceu na concentração de  $22,4 \text{ \%p/p}$ , sendo  $9,8 \text{ \%p/p}$  inferior ao do estudo realizado com a microalga *C. saccharophila* e  $1,44 \text{ \%p/p}$  superior à concentração encontrada quando cultivaram *C. kessleri*.

As menores concentrações de EPA ( $0,4\%$ ) e DHA ( $0,3\%$ ) indicam que a microalga *C. homosphaera* cultivada na ausência de luz com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  e  $247,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $N-NO_3$  não consegue produzir elevada concentração destes ácidos graxos (EPA e DHA), que são importantes na prevenção de uma série de doenças cardiovasculares (Adarme-Vega et al., 2012). Porém, esta condição de cultivo propiciou elevada concentração do ácido graxo essencial linoléico (C18:2  $\omega 6$ ;  $16,9 \text{ \%p/p}$ ), que não é produzido pelo organismo humano e deve ser obtido através da dieta.

A maior concentração de lipídios ( $11,1 \text{ \%p/p}$ ) obtida utilizando-se  $247,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $N-NO_3$  e  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose (Figura 2) não era esperada, uma vez que se esperaria obter maior teor de lipídeos quando a microalga fosse cultivada na menor concentração da fonte de nitrogênio. O resultado apresentado na Figura 3 sugere que a limitação de nitrogênio no meio de cultivo ( $82,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) é compensada pela maior concentração da fonte de carbono (glicose,  $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) no meio, na maior



concentração de biomassa. Além disso, é possível obter a mesma concentração celular quando se utiliza a concentração padrão da fonte de nitrogênio do meio ( $247,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e restringe-se a concentração de glicose ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ).

As microalgas são micro-organismos fotoautotróficos e quando submetidos à condição de estresse (que no cultivo heterotrófico corresponde à ausência de luz e possível restrição de algum nutriente) são estimulados a produzirem maiores concentrações de um metabólito específico. Neste estudo em particular, o estresse celular que propiciou maior produção de lipídeos foi o cultivo realizado na ausência de luz, porém com interação das concentrações de glicose e nitrogênio, não podendo associar apenas à limitação isolada de glicose ou de nitrogênio.

Contudo, é possível verificar que quando passamos a concentração de  $\text{N-NO}_3$  do nível -1 ( $82,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para o nível +1 ( $247,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi observado um efeito positivo de 2,66 % na resposta concentração de lipídeos totais. Já a interação das variáveis de estudo apresentou um efeito negativo de 2,49 % na resposta concentração de lipídeos totais quando o estudo foi realizado com a menor concentração de glicose ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e menor concentração de  $\text{N-NO}_3$  ( $82,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

A interação entre as variáveis estudadas apresentou um efeito negativo de 0,31 % quando o cultivo foi realizado utilizando menor concentração de glicose ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e menor concentração de  $\text{N-NO}_3$  ( $82,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Sendo assim, as concentrações mais baixas das duas variáveis de estudo, conforme delineamento experimental, não favoreceram o crescimento celular tão pouco a produtividade lipídica. Isto ocorreu devido a condição experimental estudada que foi a mais branda em relação a concentração das variáveis de estudo.

## CONCLUSÃO

O cultivo da microalga *Chlorella homosphaera* realizado com  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e  $247,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3$  apresentou maior produção de biomassa e maior produtividade lipídica, com predominância dos ácidos graxos palmítico (C16:0) e linoléico (C18:1n9). A interação entre concentração de glicose e concentração de  $\text{N-NO}_3$  influenciou significativamente a concentração de lipídeos totais e a concentração máxima de biomassa. Esta espécie de *Chlorella* produziu maior concentração de lipídeos e de biomassa quando utilizou-se a menor concentração de glicose ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e a maior concentração de  $\text{N-NO}_3$  ( $247,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Porém, a menor produtividade lipídica foi obtida quando no cultivo manteve-se a menor concentração de glicose ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e reduziu-se em um terço a concentração de  $\text{N-NO}_3$  ( $82,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Sendo assim, a utilização de quantidades menores de glicose nos cultivos é importante pois diminuem as chances de contaminação por micro-organismos indesejados, tem-se menores custos de produção de biomassa e de lipídeos que podem ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais e produção de biodiesel, porém nem sempre é viável.

