

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

**EFEITOS DO USO DE FLOCULANTES E DA
VARIAÇÃO DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE
OS LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS DAS
MICROALGAS MARINHAS *Nannochloropsis
oculata* E *Thalassiosira weissflogii*.**

LUCÉLIA DO VALLE BORGES

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Oceanografia
Biológica da Universidade Federal
do Rio Grande, como requisito
parcial à obtenção do título de
DOUTOR.

Orientador: Dr. Paulo César Abreu
Co-Orientador: Dr. Marcelo G. Montes D´Oca

RIO GRANDE
Novembro 2011

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus
pais, Edes e Regina, e aos
meus avós, Lucio e Angelina,
alicerces da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo César Abreu, um exemplo de dedicação e modelo de professor a ser seguido, agradeço pela orientação, ensinamentos, confiança, oportunidades, pelos elogios que incentivaram e até pelos “puxões de orelha” que motivaram a melhorar.

Agradeço ao meu co-orientador prof. Dr. Marcelo D’Oca, e aos professores Dr^a. Clarice Odebrecht e Dr. Wilson Wasielesky Jr. por participarem da minha banca de acompanhamento, lendo relatórios, escrevendo pareceres e tudo mais. Agradeço também aos professores Dr. Ricardo Chaloub e Dr. Danilo Giroldo pelas importantes contribuições.

Agradeço à FURG e ao Instituto de Oceanografia, seus servidores e professores.

Obrigada ao Programa de Pós Graduação em Oceanografia Biológica, aos professores e colegas, especialmente a Vera pela ajuda em vários momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Obrigada ao pessoal do Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica e do Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais, pela ajuda com as análises de lipídios e ácidos graxos.

Agradeço à Estação Marinha de Aquacultura pelos vários litros de água salgada.

Ao Laboratório de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos, minha segunda casa durante 9 anos, meu MUITO OBRIGADA! Não importa para onde a maré me levar, sempre vou lembrar com carinho de todas as “cepas” que conheci no Lab Fito. Obrigada Fito-Amigos pelo upwelling de alegrias, pelo bottom-up no humor e pelo top-down no baixo astral. Conhecer vocês foi um essential-loop na minha vida! Obrigada pelos Fito-eventos, fitoninas, e almoços com ciência/política/religião/cinema/gastronomia/etc de todo dia. Obrigada pelas ajudas em qualquer nível e sobre qualquer assunto. Às queridas Fito-Girls, obrigada pelos “blooms” no Cassino, inclusive os noturnos, com muito meio c/2.

Valeu FitoGang!!

Agradeço à minha família, ao Rodrigo e aos meus amigos não-fito pela motivação e apoio. Obrigada a todos vocês!

Prefácio

Esta Tese está sendo apresentada na “formatação alternativa”, conforme o Guia de elaboração de Tese fornecido pelo Programa de Pós Graduação em Oceanografia Biológica. Nesta conformação a Tese pode ser apresentada de acordo com as publicações submetidas e/ou publicadas.

ÍNDICE

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução geral.....	10
Lipídios e ácidos graxos de microalgas.....	13
Biosíntese dos lipídios.....	15
Lipídios de membrana.....	16
Lipídios de reserva.....	17
Ácidos graxos de microalgas.....	18
Antecedentes.....	19
Objetivos.....	22
Objetivo geral.....	22
Objetivos específicos e hipóteses.....	22
Material e métodos (linhas gerais).....	23
Determinação da influencia do uso de flocculante na extração dos lipídios.....	24
Determinação dos efeitos da fase de crescimento, fonte de nitrogênio, intensidade luminosa e temperatura na produção de lipídeos e no perfil dos ácidos graxos.....	25
Extração e quantificação dos lipídios.....	26
Determinação do perfil de ácidos graxos.....	26
Análises estatísticas.....	26
Apresentação dos resultados.....	26
Referências.....	27

Capítulo 1

Efeitos de flocculantes sobre a extração de lipídio e a composição de ácidos graxos das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*.

Síntese dos resultados.....	36
Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae <i>Nannochloropsis oculata</i> and <i>Thalassiosira weissflogii</i>	
Abstract.....	38
Introduction	39
Materials and methods.....	42
Extraction and quantification of lipids.....	43
Determination of the fatty acid profile.....	43
Statistical analysis.....	44
Results.....	44
Discussion.....	45
Conclusions.....	49

References.....	50
-----------------	----

Capítulo 2

Produção de lipídio e ácidos graxos da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* sob condições variadas de luz, temperatura, fonte de nitrogênio e fase de crescimento: importância do crescimento celular e conteúdo de lipídio para atingir máximos rendimentos.

Síntese dos resultados.....	60
Production of lipid and fatty acids of the marine microalgae <i>Nannochloropsis oculata</i> under varying conditions of light, temperature, nitrogen source and growth phase: the importance of growth and cell content to reach maximum yields.	
Abstract.....	62
Introduction.....	63
Material and methods.....	65
Extraction and quantification of lipids.....	67
Determination of the fatty acid profile.....	67
Statistical analysis.....	68
Results and Discussion.....	69
References.....	76

Capítulo 3

Conteúdo e produtividade de lipídios e ácidos graxos de *Thalassiosira weissflogii* (Bacillarioficeae) sob diferentes condições de temperatura, luminosidade, fonte de nitrogênio e fase decrescimento.

Resumo.....	89
Introdução.....	90
Material e métodos.....	93
Extração e quantificação dos lipídios.....	95
Determinação do perfil de ácidos graxos.....	96
Análises estatísticas.....	96
Resultados.....	97
Discussão.....	99
Referências.....	104
Discussão geral.....	117
Perspectivas futuras.....	122
Referências.....	122

RESUMO

Microalgas marinhas são organismos ricos em lipídios e ácidos graxos, de grande interesse devido ao seu potencial biotecnológico. O objetivo desta tese foi determinar possíveis efeitos sinérgicos da intensidade luminosa (40 e 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura (15 e 30°C), fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+) e fase de crescimento (logarítmica e estacionária), sobre o conteúdo e a produtividade de lipídios e ácidos graxos de duas microalgas marinhas *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*. Além disso, foi avaliado, também, como o uso de flocculantes aniônicos e catiônicos podem influenciar a extração de lipídio e o perfil de ácidos graxos produzidos por estas microalgas. Os maiores conteúdos e produtividade dos lipídios para ambas as espécies ocorreram em tratamentos com maior intensidade luminosa (400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e utilizando nitrato como fonte de Nitrogênio. *N. oculata* acumulou mais lipídios na fase estacionária, enquanto que em *T. weissflogii* maiores concentrações de lipídios só ocorreram na fase estacionária de tratamentos com menor temperatura (15° C). As duas espécies apresentaram maior produtividade de lipídios em tratamentos com maior produção de biomassa de microalgas. Entretanto, células de *N. oculata* que cresceram no tratamento com amônio e elevada luminosidade apresentaram grande produtividade de lipídio devido a elevados níveis de concentração deste elemento nas células e não devido ao maior crescimento celular. Portanto uma maior produtividade pode ser obtida empregando estratégias de cultivo que beneficiam, simultaneamente, o crescimento celular e/ou o acúmulo de lipídios nas células. Os ácidos graxos com maior conteúdo em ambas as espécies foram C14:0,

C16:0, C16:1, C18:1 e C20:5. Para as duas espécies, maiores concentrações de ácidos graxos saturados e monoinsaturados foram obtidos em tratamentos com maior temperatura (30° C). Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), especialmente o ácido eicosapentaenóico (C20:5), foi produzido em maior quantidade por *N. oculata* em tratamentos com baixa luminosidade e Nitrato. O uso de flocculantes não alterou a quantidade de lipídios extraídos de ambas as espécies. Entretanto, o flocculante aniônico diminuiu o conteúdo de C20:5 em *N. oculata*, enquanto que em *T. weissflogii*, os flocculantes aniônico e catiônico reduziram os conteúdos de C18:0 e C18:1n9c

Palavras chave: algas; PUFA; biodiesel; polímeros; biomassa.

ABSTRACT

Marine microalgae are rich in lipids and fatty acids. These microorganisms are of great interest, mainly due to their biotechnological potential. The aim of this thesis was to determine possible synergistic effects of light intensity (40 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperature (15 and 30° C), nitrogen source (NO_3^- and NH_4^+), and growth phase (logarithmic and stationary) in the productivity, content of lipids and fatty acids in two marine microalgae: *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. Moreover, it was evaluated if the use of anionic and cationic flocculants can influence the extraction of lipids and fatty acid profiles produced by these species. The higher lipid content and productivity for both microalgae occurred in treatments with higher light intensity (400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and with nitrate as nitrogen source. *N. oculata*

accumulated more lipids in the stationary phase, while higher concentrations of lipid in *T. weissflogii* occurred only in stationary phase from treatment with a lower temperature (15° C). The two microalgae species showed higher lipid yields in treatments with higher biomass production. However, during *N. oculata* cells grown, the treatment with ammonium and high light showed large lipid productivity due to high concentrations of this element in the cells, and not due to increased cell growth. Therefore highest lipid productivity can be achieved using cultivation strategies that benefit both cell growth and accumulation of lipids in cells. The fatty acids with greater content of both species were C14:0, C16:0, C16:1, C18:1 and C20:5. Higher concentrations of saturated and monounsaturated fatty acids were obtained in treatments with higher temperature (30° C) in both species. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially eicosapentaenoic acid (C20:5), was produced in greater amounts by *N. oculata* in treatments with low light and nitrate. The use of flocculants did not alter the amount of lipids extracted from both species. However, the anionic flocculant decreased content of C20:5 in *N. oculata*, while for *T. weissflogii*, the cationic and anionic flocculants reduced content of C18:0 and C18:1n9c.

Key words: Algae; PUFA; biodiesel; polymers; biomass.

INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas compõem um grupo heterogêneo de organismos unicelulares e microscópicos, que apresentam clorofila e outros pigmentos utilizados na fotossíntese (Olaizola 2003). Estes microorganismos têm papel vital na ecologia do planeta, sendo responsáveis por 45% da produtividade global (Field et al. 1998) e são a base da cadeia alimentar aquática. Nos oceanos as microalgas são responsáveis pela absorção de uma grande parte do CO₂ atmosférico (Falkowski e Raven 1997), e seu cultivo pode ser uma alternativa para minimizar o aumento do efeito estufa, seja pela captação do dióxido de carbono atmosférico durante seu crescimento (Borges et al. 2007) ou pela possível produção de biocombustíveis renováveis (Chisti 2007). Além disso, elas podem ser utilizadas na indústria farmacêutica e na indústria alimentar, como fonte suplementar de ácidos graxos, proteínas, carboidratos, pigmentos e vitaminas. Na aquicultura são utilizadas para a manutenção da qualidade da água e como fonte alimentar complementar (Brown 2002). As microalgas são também empregadas há algum tempo no tratamento de efluentes domésticos e industriais (Vílchez et al. 1997; Borowitzka 1995).

A biotecnologia marinha tem como objetivo desenvolver métodos para a produção de produtos originados de microorganismos marinhos, os quais podem contribuir para a saúde humana, para a indústria de alimentos e para a produção de energia (Wijffels 2007). Apesar do grande potencial biotecnológico, existem poucos estudos sobre a utilização das microalgas. Das centenas de milhares de espécies que se acredita existir, somente algumas mil

cepas são mantidas em coleções pelo mundo, e apenas algumas centenas têm sido estudadas pelo seu potencial biotecnológico (Olaizola 2003).

O sucesso biotecnológico das microalgas depende da escolha de espécies com propriedades relevantes e da facilidade de seu cultivo. Atualmente uma das maiores barreiras para os cultivos de grande escala é a necessidade de concentrar a biomassa das algas de forma que possa ser armazenada e transportada (Borowitzka 1997). Algumas formas para concentrar a biomassa de uma cultura de microalgas são a filtração, centrifugação ou sedimentação. A filtração pode ser muito demorada e a centrifugação pode romper as células, dependendo da força gravitacional empregada (Knuckey et al. 2006). A floculação das células e sua sedimentação parece ser o método mais efetivo e de menor possibilidade de danos às células. As microalgas possuem uma carga negativa que impede a agregação das células em suspensão. Com a neutralização dessa carga através do uso de floculantes as células se unem formando flocos pesados que sedimentam rapidamente.

A possibilidade de produzir concentrados de biomassa de algas a baixo custo, sem a alteração de suas características, permitiria uma maior exploração biotecnológica das microalgas. Além disso, segundo Wikfors e Ohno (2001), a pesquisa fundamental básica a respeito da bioquímica, fisiologia e sistemática das microalgas pode revolucionar as aplicações práticas de maneira nunca imaginada pelos pesquisadores.

É sabido que as microalgas podem fornecer diversos tipos de energia renovável, que incluem metano, produzido pela digestão anaeróbica de sua biomassa (Spolaore et al. 2006), biohidrogênio (Dutta et al. 2005) e biodiesel

derivado dos lipídios (Chisti 2007). A produção de biodiesel tem recebido considerável atenção nos últimos anos por ser um combustível biodegradável, renovável e não-tóxico e as microalgas têm sido sugeridas como potenciais produtoras deste combustível, por causa de sua alta eficiência fotossintética, alta produção de biomassa e rápido crescimento, quando comparadas com outros vegetais (Miao e Wu 2006). Algumas espécies de água doce como *Chlorella protothecoides* (Miao e Wu 2006), *Chlorella vulgaris* (Tsukahara e Sawayama 2005) e *Botryococcus braunii* (Sawayama et al. 1999) já vem sendo investigadas para a produção de biodiesel. A grande vantagem das microalgas marinhas é o uso de águas salobra e/ou salgada para o seu cultivo, liberando o uso de água doce para o consumo humano e agricultura. Além disso, podem ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços e em regiões impróprias para atividades agrícolas e utilizar efluentes domésticos e industriais como fonte de nutrientes (N e P).

Para que as microalgas tenham custo competitivo como uma fonte para biocombustíveis, a espécie utilizada precisa apresentar alta eficiência fotossintética e grande rendimento na produção de lipídios (McGinnis et al. 1997). Portanto, antes da fase de escalonamento (aumento na escala de produção) para a produção de biodiesel, é necessária a caracterização do conteúdo de lipídios e ácidos graxos das espécies para a identificação de cepas com alto rendimento, além da determinação das condições ideais de cultivo que permitam a maior produção de ácidos graxos.

Os lipídios nas microalgas, além de serem componentes estruturais, exercem funções como produtos de reserva (Lourenço 2006). Estes lipídios são incorporados aos animais marinhos através da dieta e aos humanos

através do consumo de frutos do mar (Mansour et al. 2005). Além disso, os lipídios podem ter diferentes aplicações biotecnológicas.

Em média o conteúdo de lipídios nas microalgas pode variar entre 1 e 70%, podendo alcançar 90% de seu peso seco (Metting 1996). O teor de lipídios das microalgas pode ser alterado, dependendo do estado fisiológico das algas, de sua fase de crescimento e das condições do meio, como temperatura, salinidade e nutrientes. Segundo Thompson Jr. (1996) uma deficiência de nutrientes causa um contínuo decréscimo nas taxas de crescimento. Porém, sob estas circunstâncias, muitas espécies de microalgas continuam sintetizando ácidos graxos ativamente. Na falta da usual utilização dessas substâncias, isto é, construção de novas membranas, as células convertem os ácidos graxos em triglicerídeos. O conteúdo dos ácidos graxos das microalgas e a transformação deste em triglicerídeos dependem não somente das espécies, mas também das condições do meio, incluindo a sua composição, aeração, intensidade luminosa, temperatura e idade da cultura (Dunstan et al. 1993).

Lipídios e ácidos graxos de microalgas

O termo “lipídio” é usado para classificar quimicamente um grupo diverso de elementos compostos por carbono, hidrogênio e oxigênio, cuja única característica física em comum é a insolubilidade em água (Lehninger et al. 2005). Os lipídios desempenham diferentes funções podendo ser classificados em lipídios de reserva (apolares) e lipídios de membrana (polares) (Gushina e Harwood 2009). Outros lipídios, embora em pequenas quantidades, possuem papel ativo no metabolismo e tem funções como co-fatores enzimáticos,

transportadores de elétrons, pigmentos, âncoras hidrofóbicas para proteínas, hormônios e mensageiros intracelulares (Lehninger et al. 2005).

A grande maioria dos lipídios possui, pelo menos, uma cadeia de ácido graxo na sua molécula. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos que variam de 4 a 36 carbonos, podem ser saturados (sem dupla ligação) ou insaturados. A nomenclatura é simples e especifica o número de átomos de carbono da cadeia e o número de ligações separados por “:”. A posição das ligações duplas é especificada por números sobrescritos apostos a letra grega maiúscula delta (Δ). Assim um ácido graxo com 20 carbonos, 2 ligações duplas, uma entre o carbono 9 e o 10 e outra entre o 12 e o 13 será C20:2 (Δ 9,12). Os átomos de carbono são numerados do carbono da carboxila (C1), os átomos de carbono adjacentes (2, 3, 4) são também conhecidos como α , β , e γ , respectivamente, e o carbono terminal é conhecido como ω (Gurr et al. 2002) (Fig. 1).

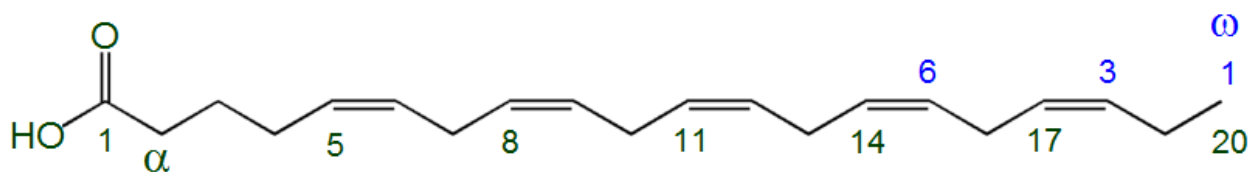


Figura 1. Cadeia do ácido graxo eicosapentaenóico - EPA (C20:5w3).

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ácido_eicosapentaenoico.

Biosíntese dos lipídios

As rotas respiratórias são fundamentais para a produção de uma grande variedade de metabólitos, incluindo os lipídios. Durante o processo respiratório são produzidos precursores essenciais para a biosíntese de diversos compostos, e muitos intermediários são ponto de partida para outras rotas. Os compostos orgânicos são oxidados na respiração onde a energia é liberada ou armazenada na forma de ATP. As plantas usam a luz do sol como fonte primária de energia para produzir carboidratos e, a partir dos produtos de degradação destes, são capazes de sintetizar os ácidos graxos para a formação dos lipídios (Gurr et al. 2002).

A biosíntese dos lipídios começa com a síntese “*de novo*” dos ácidos graxos, que nas plantas ocorre no estroma dos cloroplastos, com ativação da enzima Acetil-CoA Carboxilase (ACC). Nos vegetais a ACC é ativada pelo aumento do pH e da concentração de Mg^{2+} no estroma, e ambos ocorrem quando a planta é iluminada. A ACC catalisa a formação de Malonil-CoA a partir de Acetil-CoA e CO_2 , essa é considerada a primeira etapa da rota (Schmid e Ohlrogge 2008; Gushina e Harwood 2009). A rota metabólica continua em ciclos, com reações de condensação e redução, ao final de cada ciclo dois carbonos são adicionados à molécula. A síntese do ácido graxo termina com a produção de um C16:0 ou C18:0. Para produzir um ácido graxo insaturado, ligações duplas são introduzidas por enzimas dessaturases e para aumentar a cadeia são necessárias enzimas elongases (Hu et al. 2008).

Lipídios de membrana

As moléculas de lipídio nas membranas são anfipáticas, ou seja, uma das extremidades é hidrofóbica e a outra hidrofílica. As interações hidrofóbicas entre si e as hidrofílicas com água configuram a forma de bicamada das membranas, que age como uma barreira impedindo a passagem de moléculas polares e ions (Lehninger et al. 2005).

Entre os lipídeos de membrana os glicerolipídios são o grupo mais importante, sendo divididos em dois grupos principais: fosfolipídeos e glicolipídeos (Gurr et al. 2002). Os glicerofosfolipídios (fosfolipídeo) e os galactolipídeos (glicolipídeos) são as principais classes de lipídios encontradas nas membranas das algas (Guschina e Harwood 2009).

Os glicerofosfolipídios são formados por dois ácidos graxos ligados em ligação éster ao primeiro e segundo carbonos do glicerol, e um grupo altamente polar é anexado através de uma ligação fosfodiéster ao terceiro carbono.

Nos galactolipídeos, além dos dois ácidos graxos, uma ou duas galactoses unem-se por uma ligação glicosídica ao glicerol. Galactolipídeos estão localizadas nos tilacóides dos cloroplastos e provavelmente são os lipídeos de membrana mais abundantes na biosfera (Lehninger et al. 2005) (Fig. 2).

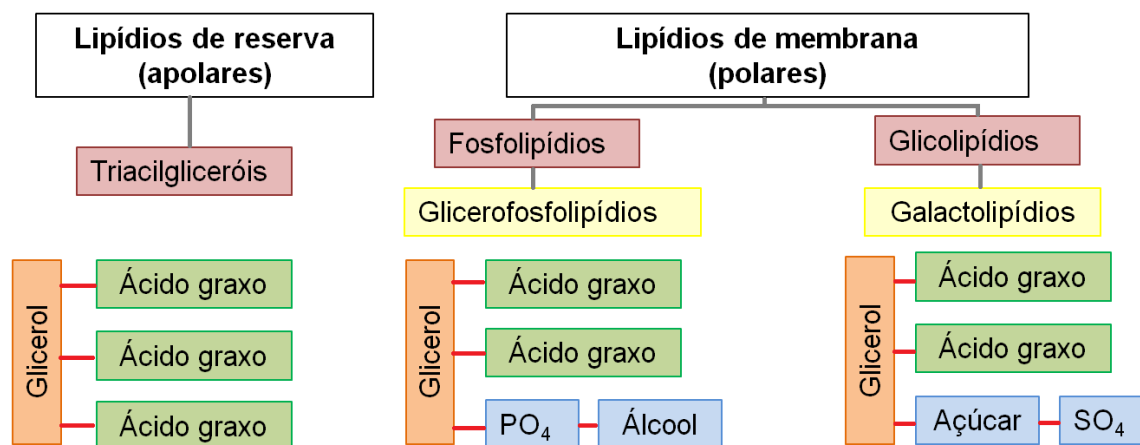


Figura 2. Classificação e configuração dos principais lipídios encontrados nas microalgas. Adaptado de Lehninger et al. (2005).

Lipídios de reserva

Os lipídios de reserva usados como forma de energia são os triacilgliceróis (TAGs), os quais são os lipídios mais simples formados por ácidos graxos. Nos TAGs uma ligação éster (ligação química entre um ácido e um álcool) une três moléculas de ácidos graxos a uma molécula de glicerol. As hidroxilas polares do glicerol e os carboxilatos polares dos ácidos graxos estão ligados em ligações éster, tornando os TAGs moléculas apolares, hidrofóbicas e essencialmente insolúveis em água (Lehninger et al. 2005).

Na maioria das células eucarióticas os TAGs formam no citosol aquoso gotículas de óleo que funcionam como depósitos de combustível metabólico (Lehninger et al. 2005). Uma das vantagens no uso de TAGs como fonte de energia, em vez de glicogênio ou amido, está na oxidação, que libera mais que o dobro de energia que os açúcares. Além disso, como são hidrofóbicos, o organismo não precisa carregar um peso extra de água, geralmente associado a hidratação dos polissacarídeos.