## Agradecimentos

A CAPES/Rede Nanofotobiotec - Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos e ao CNPq – Rede Nanofotobiotec III, pelo apoio financeiro.

## BIBLIOGRAFIA

- Adarme-Vega, T.C., D.K.Y. Lim, M. Timmins, F. Vernen, Y. Li & P.M. Schenk.** 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories* 11: 1-10.
- Alabyev, A.Ju., N.L. Loseva, L.Kh. Gordon, I.N. Andreyeva, G.G. Rachimova, V. I. Tribunskih A.A. Ponomareva & R.B. Kemp.** 2007. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. *Thermochimica Acta* 458: 65–70.
- Aslan, S. & I.K. Kapdan.** 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28: 64–70.
- Borowitzka, M.A & L.J. Borowitzka (EDS.).** 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge. New York: Cambridge University Press.
- Cataldo, D.A., M. Haroon, L.E. Schrader & Youngs, V.L.** 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 71–80.
- Chen, C.-Y., J.-S. Chang, H.-Y. Chang, T.-Y. Chen, J.-H. Wu, & W.-L. Lee.** 2013. Enhancing microalgal oil/lipid production from *Chlorella sorokiniana* CY1 using deep-sea water supplemented cultivation medium. *Biochemical Engineering Journal* 77: 74– 81.
- Costa, J.A.V., E.M. Radmann, V.S. Cerqueira, G.C. Santos & M. N. Calheiros.** 2006. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição Araraquara* 17: 429-436.
- Folch, J., M. Lees & G.H. Sloane Stanley.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- Heredia-Arroyo, T., W. Wei & B. Hu.** 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 1978–1995.
- Hsieh, C.H. & W.T. Wu.** 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology* 100: 3921-3926.
- Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. Zhang & G. Chen.** 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87: 38-46.
- Isleten-Hosoglu, M., I. Gultepe & M. Elibol.** 2012. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal* 61: 11-19.
- Krienitz, I., C. Bock, P.K. Dadheech & T. Proschold** 2011. Taxonomic reassessment of the genus

*Mychonastes* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) including the description of eight new species. *Phycologia* 50: 89–106.

**Lee, J.-Y., C. Yoo, S.-Y. Jun, C.-Y. Ahn & H.-M. Oh.** 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101: S75–S77.

**Liang, Y., N. Sarkany & Y. Cui.** 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters* 31: 1043–1049.

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

**Martin-Jezequel, V., M. Hildebrand & M.A. Brzezinski.** 2000. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of Phycology* 36: 821–840.

**Metcalf, L.D., A.A. Schmitz & J.R. Pelka.** 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry* 38: 514–515.

**Morais, M.G. & J.A.V. Costa.** 2007. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnological Letters* 29: 1349–1352.

**Nelson, D.L. & M.M. Cox.** 2011. *Principios de Bioquímica de Lehninger*. 5ª ed. Editora Artmed S.A. Porto Alegre. 1273p.

**O'Grady, J. & J.A. Morgan.** 2011. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34: 121–125.

**Perez-Garcia, O., Y. Bashan & M.E. Puente.** 2011. Organic carbon supplementation of municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology* 47: 190–199.

**Richmond, A.** 2004. *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Science.

**Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman & R.Y. Stanier.** 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1–61.

**Shen, Y., W. Yuan, Z. Pei & E. Mao.** 2010. Heterotrophic Culture of *Chlorella protothecoides* in Various Nitrogen Sources for Lipid Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1674–1684.

**Song, M., H. Pei, W. Hua & G. Maa.** 2013. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. *Bioresource Technology* 141: 245–251.

**Wang, Y., T. Chen & S. Qin.** 2012. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. *Biomass and bioenergy* 47: 402–409.

**Wu, Q.Y., S. Yin, G. Sheng & J. Fu.** 1994. New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. *Science in China Series B: Chemistry* 37: 326–335.

**Xu, H., X.L. Miao & Q.Y. Wu.** 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* 126: 499–507.

**Yokochi, T., D. Honda, T. Higashihara & T. Nakahara.** 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacimum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 72–76.