Ácidos graxos das microalgas

As microalgas marinhas apresentam os seus lipídios bioencapsulados pela parede celular (Patil et al. 2007), entre eles de especial interesse estão os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), incluindo os ômega-3, eicosapentaenóico (EPA - C20:5) e docosahexaenóico (DHA – C22:6), e os ômega-6 linoléico (C18:2) e aracdônico (AA – C20:4) (Vargas et al. 1998). Estes ácidos graxos são derivados dos ácidos graxos essenciais os quais são sintetizados pelos vegetais, mas não pelos animais (Sayanova e Napier 2004). Diferentemente das microalgas, plantas superiores não sintetizam PUFAs de cadeia muito longas como AA, EPA, e DHA (Harwood e Guschina 2009). As microalgas contem todas as desaturases encontradas nas plantas superiores além de diversas desaturases adicionais que podem produzir esses PUFAs de cadeia longa (Alonso e Maroto 2000), sendo as maiores produtoras de EPA e DHA (Patil et al. 2007).

PUFAs de cadeia longa podem ser metabolizados como moléculas sinalizadoras, tais como eicosanóides, vitais para o desenvolvimento cerebral e benéfico para a redução do risco de doença cardiovascular, além de uma série de outras condições de saúde para o ser humano e animais. Essas moléculas são utilizadas nas indústrias farmacêuticas e alimentar, para a produção de suplementos alimentares, alimentos para animais, aditivos e fármacos (Dyer et al. 2008)

Essa alta produção de lipídios pelas microalgas vem estimulando os pesquisadores a aumentarem os esforços na busca por cepas com capacidade de acumular maiores teores de lipídios e na investigação das condições em que essa produção possa ser melhorada.

Antecedentes

Atualmente existem informações divergentes na literatura sobre a influência de fatores como a temperatura, a fonte de nitrogênio oferecida (nitrato, nitrito ou uréia) e mesmo a fase de crescimento dos cultivos na produção de ácidos graxos pelas microalgas (Lourenço, 2006). Segundo Zhukova e Aizdaicher (1995), existe uma extensiva informação sobre os lipídios e ácidos graxos de microalgas, entretanto os dados são freqüentemente contraditórios. Parte das discrepâncias observadas na composição de ácidos graxos das microalgas em cultivo deve-se à incerteza da classificação taxonômica das espécies e da comparação entre cepas crescendo sob diferentes condições de cultivo.

Em estudos previamente realizados no Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG, Borges et al. (2007) observaram que as cepas de *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii* mantidas no banco de cultivo, mostraram altos níveis de produtividade primária (variando de 17 a 165 Ton C ha⁻¹ ano⁻¹). Estas microalgas foram então, selecionadas para estudos onde se pretende determinar a importância de fatores como luz, temperatura e nutrientes para o seu cultivo em grande escala, bem como determinar a influência destas variáveis em seus perfis de lipídios e ácidos graxos.

Nannochloropsis oculata é uma eustigmatofícea marinha, importante produtora de EPA (Sukénik et al. 1993). A composição de lipídios de *N. oculata* foi estudada em cultivos (Zhukova e Aizdaicher 1995), em diferentes irradiâncias e em culturas semi-contínuas (Fábregas et al. 2004), em diferentes concentrações (Suen et al. 1987) e fontes de nitrogênio (Lourenço et al. 2002).

Esta espécie também foi avaliada para produção de EPA em fotobiorreatores (Zittelli et al. 1999), conteúdo de EPA em diferentes níveis de luz (Sukenik et al. 1989, Sukenik e Carmeli 1990) e quanto a sua resposta a elevadas concentrações de CO₂ (Hoshida et al. 2005, Hu e Gao 2003, Hu e Gao 2006). Além disso, foi determinada a sua produção de EPA e DHA em cultivos heterotróficos (Vazhappilly e Chen 1998) e a separação de PUFA de cadeia longa em seus triglicerídios (Tonon et al. 2002).

Para melhorar a produção de EPA em *Nannochloropsis* sp. diversas condições de crescimento têm sido investigadas (Hoshida et al. 2005). Geralmente as condições de cultivo que aumentam a densidade celular (condições ótimas para o crescimento) diminuem a produção de ácidos graxos (Sukenik et al. 1989, Sukenik, 1991, Fábregas et al. 2004).

A diatomácea *Thalassiosira weissflogii* (*T. fluviatilis*), é uma espécie eurialina (Radchenko e Il'yash 2006) que apresenta altas taxas de fixação de carbono, assim como uma ótima eficiência fotossintética (Borges et al. 2007). Tem sido usada em estudos fisiológicos sobre fotossíntese (Parker et al. 2004; Halac et al. 2010; Antal et al. 2011) por ser amplamente distribuída e frequentemente contribuir para os blooms de primavera do fitoplâncton (Sheng et al. 2011).

T. weissflogii é usada na aquicultura como fonte de alimento para larvas de camarões peneídeos (Jensen et al. 2006; Silva et al. 2009; Kiatmetha et al. 2010), e seu conteúdo lipídico vem sendo analisado, principalmente como fonte de ácidos graxos para copépodes (Cowie e Hedges 1996; Støttrup et al. 1999; Breteler et al. 2005). Araujo et al. (2011) analisaram seu potencial para produção de óleo e biomassa em diferentes salinidades. Ishida et al. (2000)

determinaram a composição de ácidos graxos de *T. weissflogii* em cultivos com adição de CO₂ e Derner (2006) com diferentes fontes de carbono. Segundo Pulz e Gross (2004) devido à alta produtividade e acumulação de óleos, as diatomáceas representam uma possível fonte futura para combustíveis e ácidos graxos não usuais e as suas altas concentrações de EPA são de especial interesse biotecnológico.

Como visto, estudos para determinação da produção de lipídios e do perfil de ácidos graxos destas espécies vêm sendo realizados, porém os experimentos são desenvolvidos com a variação de somente um fator por vez, intensidade luminosa, temperatura, ou fontes de nitrogênio, não se tendo informação sobre o conteúdo total de lipídios e a sua composição de ácidos graxos considerando-se simultaneamente a interação de diferentes fatores abióticos. A quantidade final de lipídios obtida em um cultivo de microalgas pode variar enormemente, portanto, é necessário analisar a interação entre as variações destes fatores no resultado final. Estas informações permitirão uma melhor avaliação do potencial destas espécies para a produção de biodiesel.

Além do sinergismo entre as variáveis ambientais, outra possível interferência no perfil bioquímico das espécies é a escolha do processo de colheita da biomassa. Assim, uma vez que o objetivo é o aproveitamento dos lipídios e ácidos graxos, é preciso garantir a integridade desses compostos usando uma forma de colheita que não cause impacto no produto final. Processos de centrifugação e filtração podem danificar fisicamente as algas. Entretanto, não existe na literatura qualquer informação sobre o possível efeito de floclantes na extração de lipídeos e no perfil de ácidos graxos. Portanto, apesar da floclação ser uma forma de baratear os custos de produção de

bicombustíveis de microalgas (Grima et al. 2003) é preciso conhecer de maneira mais aprofundada os possíveis efeitos dessas substâncias na produção de lipídios e ácidos graxos desses organismos.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a combinação de fatores que propiciam a maior produção de lipídios e afetam o perfil de ácidos graxos de *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*, para cultivo destas microalgas em maior escala com vistas à produção de biocombustíveis e de ácidos graxos insaturados de alto valor.

Objetivos específicos e hipóteses:

1. Determinar se o uso de flocculantes na colheita da biomassa de *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii* pode interferir no processo de extração dos lipídios totais e no perfil dos ácidos graxos.
- ✓ Hipótese: A adição de flocculantes interfere na extração de lipídios das microalgas.

2. Determinar o efeito simultâneo da fase de crescimento, intensidade luminosa, temperatura e fontes de nitrogênio no teor de lipídios totais e no perfil de ácidos graxos produzidos por *N. oculata*.

✓ Hipótese: A espécie apresentará uma grande variação na quantidade de lipídios e no nível de saturação dos ácidos graxos.

3. Determinar o efeito simultâneo da fase de crescimento, intensidade luminosa, temperatura e fontes de nitrogênio no teor de lipídios totais e no perfil de ácidos graxos de *T. weissflogii*.

✓ Hipótese: A espécie apresentará uma grande variação na quantidade de lipídios e no nível de saturação dos ácidos graxos.

MATERIAL E MÉTODOS (Linhas Gerais)

O detalhamento dos materiais e métodos está descrito nos capítulos 1, 2 e 3 desta Tese.

As cepas de *Nannochloropsis oculata* (NANN OCUL) e *Thalassiosira weissflogii* (THAL WEIS) analisadas fazem parte do banco de cultivo do Laboratório de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG e são mantidas em meio f/2 (Guillard 1975), salinidade 28, temperatura 20 °C, intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo 12:12 horas (claro/escuro).

Determinação da influência do uso de floculante na extração dos lipídios.

Cultivos em batelada (três repetições) de *N. oculata* e *T. weissflogii* foram montados nas mesmas condições em que as cepas são mantidas na coleção, aeração constante foi introduzida após atingirem o volume de 1 litro.

Em 21 dias de aclimação as culturas atingiram um volume total de 6 litros e após 15 dias cada cultura foi dividida em 2 litros. Foram montados os seguintes tratamentos: 1) sem floculante (controle); 2) Magnafloc[®] LT-25 – poliacrilamida aniônico (FPA) (10 mL/L) e 3) Flopam[®] - um poliacrilamida catiônico (FPC) (10mL/L).

Antes da adição dos floculantes, alguns mL de uma solução NaOH 0.6N foi adicionada até atingir pH 10. As culturas foram agitadas por 2 minutos, quando um precipitado branco apareceu. Nos tratamentos com floculantes, a agitação foi diminuída e foram adicionados os floculantes em diferentes concentrações de diferentes (0.05% catiônico e 0.5% aniônico). A mistura foi cessada e as culturas foram mantidas em repouso durante aproximadamente por 1 hora, até que a biomassa sedimentasse. Após o sobrenadante foi removido e as células foram concentradas em um filtro de celulose. As biomassas foram levadas a uma estufa e mantidas em 60°C por 24hs para secagem. Depois de secas foram mantidas no escuro e em refrigerador até a extração dos lipídios.

Determinação dos efeitos da fase de crescimento, fonte de nitrogênio, intensidade luminosa e temperatura na produção de lipídeos e no perfil dos ácidos graxos:

Os tratamentos foram determinados pelas interações entre condições de intensidade luminosa (40 e 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperatura (15 e 30°C), fonte de nitrog\u00e9nio (nitrato e am\u00f4nia) e fase de cultivo (logar\u00edtmica e estacion\u00e1ria). A concentra\u00e7\u00e3o final de Nitrog\u00e9nio nos meios foi $8.8 \times 10^{-4} \text{ M}$, com a adi\u00e7\u00e3o dos sais NaNO_3 e NH_4Cl . Condi\u00e7\u00f5es de luz e temperatura foram mantidas em c\u00e2mara de germina\u00e7\u00e3o (347-CDG Fanem).

Para tais experimentos o volume das culturas foi aumentado de 250mL, at\u00e9 a obten\u00e7\u00e3o de 5 litros para cada repeti\u00e7\u00e3o (2) de cada tratamento, o que ocorreu ap\u00f3s aproximadamente 21 dias. Ap\u00f3s a aclima\u00e7\u00e3o foi iniciado o acompanhamento da curva de crescimento atrav\u00e9s da fluoresc\u00eancia *in vivo* da clorofila, a qual foi extrapolada para $\mu\text{g L}^{-1}$ atrav\u00e9s da equa\u00e7\u00e3o da reta ($y = 1,8304x - 49.699$) ($R^2 = 0,99$) para *N. oculata* e ($y = 7,2365x - 164,92$) ($R^2 = 0,99$) para *T. weissflogii*. Essas equa\u00e7\u00f5es foram determinadas, previamente, atrav\u00e9s da correla\u00e7\u00e3o entre as duas medidas.

Ap\u00f3s, esses resultados foram convertidos a peso seco baseados em Reynolds (2006) que estima que aproximadamente 1% do peso seco em microalgas corresponde ao pigmento clorofila. Assim que os cultivos alcan\u00e7avam a fase logar\u00edtmica, cerca de 2,5L eram coletados e floculados. Os 2,5L restantes eram mantidos na c\u00e2mara germinadora at\u00e9 alcan\u00e7arem a fase estacion\u00e1ria, quando ent\u00e3o eram floculados. As biomassas foram floculadas e preparadas como no experimento anterior.

Extração e quantificação dos lipídios.

Lipídios foram extraídos usando o método líquido-líquido adaptado de Bligh e Dyer (1959) (D'Oca et al. 2011).

Determinação do perfil de ácidos graxos:

As frações lipídicas dos tratamentos foram esterificadas de acordo com Metcalfe e Schmidt (1961). O perfil dos ácidos graxos foi caracterizado por cromatografia gasosa (GC) com detecção por espectrômetro de massas (MS). Os metil ésters dos ácidos graxos foram identificados pela comparação com padrões conhecidos e quantificados pelo método de padronização das áreas.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) comparando os tratamentos com nível de significâncias de $\alpha = 0.05$. O teste de múltiplas comparações post-hoc Tukey ($\alpha = 0.95\%$) foi aplicado para determinação das diferentes biomassas, lipídios e ácidos graxos (Zar, 1996).

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados desta Tese estão apresentados nos três capítulos seguintes. No primeiro capítulo, o trabalho intitulado “Efeitos de flocculantes na extração de lipídios e composição de ácidos graxos das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*” trata do Objetivo Específico número 1. Este estudo foi publicado na Revista Biomass and Bioenergy 35 (10) 4449 – 4454, com o título “Effects of flocculants on the lipid

extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*".

O Capítulo 2, "Produção de lipídio e ácidos graxos da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* sob condições variadas de luz, temperatura, fonte de nitrogênio e fase de crescimento: Importância do crescimento celular e conteúdo de lipídio para atingir máximos rendimentos" refere-se ao objetivo específico número 2. Este trabalho foi submetido a Revista Bioresource Technology com o título Production of lipid and fatty acids of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* under varying conditions of light, temperature, nitrogen source and growth phase: The importance of growth and cell content to reach maximum yields" e encontra-se em fase de revisão.

Os resultados do estudo referente ao objetivo específico 3 são apresentados no Capítulo 3, intitulado "Conteúdo e produtividade de lipídios e ácidos graxos de *Thalassiosira weissflogii* (Bacilarioficea), sob diferentes condições de temperatura, luminosidade, fonte de Nitrogênio e fase de crescimento"

REFERÊNCIAS

- Alonso, D.L., Maroto, F.G. 2000. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. Biotechnol Adv 18: 481-97.
- Antal, T.K., Osipov, V., Matorin, D.N., Rubin, A.B. 2011. Membrane potential is involved in regulation of photosynthetic reactions in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. J Photoch Photobio B 102 169-73.
- Araujo G.S., Matos L.J.B.L., Gonçalves L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L. 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation

of oil and biomass production for ten microalgal strains. Bioresource technol 102 (8) 5248-50.

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

Borges L., Faria, B.M., Odebrecht, C., Abreu, P.C. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de desenvolvimento limpo”. Atlântica 29: 35-46.

Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J Appl Phycol 7(1), 3-15.

Borowitzka, M.A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. J Appl Phycol 393-401.

Breteler, W.C.M.K., Schogt, N., Rampen, S. 2005. Effect of diatom nutrient limitation on copepod development : role of essential lipids. Marine Ecology Progress Series 291: 125-33.

Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002., Cancún, Quintana Roo, México.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biomass 25, 294-306.

Cowie, G.L., Hedges J.I. 1996. Digestion and alteration of the biochemical constituents of a diatom (*Thalassiosira weissflogii*) ingested by an herbivorous zooplankton (*Calanus paczfkxs*). Limnol. Ocenogr. 41:(4) 581:94.

- D'Oca, M.G.M., Viêgas, C.V., Lemões, J.S., Miyasaki, E.K., Morón-Villarreyes, J.A; Primel, E.G.; Abreu, P.C. 2011. Production of FAMES from Several Microalgal Lipidic Extracts and Direct Transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. Biomass Bioenerg. 35:1533-38
- Derner, R.B. 2006. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Florianópolis, 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Barritt S.M., Leroi J.M., Jeffrey S.V. 1993. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatoms (Bacillariophyceae). Phytochemistry 35 (1):155–61.
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri S., Bhattacharya, S.K. 2005. Hydrogen production by Cyanobacteria. Microb Cell Fact 4 (36) 1-11.
- Dyer, J., Stymne S., Green A.G., Carlsson, A.S. 2008. High-value oils from plants. The Plant journal: for cell and molecular biology 54 (4) 640-55.
- Fábregas J., Maseda, A., Dominguez, A., Otero, A. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semi-continuous culture. World J Microb Biot 20(1): 31-5.
- Falkowski, P. G., Raven J.A. 1997. Aquatic Photosynthesis, Blackwell Science. 374p.
- Field, C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P., 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. Science 281: 237-40.

- Grima, E.M., Belarbi, E.H., Fernández, F.G.A., Medina, R.A., Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv* 20: 491-515.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp. 26-60.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N. 2002. *Lipid Biochemistry: an introduction*. 5th ed. Blackwell Science, Oxford.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2009. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry in: Arts, M.T., Brett, M.T. and Kainz, M.J. (eds) *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer New York. p. 1-24.
- Halac, S.R., Villafañe, V.E., Helbling, E.W. 2010. Temperature benefits the photosynthetic performance of the diatoms *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira weissflogii* when exposed to UVR. *J Photoch Photobio B* 101: 196-205.
- Harwood, J.L., Guschina, I.A. 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91: 679-84.
- Hoshida, H., Ohira, T., Minematsu, A., Akada, R., Nishizawa, Y. 2005. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. *J Appl Phycol* 17(1), 29-34.
- Hu, H., Gao, K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnol Lett* 25(5), 421-25.

- Hu, H., Gao K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol Lett* 28(13), 987-92.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54(4), 621-39.
- Ishida, Y., Hiragushi, N., Kitaguchi, H., Mitsutani, A., Nagai, S., Yoshimura, M. A 2000. Highly CO₂-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. *Fisheries Sci* 66: 655-59.
- Jensen, L.V., Wasielesky, W.J., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Santos, M.S. 2006. Role of microalgae *Thalassiosira fluviatilis* in weight gain and survival of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* reared in indoor nursery tanks. *Nauplius* 14 (1) 37-42.
- Kiatmetha, P., Siangdang, W., Bunnag, B., Senapin, S., B., Withyachumnarnkul 2010. Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Aquacult Int* 19 599-609.
- Knuckey, R.M., Brown M.R., Robert R., Frampton D.M.F., 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacult Eng* 35(3): 300-13.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2005. *Lehninger: Principles of Biochemistry* 4th ed. Freeman and Company New York 1.119p.
- Lourenço, S.O. 2006. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. RiMa, São Carlos. 588P.

- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K.P., Aida E. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41 (2) 158-68.
- Mansour, M.P., Frampton, D.M.F., Nichols, P.D., Volkman, J.K., Blackburn, S.I., 2005. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C₂₄-C₂₈ polyunsaturated fatty acids. *J Appl Phycol* 17(4): 287-300.
- McGinnis, K.M., Dempster, T.A., Sommerfeld M.R. 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *J Appl Phycol* 9: 19-24.
- Metcalf, L., Schmitz, A. 1961. The Rapid Preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 33(3), 363.
- Metting, F.B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J Ind Microbiol Biot* 17(5-6): 477-89.
- Miao, X.L., Wu, Q.Y. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technol* 97(6): 841-46.
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng* 20: 459-66.
- Patil, V., Källqvist, T. Olsen, E. Vogt, G. Gislerod, H.R. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult Int* 15: 1-9.
- Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 635-48.
- Radchenko, I.G., Il'yash, L.V. 2006. Growth and photosynthetic activity of

- diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. *Biology Bulletin* 33 (3): 3 242-47.
- Reynolds, C. 2006. *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge. 535p.
- Sawayama, S., Minowa, T., Yokoyama, S.Y. 1999. Possibility of renewable energy production and CO₂ mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae. *Biomass Bioenerg* 17(1): 33-9.
- Sayanova, O.V., Napier, J.A. 2004. Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry* 65 147 - 58.
- Schmid, K.M., Ohlrogge, J.B. 2008. Lipid metabolism in plants, in: Vance, D. E., Vance. J. E. (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier. Amsterdam, pp. 97-130.
- Sheng, L., Zhiling, G., Tao, L., Huang, H., Senjie, L. 2011. Photosynthetic efficiency, cell volume, and elemental stoichiometric ratios in *Thalassiosira weissflogii* under phosphorus limitation. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 29 (5) 1048-56.
- Silva, B.C., Andre, R.C., Belettini, F., Buglione, C.C., Jatobá, A., Vieira, F.N., Andreatta, E.R, Derner, R.B. 2009. Utilização de *Thalassiosira weissflogii* em larvicultura de *Litopenaeus vannamei*. *Atlântica* 31(1) 39-50.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101 (2) 87-96.
- Støttrup, J.G., Bell J.G., Sargent J.R. 1999. The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid

- copepod, *Acartia tonsa* Dana, in response to different algal diets. *Aquaculture* 176: 257-69.
- Suen, Y., Hubbard, J.S., Holzer G., Tornabene, T.G. 1987. Total Lipid Production of the green-alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes. *J Phycol* 23(2), 289-96.
- Sukenik, A. 1991. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technol* 35(3), 263-69
- Sukenik, A., Carmeli, Y., Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J Phycol* 25(4), 686-92.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. 1990. Lipid-synthesis and fatty-acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *J Phycol* 26(3): 463-69.
- Sukenik A., Zmora, O., Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. 2. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117(3-4), 313-26.
- Thompson Jr., G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta* 1302: 17-45.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15-24.
- Tsukahara, K., Sawayama, S. 2005. Liquid fuel production using microalgae. *J Jpn Petrol Inst* 48(5): 251-59.

- Vargas, M.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J Phycol* 34(5), 812-817.
- Vazhappilly, R., Chen, F. 1998. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *J Am Oil Chem Soc* 75(3): 393-97.
- Vilchez, C., Lobato, M.V. 1997. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb Tech* 20, 562-72.
- Wijffels, R. 2007. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol* 26(1): 26-31.
- Wikfors, G.H., Ohno, M. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J. Phycol* 37: 968-74.
- Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhukova, N.V., Aizdaicher, N.A. 1995. Fatty-acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39(2), 351-56.
- Zitelli, G.C., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., Tredici, M.R., 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J Biotech* 70, 299-312.

CAPITULO 1

EFEITOS DE FLOCULANTES SOBRE A EXTRAÇÃO DE LIPÍDIO E A COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* E *Thalassiosira weissflogii*.

Lucelia Borges, Joaquin A. Morón-Villarreyes, Marcelo M. D'Oca and Paulo Cesar Abreu.

Síntese dos resultados

O objetivo deste estudo foi investigar a possível interferência de floculantes aniônicos e catiônicos na extração de lipídios e perfil de ácidos graxos de duas espécies de microalgas marinhas: *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*. As células foram cultivadas em culturas batelada com meio f/2, salinidade de 28, temperatura de 20 ° C, intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro). As células foram concentradas utilizando hidróxido de sódio (controle), hidróxido de sódio e floculante poliacrilamida aniônico Magnafloc ® LT-25 (tratamento APF) e hidróxido de sódio, mais o floculante poliacrilamida catiônico Flopam ® (tratamento CPF). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos com relação à extração de lipídios para ambas as espécies. No entanto, *N. oculata* que apresentou maiores percentuais dos ácidos graxos C16:0, C16:1 e C20:5, mostrou um aumento de C14:0 e uma diminuição de C20:5 com o uso de floculante aniônico. A espécie *T. weissflogii*, que teve altos percentuais de

C16:0, C16:1, C16:3 e C20:5, mostrou um decréscimo de C18:0 e C18:1n9c quando ambos os floclantes foram usados e uma pequena diminuição de C16:0 no tratamento APF. Os resultados indicam que a escolha do floclante deve ser baseada no nível de saturação do desejável, ou seja, se o objetivo é produzir biodiesel mais estável, com baixa porcentagem de ácidos graxos insaturados, então, floclantes aniônicos devem ser usados. Por outro lado, se o objetivo é produzir ácidos graxos insaturados para usos comerciais nas indústrias de farmácia ou de alimentos, então polímeros aniônicos devem ser evitados.

Trabalho publicado em: Biomass and Bioenergy 35 (10) 4449 – 4454.

Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*.

Lucelia Borges^{a,*}, Joaquin A. Morón-Villarreyes^b, Marcelo G. Montes D'Oca^b and Paulo Cesar Abreu^c.

^a Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brazil.

^b Escola de Química e Alimentos, Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brazil.

^c Instituto de Oceanografia, Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 5332336509; Fax: +55 5332336601.

Av. Itália Km Campus Carreiros. P.O. Box 474 - Rio Grande/RS – Brazil. Zip Code: 96201-900. E-mail: addresses: lu.fito@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the possible interference of anionic and cationic flocculants in the lipid extraction and fatty acid profiles of two species of marine microalgae: *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. Cells were grown in batch cultures (f/2 medium, salinity of 28, temperature of 20 °C, light intensity of 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 12/12 h L/D photoperiod) and concentrated using sodium hydroxide (control), sodium hydroxide and the anionic polyacrylamide flocculant Magnafloc[®] LT-25 (APF treatment) and

sodium hydroxide plus the cationic polyacrylamide flocculant Flopam® (CPF treatment). There were no statistically significant differences among treatments with respect to lipid extraction for both species. However, *N. oculata* which presented higher percentages of C16:0, C16:1 and C20:5 fatty acids showed an increase of C14:0 and a decrease of C20:5 with the use of anionic flocculant. Additionally, *T. weissflogii* which had high percentages of C16:0, C16:1, C16:3 and C20:5, showed a decrease of C18:0 and C18:1n9c when both flocculants were used and a small decrease of C16:0 in the APF treatment. The results indicate that the choice of flocculant should be based on the level of saturation desirable, i.e., if the goal is to produce more stable biodiesel, with low percentage unsaturated fatty acids, then anionic flocculants should be used. On the other hand, if the aim is to produce unsaturated fatty acids for commercial uses in the pharmacy or food industries, then anionic polymers should be avoided.

Keywords: microalgae, lipids, fatty acids, flocculants, biodiesel.

INTRODUCTION

The interest in the use of microalgae in biotechnology is largely due to their rapid growth and wide tolerance to environmental extremes. Furthermore, these microorganisms can be grown in brackish and marine waters, leaving the fresh water for other more noble uses such as human consumption and agriculture. Similarly, high yields of microalgae can be produced in small spaces and in areas unsuitable for agricultural activities. In aquaculture systems, microalgae are used to maintain water quality and as additional food source [1]

and they are also employed in the treatment of domestic and industrial effluents [2] [3].

Microalgae are efficient in converting solar energy into metabolites, such as lipids, proteins, carbohydrates, pigments and vitamins. Moreover, these microorganisms can provide various types of renewable energy sources, such as methane [4], biohydrogen [5] and biodiesel [6]. The potential of microalgae for biodiesel production is related to their high productivity rather than to their ability to produce significant amounts of oil.

However, one of the bottlenecks of microalgae biodiesel production is the need to concentrate the produced biomass for transport, storage and lipid extraction [7]. Therefore, microalgae harvesting is an important research area in order to develop an appropriate and economical process for each algal species so that the production of this biofuel is competitive [8]. The choice of the concentration method employed depends on the size of the microalgae species, the cell density, the culture medium, the type of final product and the cost-benefit relationship of its production.

Currently, the methods used to concentrate microalgae, such as filtration and centrifugation, are high-energy consumption processes, which significantly increases the final prices of microalgae biofuels. Moreover, filtration can be very time consuming and centrifugation may break cells, depending on the gravitational forces employed [9]. Thus, collecting large amounts of cells by flocculation seems to be a better method because flocculation allows the processing of large cultures at lower costs [10]. To date, most studies of microalgae flocculation have been conducted using freshwater species [11].

Microalgae have negative charges that prevent aggregation, keeping the

cells in suspension. Flocculants act on the cell surface, neutralizing the wall charges, resulting in the aggregation and sinking of algae cells. Flocculants can be inorganic or organic. Inorganic flocculants made of iron and aluminum are effective but normally result in contamination of the microalgae biomass with these metals and production of toxic effluents [10]. Organic flocculants, such as chitosan, are biodegradable and are often used in low doses [12]. However, they are more expensive [13].

Polymeric flocculants can be cationic, anionic or nonionic. Key characteristics of polymeric flocculants that can influence the flocculation process include the molecular weight and charge density of the polymer [14]. An increase in either of these physical properties improves the flocculant's binding capacity [15].

Cationic polymers act as coagulants, neutralizing the negative charges of the microalgae cell walls and reducing the electrical repulsion between them, thus causing the cells to aggregate and form heavy flakes that settle to the bottom of the tanks. Anionic polymers can attach to negative surfaces despite electrostatic repulsion if ions that act as bridges between the polymer and the cell are present [14].

In spite of all of the advantages of flocculants, to our knowledge, no information is available about the possible effects of these elements on the amount and quality of lipids extracted from the microalgae. The aim of this study was to determine whether flocculants interfere with lipid extraction and the fatty acid profiles of two species of marine microalgae, *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*, both of which have great potential for biodiesel production [16].

MATERIAL AND METHODS

The microalgae species *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) and *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) used in this study are from the collection of the “Ecology of Phytoplankton and Aquatic Microorganisms” Laboratory of the Federal University of Rio Grande (Catalogue names NANN OCUL-1 and THAL WEIS-1, respectively). The cells were grown in batch cultures (3 replicas) with f/2 medium [17], with a salinity of 28, a temperature of 20 °C, a light intensity of 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a 12-12 h light/dark photoperiod. Cultures were constantly aerated.

After 15 days, when the cultures reached a volume of 6 liters, each one was divided into three 2-liter treatments as follows: 1) Control - with no flocculant; 2) APF treatment - with the anionic polyacrylamide flocculant Magnafloc[®] LT-25 (0,01dm³ of solution per dm³ of culture); and 3) CPF treatment - with the cationic polyacrylamide flocculant Flopam[®] (0,01dm³ of solution per dm³ of culture). Before the addition of the flocculants, a few drops of a solution having an amount-of-substance concentration of NaOH = 0.5 mol/dm³ were added to all cultures until the pH reached 10.

The cultures were shaken for two min, during which time a white precipitate appeared. In the treatments with flocculants, agitation was gradually decreased, and then the appropriate flocculant was added (volume fraction of 0.05% cationic and volume fraction of 0.5% anionic). The shaking of the culture was stopped when microalgae flakes were observed, which occurred after approximately 1 min. The cultures were kept still for about 1 hour, until most of the biomass had settled onto the bottom of the flask. Then the supernatant was

removed, and the cells were collected using a Whatman Grade 1 Qualitative Filter Paper (15mm). The concentrated biomass was kept at 60 °C in a hot air oven for 24 hours. After drying, the biomass was weighed and kept in a sealed refrigerator (3 ± 1 °C – open to atmosphere) in the dark until lipid extraction.

Extraction and quantification of lipids:

Lipids were extracted using the liquid-liquid method [18]. Crushed dry biomass (0.5 g) was put in a test tubes (three replicates) with 1.5 mL of a chloroform:methanol (2:1) mixture. The solution was ultrasonicated in a ultrasound bath (Unique UltraCleaner model 1400A – 40kHz; 120W) for 20 minutes. Next, the mixture was subjected to centrifugation for two minutes at 50 Hz. The lipid extraction was repeated three times for each tube. The liquid phase was transferred to previously weighed flasks. Thereafter, the solvent was evaporated under vacuum in a rotary evaporator. The samples were then placed in a hot air oven for complete evaporation of the solvent, and the flasks were weighed again. The total lipid fraction was calculated after differences of final and initial flask weights

Determination of the fatty acid profile:

Lipid samples (triplicates) were esterified according to [19]. The fatty acid profile was characterized by gas chromatography (GC) with detection by mass spectrometry (MS). Analyses were performed on a GCMS-QP2010Plus chromatographic system (Shimadzu) equipped with a split/splitless injector coupled with a mass detector. The operating temperatures of the detector were as follows: interface, 280 °C, and the source 230 °C. Detection using a full scan

from m/z 30 to m/z 500 with a scan time of 0.20 seconds was performed. The ionization mode used was electron impact at 70 eV. The operating conditions of the chromatograph were as follows: injector, 250 °C; column, 80 °C (initial temperature, 0 min), followed by gradient of 10 °C/min to 180 °C and then 7 °C/min up to a final temperature of 330 °C; He gas flow, 1.3 mL/min; pressure, 88.5 kPa; average linear velocity, 42 cm/s; and injection volume of 1 mL with a split ratio of 1:100. We used a Crossbond 5% dimethyl polysiloxane diphenyl 95% column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm Restek). The methyl esters of fatty acids were identified by comparison with known standards and were quantified by the method of standardized areas.

Statistical analysis

The results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), comparing the three treatments with a significant level of $\alpha = 0.05$. Tukey's multiple comparison test was then applied [20].

RESULTS

The control treatments of *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii* showed cell flocculation without any flocculant addition; this aggregation was the result of the pH increase. However, the addition of flocculant resulted in faster sedimentation of cells in comparison to the control. The biomass collected was, on average, 1 g/L for each culture.

The percentage of lipids extracted from the dry biomass of *Nannochloropsis oculata* varied between a minimum mass fraction of 3.6% of

dry biomass for the cationic (CPF) treatment and maximum mass fraction of 4.3% for the control. There were no statistically significant differences among the treatments (Fig. 1). *Thalassiosira weissflogii* yielded a similar amount of lipids, with a minimum mass fraction of 2.77% also for the CPF (Flopam®) treatment and a maximum mass fraction of 4.12 % for the control. This experiment also did not show any significant differences among treatments (Fig. 2).

The fatty acid profiles of *N. oculata* showed higher percentages of C16:0, C16:1 and C20:5 fatty acids (Table 1). Statistical analysis revealed a significant difference between the APF (Magnaflor®) treatment and other treatments, with a higher amount of C14:0 and a lower amount of C20:5 for the anionic treatment (Table 1). *T. weissflogii* yielded higher percentages of C16:0, C16:1, C16:3 and C20:5 fatty acids (Table 2). Statistically, the control treatment was significantly different from the APF and CPF treatments, yielding higher amounts of C16:0, C18:0 and C18:1n9c fatty acids (Table 2).

DISCUSSION

The harvest process of microalgae cultures is a major factor influencing the cost and quality of the final products [21]. Flocculation is the most convenient harvesting process because it allows the handling of large volumes of culture with low energy costs. In addition, cells concentrated by flocculation are in better physical condition than those manipulated by centrifugation or filtration, maintaining cellular integrity with preservation of the produced metabolites [9].

To ensure the maximum efficiency of the flocculants, pH adjustment is

required. However, in this study, the flocculation of *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii* was achieved with only pH variation (control treatment). Similar results for flocculation based on pH adjustment alone were found for microalgae of different groups, including diatoms, prasinophytes and cryptophytes [9].

Because the charge neutralization is the basis of flocculation and the electrical charge of the microalgae cell wall is negative, the cationic polyacrylamide flocculant would be expected to be more effective than the anionic flocculant. However, no significant differences were observed between these two flocculants. Several factors may have yielded this result. It is known that polymers can act as bridges to start floc formation. However, high concentrations of flocculant may reduce the aggregation [22]. Similarly, marine waters inhibit flocculation with polyelectrolytes because the high ionic strength affects the configuration and size of the polymer [23]. Conversely, the elimination of electrostatic repulsion caused by anionic polyelectrolyte adsorption is possible in the presence of divalent metal cations [14], such as those found in the f/2 culture medium. Nonetheless, it is more likely that the pH variation played the major role in making the flocculation similar for cationic and anionic flocculants.

The microalgae lipid concentration is species specific but is dependent on conditions such as light, temperature and nutrient availability. Both tested species yielded similar lipid contents, and no differences were found for the lipid contents with respect to the different treatments. These results indicate that the flocculants did not significantly interfere with the lipid extraction process. A study with *Botryococcus braunii* [21] also showed similar results. The lipid

content of *N. oculata* was of the same magnitude as those found in other studies [24][25], although bigger values were measured for this same microalgae species [26][27] but in different culture conditions.

Unlike the lipid content, the fatty acid profile of the two species differed significantly when treated with different types of flocculants. In general, the fatty acid compositions determined for the two species in this study were similar to those found by other authors. For *N. oculata*, the results showed that there were higher percentages of C16:0, C16:1 and C20:5 fatty acids, as reported by others [25] [26] [28]. The fatty acid profile of *T. weissflogii*, showed higher percentages of C14:0, C16:0, C16:1, C16:3 and C20:5 fatty acids, similarly to other studies [29] [30]. However, the percentages of some fatty acids changed after the addition of flocculants relative to the control. *N. oculata*, for instance, showed a greater difference in the percentages of C14:0 and C20:5, with higher levels of C14:0 fatty acids and a lower concentration of C20:5 fatty acids in the presence of anionic flocculant. For *T. weissflogii*, this flocculant caused a significant decrease in the levels of C16:0, C18:0 and C18:1n9t. Similar results were found for the cationic flocculant, with significant reduction in the concentrations of these same fatty acids.

In microalgae, the amount of lipids produced, as well as the fatty acid profile, may change based on the environmental conditions. Triglycerides are mainly formed by saturated and monounsaturated fatty acids, while polyunsaturated fatty acids are important components of the microalgae membranes, which show rapid responses to environmental changes, such as variations in temperature, light and pH [31]. The alkaline pH may lead to the accumulation of triglycerides and a decrease in membrane lipids [32]. During

sudden environmental changes, such as a pH increase, the synthesis of polyunsaturated fatty acids may be slower, and triglycerides rich in polyunsaturated fatty acids can donate acyl groups to the polar lipids to allow the reorganization of the membranes and a faster adaptive response of the cells [33]. However, it is very unlikely that the addition of NaOH caused the differences in the fatty acid profiles observed for treatment with anionic and cationic flocculant because all treatments involved similar amounts of NaOH to cause the pH increase.

It is more likely that the significant differences in the fatty acid profiles observed for the different treatments resulted from interactions between the flocculant, the microalgae cell walls and the extracted complex lipids rich in these specific fatty acids. We envisage a hypothetical scenario in which cells with flocculants attached to their cell walls would function as a trap for complex lipids after the lipid extraction process. Flocculants would attach to the cell walls due to strong Coulomb forces, while complex lipids would be caught by flocculant loops through weak London forces (Fig. 3).

This model would explain why the anionic polyacrylamide flocculant Magnafloc[®] LT-25 had the greatest influence on the fatty acid profiles of both microalgae species. Polymers attach to the microalgae cell walls due to a combination of forces, such as Coulomb, dipole-dipole, hydrogen bridging and van der Waals forces [11], while the free parts of the polymers make loops of different sizes. In the case of the anionic, the flocculant would attach to few sites because the microalgae cell wall has a negative electrical charge. Thus, the attached flocculants would be able to form more loops and, therefore collect a greater amount of complex lipids. If complex lipids contained greater amounts

of specific fatty acids, these fatty acids would be trapped and would not appear in the microalgae fatty acid profile. Thus, lower concentrations of fatty acids, such as EPA (C20:5) or oleic acid (C18:1n9c) in the fatty acid profiles obtained from *N. oculata* and *T. weissflogii*, respectively, would result from the decrease of complex lipids, rich in these fatty acids, which were trapped by the flocculants.

However, it is important to highlight that this model based on interactions among flocculants, cell walls and complex lipids would not explain increases in the levels of a specific fatty acid, as observed for myristic acid (C14:0) produced by *Nannochloropsis oculata*.

CONCLUSIONS

Previous research with *N. oculata* and *T. weissflogii* has indicated that these species present high growth and carbon fixation rates. Thus, large-scale cultures of these microalgae would contribute not only for biodiesel production, but also to a decrease in atmospheric carbon dioxide concentrations [16].

Regarding biodiesel production, the results of this study indicate that the use of anionic and cationic flocculants to concentrate the cells would contribute to the production of better biodiesel due to the removal of unsaturated fatty acids. It is well known that the level of hydrocarbon saturation has a great impact on the stability of the biofuel [34], since polyunsaturated fatty acids are more susceptible to oxidation, while saturated fats produce a biodiesel with superior oxidative stability and a higher cetane number [35].

However, if the microalgae culture is intended to produce specific commercial fatty acids, such as EPA (C20:5) or oleic acid (C18:1n9c), the use

of flocculants should be avoided because flocculants, especially the anionic polyacrylamide Magnafloc[®] LT-25, significantly contribute to a reduction of the amount of these fatty acids in the lipid extracts produced by *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*.

Acknowledgements

The authors thank Márcia Kurz for the help in gas chromatography analysis. L. Borges was funded by a PhD grant from “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES”. P.C. Abreu and M.M. D'Oca are research fellows of the Brazilian Council for Science and technological development (CNPq).

REFERENCES

- [1] Apt KE, Behrens PW. Commercial developments in microalgal biotechnology. J. Phycol 1999; 35(2):215-26.
- [2] Hammouda O, Gaber AA, Abdel-Raouf N. Microalgae and wastewater treatment. Ecotox Environ Safe 1995; 31(3): 205-10.
- [3] Vilchez C, Lobato MV. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. Enzyme Microb Tech 1997; 20(8): 562-72.
- [4] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng 2006; 101(2): 87-96.
- [5] Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya SK. Hydrogen production by Cyanobacteria. Microb Cell Fact 2005; 4(36): 1-11.
- [6] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv 2007; 25(3): 294-306.

- [7] Borowitzka MA. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. J Appl Phycol 1997; 9(5): 393-401.
- [8] Mata TM, Martins AA, Caetano N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renew Sust Energ Rev 2010; 14(1): 217-32.
- [9] Knuckey R, Brown M, Robert R, Frampton D. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. Aquacult Eng 2006; 35(3): 300-13.
- [10] Grima E, Belarbi E, Ación Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnol Adv 2003; 20(7-8): 491-515.
- [11] Uduman N, Qi Y, Danquah MK, Forde GM, Hoadley A. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. J Renewable Sustainable Energy 2010; 2(1): 01-15
- [12] Singh RP, Tripathy T, Karmakar, GP, Rath SK, Karmakar NC, Pandey SR, et al. Novel biodegradable flocculants based on polysaccharides. Curr Sci 2000; 78(7): 7-12.
- [13] Harith ZT, Yusoff F M, Mohamed MS, Din MS, Ariff AB. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans* cells. Afr J Biotechnol 2009; 8(21): 5971-78.
- [14] Bolto B, Gregory J. Organic polyelectrolytes in water treatment. Water Res 2007; 41(11): 2301-24.
- [15] Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. . Renew Sust Energ Rev 2010; 14(3): 1037-47.
- [16] Borges L, Faria BM, Odebrecht C, Abreu PC. Potencial de absorção de

carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura : primeiros passos para o desenvolvimento de um “ mecanismo de desenvolvimento limpo ”. Atlântica 2007; 29(1): 35-46.

[17] Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH, editors. Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA. 1975. p. 26-60.

[18] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959; 37(8): 911-17.

[19] Metcalfe L, Schmitz A. The Rapid Preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. Anal Chem 1961; 33(3): 363.

[20] Zar JH. Biostatistical analysis. New Jersey, Prentice Hall ; 1996.

[21] Lee J, Kim B, Kim E, Kwon S, Yoon D, Oh M. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. Lett Appl Microbiol 1998; 27(1): 14-18.

[22] Danquah MK, Gladman B, Moheimani N, Forde GM. Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. Chem Eng J 2009; 151(1-3): 73-78.

[23] Bilanovic D, Shelef G, Sukenik A. Flocculation of microalgae with cationic polymers—effects of medium salinity. Biomass 1988; 17 (1): 65–76.

[24] Volkman JK, Brown MR, Dunstan GA, Jeffrey SW. The Biochemical Composition of Marine Microalgae from the Class Eustigmatophyceae. J phycol 1993; 29(1): 69-78.

[25] Hu H, Gao K. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis sp.*, with enriched carbon sources. Biotechnol Lett 2003; 25(5): 421-25.

- [26] Fabregas J, Maseda A, Dominguez A, Otero A. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semi-continuous culture. *World J Microb Biot* 2004; 20(1): 31-35.
- [27] Chiu S, Kao C, Tsai M, Ong S, Chen C, Lin C, et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource technol* 2009; 100(2): 833-38.
- [28] Sukenik A, Zmora O, Carmeli Y. Biochemical Quality of Marine Unicellular Algae with Special Emphasis on Lipid-Composition. 2. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 1993; 117(3-4): 313-26.
- [29] Ishida Y, Hiragushi N, Kitaguchi H, Mitsutani A, Nagai S, Yoshimura M. A highly CO₂-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. *Fish Science* 2000; 66(4): 655-59.
- [30] Zhukova NV, Aizdaicher NA. Fatty-Acid Composition of 15 Species of Marine Microalgae. *Phytochemistry* 1995; 39(2): 351-56.
- [31] Guschina IA, Harwood JL. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 2006; 45(2): 160-86.
- [32] Guckert, JB, Cooksey KE. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *J Phycol* 1990; 26 (1): 72-79.
- [33] Khozin-Goldberg I, Shrestha P, Cohen Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Pavlova lutheri*. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1738(1-3): 63-71.
- [34] Greenwell HC, Laurens LM, Shields RJ, Lovitt RW, Flynn KJ. Placing microalgae on the Biofuels priority list: a review of the technological challenges.

J. R. So. Interface 2010; 7(46): 703-26.

[35] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant J 2008; 54(4): 621-39.

Table 1: Fatty acid profile of *Nannochloropsis oculata* (mass fraction in %) for different treatments. Different letters indicates statistically significant differences.

Fatty acids	Control				Anionic Polyacrylamide Flocculant (APF)				Cationic Polyacrylamide Flocculant (CPF)			
	Run 1	Run 2	Run 3	M $\pm$ SD	Run 1	Run 2	Run 3	M $\pm$ SD	Run 1	Run 2	Run 3	M $\pm$ SD
C14:0	5.03	5.55	6.14	5.57 $\pm$ 0.6 ^a	12.13	11.16	9.56	10.95 $\pm$ 1.3 ^b	5,31	5,33	5,06	5.23 $\pm$ 0.1 ^a
C16:1	27.06	25.80	26.09	26.32 $\pm$ 0.7	30.91	27.78	27.27	28.65 $\pm$ 2.0	25,36	25,01	25,87	25.41 $\pm$ 0.4
C16:0	32.34	33.24	30.15	31.91 $\pm$ 1.6	31.50	33.26	31.47	32.08 $\pm$ 1.0	29,66	33,88	30,44	31.33 $\pm$ 2.2
C18:1n9	7.29	10.90	10.68	9.63 $\pm$ 2.0	4.70	8.18	8.22	7.03 $\pm$ 2.0	7.20	10.48	9.71	9.13 $\pm$ 1.7
C18:1n11	3.21	1.82	2.35	2.46 $\pm$ 0.7	1.65	1.47	2.07	1.73 $\pm$ 0.3	2.49	1.90	1.96	2.12 $\pm$ 0.3
C20:5	25.07	22.68	24.58	24.11 $\pm$ 1.3 ^a	14.77	14.17	16.42	15.12 $\pm$ 1.2 ^b	29.98	23.40	26.96	26.78 $\pm$ 3.3 ^a
Others					4.35	3.98	4.99	4.44 $\pm$ 0.5				

Table 2: Fatty acid profile of *Thalassiosira weissflogii* (mass fraction in %) for different treatments. Different letters indicates statistically significant differences.

Fatty acids	Control				Anionic Polyacrylamide Flocculant (APF)				Cationic Polyacrylamide Flocculant (CPF)			
	Run 1	Run 2	Run 3	M ± SD	Run 1	Run 2	Run 3	M ± SD	Run 1	Run 2	Run 3	M ± SD
C14:0	8.58	7.17	4.74	6.83 ± 2.0	8.78	9.34	8.48	8.87 ± 0.4	8.92	9.61	8.99	9.18 ± 0.4
C16:3	14.61	18.90	20.66	18.06 ± 3.1	18.98	16.32	17.52	17.61 ± 1.3	16.43	16.67	16.52	16.54 ± 0.1
C16:1	26.61	19.55	26.60	24.25 ± 4.1	24.35	15.83	23.63	21.27 ± 4.7	26.89	18.85	23.56	23.10 ± 4.0
C16:0	16.16	19.21	16.31	17.23 ± 1.7 ^a	14.08	12.98	15.04	14.03 ± 1.0 ^b	16.23	15.77	15.92	15.97 ± 0.2 ^{ab}
C18:1n9c	6.03	6.47	5.10	5.87 ± 0.7 ^a	2.65	1.76	3.48	2.63 ± 0.9 ^b	3.45	1.92	4.34	3.24 ± 1.2 ^b
C18:1n9t	3.95	4.07	4.38	4.13 ± 0.2	3.78	8.17	4.37	5.44 ± 2.4	2.56	2.41	4.06	3.01 ± 0.9
C18:0	1.59	3.48	2.30	2.46 ± 0.95 ^a	0.50	0.70	0.60	0.60 ± 0.1 ^b	1.34	0.43	0.93	0.90 ± 0.5 ^b
C20:5	15.96	17.78	18.05	17.26 ± 1.1	15.85	17.47	15.93	16.42 ± 0.9	14.82	17.19	15.36	15.79 ± 1.2
C22:6	1.40	1.62	1.86	1.63 ± 0.3	3.32	2.45	3.38	3.05 ± 0.5	2.43	1.74	3.45	2.54 ± 0.9
Others	5.10	2.20		3.65 ± 2.0	7.71	14.97	7.59	10.09 ± 4.2	6.93	15.41	6.86	9.73 ± 4.9

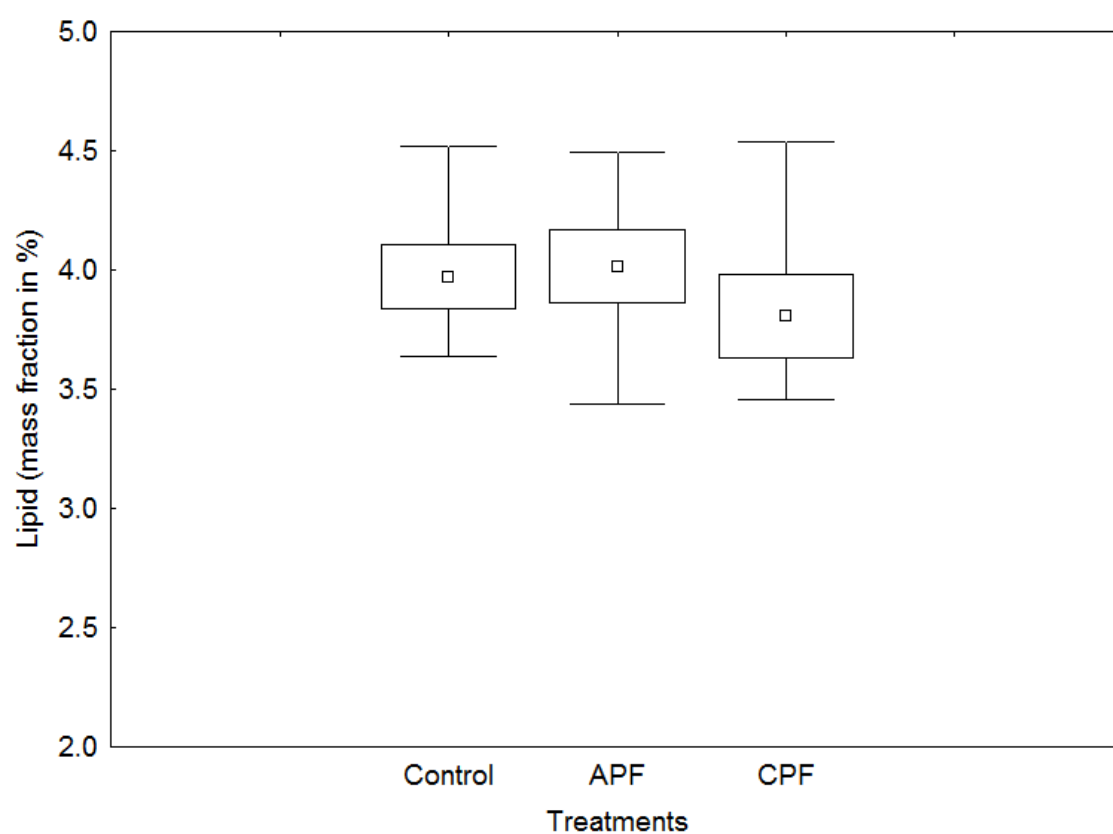


Figure 1. Box plot of lipid percentage of *Nannochloropsis oculata* dry biomass in each treatment.

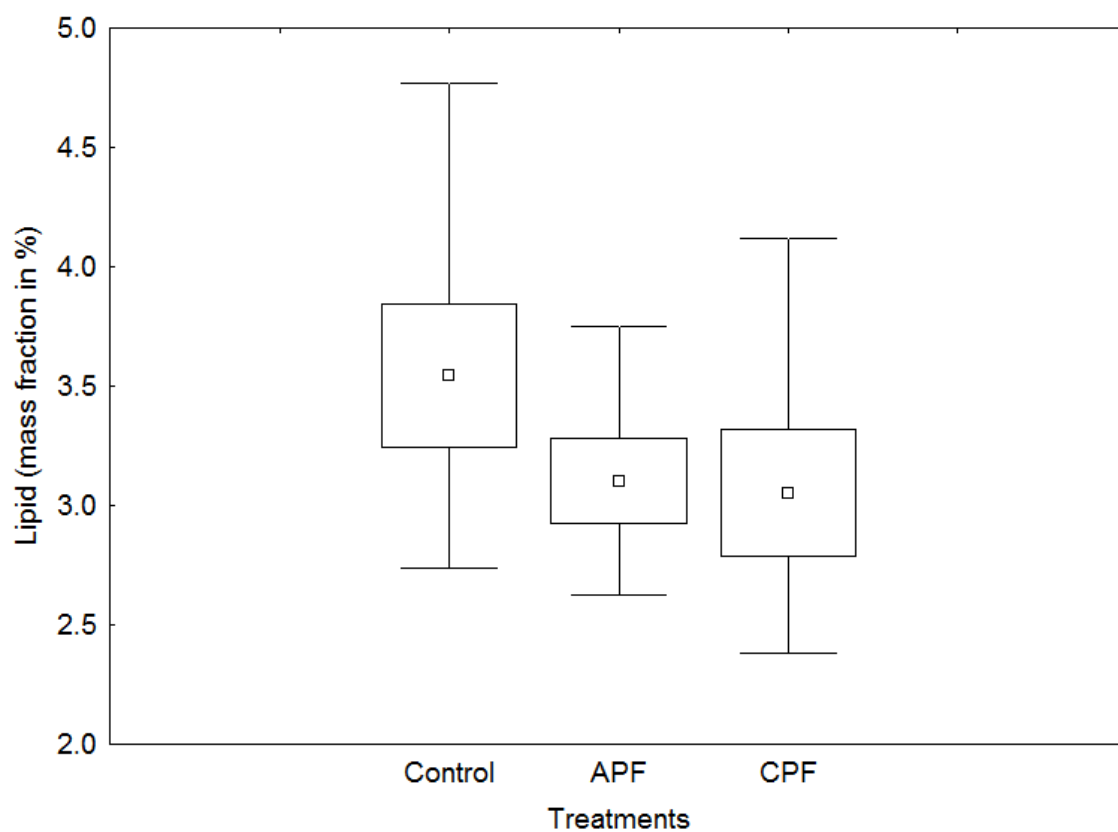


Figure 2. Box plot of lipid percentage of *Thalassiosira weissflogii* dry biomass in each treatment.

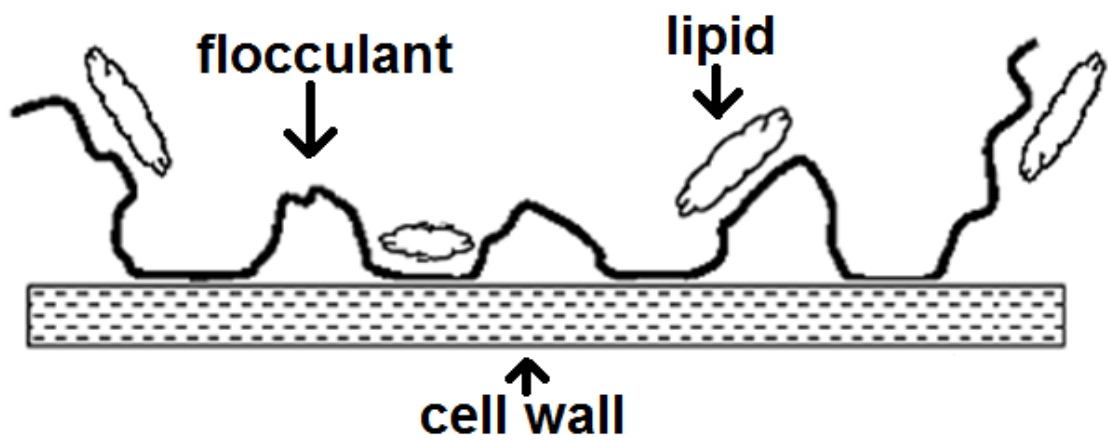


Figure 3. Schematic model, based in Bolto and Gregory [14], showing flocculant attached to microalgae cell wall and complex lipids being trapped by free flocculant loops.

CAPITULO 2

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA MARINHA *Nannochloropsis oculata* SOB CONDIÇÕES VARIADAS DE LUZ, TEMPERATURA, FONTE DE NITROGÊNIO E FASE DE CRESCIMENTO. Importância do crescimento celular e conteúdo de lipídios para atingir máximos rendimentos.

Lucélia Borges, Marcelo G. Montes D'Oca, Paulo Cesar Abreu.

Síntese dos resultados

Um experimento multifatorial foi realizado com *Nannochloropsis oculata* em diferentes intensidades luminosas (40 e 400 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura (15 e 30°C), fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), e fase de crescimento (logarítmica e estacionária). Os efeitos destas variáveis no crescimento, e no conteúdo e produtividade de lipídios e ácidos graxos foram testados simultaneamente. O maior crescimento foi com 15°C- NO_3^- , enquanto menores biomassas ocorreram com 15°C NH_4^+ . Maiores conteúdos de lipídios ocorreram na fase estacionária, alta luz e 15°C. Nas mesmas condições foram maiores as proporções de ácidos graxos saturados, enquanto 15°C e baixa intensidade aumentaram os insaturados. A produtividade dos ácidos graxos seguiu os mesmos padrões da produção de lipídios, sendo em alta luz e baixa temperatura os maiores valores. Os resultados apresentados indicam que diferentes combinações de conteúdo de lipídios e rendimento do crescimento

podem influenciar os rendimentos de lipídios e ácidos graxos. Assim, diferentes estratégias podem ser empregadas com o objetivo de alcançar a máxima produção de lipídios e ácidos graxos.

Production of lipid and fatty acids of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* under varying conditions of light, temperature, nitrogen source and growth phase: The importance of growth and cell content to reach maximum yields.

Lucelia Borges^{a,*}, Marcelo G. Montes D'Oca^b, Paulo Cesar Abreu^c.

^a Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brazil.

^b Escola de Química e Alimentos, Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brazil.

^c Instituto de Oceanografia, Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brazil.

Abstract

A multi-factorial experiment was conducted with *Nannochloropsis oculata* in different light (40-400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperature (15-30°C), nitrogen source (NO_3^- - NH_4^+), and growth phase (logarithmic-stationary). The effects of these variables on growth, lipid and FA, content and production, were tested simultaneously. The highest growth was at 15°C-nitrate, while lowest biomass occurred in 15°C-ammonium. Higher lipid contents occurred in stationary phase, high light and 15°C. Lipid production presented highest values with high light and 15°C. The same conditions increased the saturated FA, while 15°C and low light improved the unsaturated ones. FA production followed the same patterns of lipid production, high light and low temperature had the greatest influence on it. The results presented here indicate that different combinations of lipid content and growth can influence the lipid and FA yields. Thus, different

culture strategies can be employed in order to reach maximum lipid and FA production.

Keywords: algae, lipid, fatty acids, *Nannochloropsis oculata*.

Introduction

The increasing greenhouse effect that results from the accumulation of CO₂ in the atmosphere is a product of different human activities. The current consensus in the scientific community is that atmospheric CO₂ concentrations continue to increase in direct proportion to the use of fossil fuels (Huntley and Redalje, 2007). Autotrophic organisms, which fix atmospheric CO₂ through photosynthesis and furnish renewable material for the production of biofuels, are being considered for the mitigation of greenhouse gases, and the cultivation of marine microalgae appears to be more efficient than plants (Packer 2009).

When compared to other photosynthetic organisms, marine microalgae have several advantages such as the possibility of being cultivated using salt or brackish water. Moreover, sewage can be used as a nutrient source by microalgae, promoting the cleaning of this effluent (Vílchez et al., 1997; Borowitzka, 1995). Due to their high growth rate, microalgae can be produced in small areas and in areas inappropriate for agriculture activities (Chisti, 2007).

Microalgae produce important polyunsaturated fatty acid (PUFA) of particular interest to the food and pharmaceutical industries, including the omega-3, eicosapentaenoic acid (EPA - C20:5) and docosahexaenoic acid (DHA - C22:6) (Vargas et al., 1998) and the omega-6, γ -linolenic acid (GLA - C18:3) and arachidonic acid (AA - C20:4). More recently, the lipid production

potential of several microalgae species for use in biofuels has been investigated (Chisti, 2007; Stephens et al., 2010). Borges et al. (2007) conducted a research to evaluate the growth rate and lipid content of ten microalgae species currently used in aquaculture. It was demonstrated that the species *Nannochloropsis oculata*, was the most productive microalgae and that this species has high lipid content, indicating that it may be used in the production of biofuels (Chiu et al., 2009). Additionally, the large biomass production of this species makes it a good candidate for carbon sequestration.

Nannochloropsis oculata is a Eustigmatophyceae, a marine green algae, and has been considered an important source of the polyunsaturated fatty acid EPA (Sukenik et al., 1993). Lipid production by *N. oculata* was studied in cultures with different light conditions (Zhukova and Aizdaicher, 1995; Fábregas et al., 2004), nutrient concentrations (Suen et al., 1987) and nitrogen sources (Lourenço et al., 2002). The physiological response of the algae to high CO₂ concentration was also investigated (Hoshida et al., 2005, Hu and Gao, 2003, Hu and Gao, 2006). The production of EPA by *N. oculata* in photobioreactors was studied at different light levels (Sukenik et al., 1989; Chini Zittelli et al., 1999) and growth conditions (Hoshida et al., 2005).

In most of the previously referenced studies, the effects of different variables on *N. oculata* growth, lipid production and fatty acids profile were considered separately or in pairs. In this study, the innovative aspect was the evaluation of possible synergism between different factors in a multi-factorial experiment. Effects of temperature, light, nitrogen source and growth phase on the biomass and lipid productivity, as well as on the fatty acid profile and

productivity of *N. oculata* were tested simultaneously in order to determine which abiotic interactions are most suitable for channeling the metabolic flux generated in photosynthesis to lipid biosynthesis and the production of PUFAs by this microalgae. Moreover, we discuss how the different contribution of microalgae production and cell lipid content can be conjugated in order to get the highest lipid and fatty acids yields.

Material and methods

The strain of *Nannochloropsis oculata* (NANN OCUL-1) used in this study belongs to the Microalgae Collection of the Ecology of Phytoplankton and Marine Microorganisms Laboratory of the Federal University of Rio Grande (FURG) was maintained in f/2 medium (Guillard, 1975), with a salinity of 28, a temperature of 20 °C, a light intensity of 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 12/12 h (light / dark).

The microalgae growth, lipid content and fatty acid profiles were determined in 16 treatments with two repetitions each. The treatments involved different conditions of light intensity (40 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperature (15 and 30 °C), nitrogen source (NO_3^- and NH_4^+), and growth phase (logarithmic-LOG and stationary-STA), as shown in Table 1. The final Nitrogen concentration in all media was 8.8×10^{-4} M, as in the f/2 medium, added as N- NaNO_3 and N- NH_4 Cl. Conditions of light and temperature were established in germination chambers (347-CDG, Fanem), all adjusted with a 12/12 h (light / dark) photoperiod.

N. oculata was grown in batch culture. Six liters of culture were used for each replicate in each treatment. The growth curve in acclimated cells was determined with periodically *in vivo* Chlorophyll fluorescence measurements using a calibrated fluorometer (TD-700, Turner). The fluorescence readings were converted to Chlorophyll a ($\mu\text{g L}^{-1}$) using the equation

$$y = 1.8304x - 49.699 \quad (R^2 = 0.99) \quad (\text{Eq.1})$$

previously defined, where y is the Chlorophyll a concentration and x the *in vivo* fluorescence reading.

Chlorophyll a measurements were converted to dry weight, considering that Chlorophyll a represents 1% of total microalgae dry biomass (Reynolds, 2006). The yield rate (or daily productivity) of *N. oculata* in each treatment was calculated according to the equation (Wood et al. 2005):

$$Y = \Delta x / \Delta t \quad (\text{Eq. 2})$$

where Δx = final dry weight - initial dry weight and Δt = time variation (Wood et al. 2005).

Once the cultures reached the logarithmic phase after 4 days (30 °C) and 5 days (15 °C), approximately 2.5 L were collected, and the cells were concentrated after pH variation, according to Borges et al. (2011). The remaining 2.5 L were kept in the germination chambers until achieving the stationary phase (9 days - 30 °C; 10 days -15 °C), when cells were concentrated in the same way. The concentrated biomass was kept at 60 °C in a hot air oven for 24 hours. After, the dry biomass was kept in a refrigerator in the dark until lipid extraction.

Extraction and quantification of lipids:

Lipids were extracted from dry biomass using the method adapted from Bligh and Dyer (1959) (Zhu *et al.*, 2002; D'Oca *et al.* 2011). Crushed dry biomass (0.5 g) was put in test tubes (three replicates) with 1.5 mL of a chloroform:methanol (2:1) mixture. The solution was ultrasonicated for 20 minutes. Next, the mixture was subjected to centrifugation for two minutes at 3000 rpm. The lipid extraction was repeated three times for each tube. The liquid phase was transferred to previously weighed flasks. Thereafter, the solvent was evaporated under vacuum in a rotary evaporator. The samples were then placed in a hot air oven for complete evaporation of the solvent, and the flasks were weighed again. The total lipid fraction was determined by differences in flasks weight. Lipid productivity was calculated with the percentage and yield of growth.

Determination of the fatty acid profile:

Lipid samples (three repetitions) were esterified according to the method described by Metcalfe and Schmidt (1961). First, the sample was placed in a tube with 2 mL of a boron trifluoride:methanol solution. The mixture was heated in a water bath at 70 °C for 20 minutes. To recover the derivatized esters, the mixture was poured into a separatory funnel with 15 mL of hexane and 20 mL of distilled water. The separatory funnel was shaken vigorously and then left undisturbed until the organic and aqueous phases separated. The aqueous phase was drained and discarded. The organic phase containing the fatty esters was drained and filtered, and the solvent was evaporated.

The fatty acid profile was characterized by gas chromatography (GC) with detection by mass spectrometry (MS). Analyses were performed on a GCMS-QP2010Plus chromatographic system (Shimadzu) equipped with a split/splitless injector coupled with a mass detector. The operating temperatures of the detector were 280 °C for the interface and 230 °C for the source. Detection using a full scan from m/z 30 to m/z 500 with a scan time of 0.20 seconds was performed. The ionization mode used was electron impact at 70 eV. The operating conditions of the chromatograph were as follows: injector, 250 °C; column, 80 °C (initial temperature, 0 min), followed by a gradient of 10 °C/min to 180 °C and then 7 °C/min up to a final temperature of 330 °C; He gas flow, 1.3 mL/min; pressure, 88.5 kPa; average linear velocity, 42 cm/s; and injection volume of 1 mL with a split ratio of 1:100. A Crossbond 5% dimethyl polysiloxane diphenyl 95% column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m Restek) was used. The methyl esters of fatty acids were identified by comparison with known standards and were quantified by the method of standardized areas.

Statistical analysis

The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA), comparing the treatments with a significance level of $\alpha = 0.05$. The Tukey's post-hoc multiple comparison test ($\alpha = 0.95\%$) was applied for the determination of differences of lipids and fatty acids (Zar, 1996).

Results and Discussion

The microalgae growth was mainly affected by temperature, since highest and lowest increment of biomass occurred at 15°C, while at 30°C all treatments presented similar growth characteristics, independent of light intensity and nitrogen source (Fig. 1; Tab. 2). Interestingly, at the lowest temperature the nitrogen source played an important role on the *Nannochloropsis oculata* growth, since highest and lowest growth yield of all experiment were measured for treatments with nitrate and ammonium, respectively (Fig. 1; Tab. 3).

The expected results would be a better growth in NH_4^+ , since ammonium uptake is energetically advantageous to phytoplankton growth due to its direct incorporation into amino acids, different of nitrate that must be reduced to ammonium inside the cells, at the expense of several ATP (Reynolds, 2006). However, high nitrate uptake is normally observed during phytoplankton blooms in waters with transient conditions of low temperature and high nitrate concentration, as observed during spring in most temperate water bodies, or in upwelling regions (Lalli and Parsons, 1993). According to Lomas and Glibert (1999) hypothesis, the preferential nitrate uptake at low temperatures would be related to the internal cellular energy balance, where nitrate would function as an oxidant in order to dissipate the overflow of electrons generated by the excess of light energy. This would explain the highest growth rate determined in the 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – 15°C – Nitrate treatment, but not the similar growth rate obtained for the 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – 15°C – Nitrate treatment. It is likely that nitrate, instead of ammonium, plays a more important role in the

N. oculata growth at low temperature, however the biochemical mechanisms that lead to this advantageous growth are not clearly understood and can result from complex interactions of Nitrogen and Carbon metabolisms in the cell (Fidalgo et al., 1998; Lomas and Glibert, 1999).

Higher lipid content normally occurred in stationary phase, except for the 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – 30°C – Nitrate treatments (Fig. 2a), though highest contents were observed in treatments with high light and low temperature (Fig. 2a). Microalgae growth in batch cultures has distinct phases in which the cells undergo physiological and nutritional changes, directly influencing the synthesis of lipids. When the culture is in the logarithmic phase, growth is exponential because the medium has enough nutrients and light to maintain high production rates. When the concentration of nutrients in the medium begins to decrease, it causes a steady decline in growth rates, and the culture reaches the stationary phase. However, under these circumstances, many species of microalgae are still actively synthesizing fatty acids (Thompson Jr., 1996), leading to accumulation of lipids that are stored as reserve substance (Fidalgo et al., 1998; Hu et al., 2008).

The increment of lipid content at the stationary growth phase could be the result of nutrient deficiency, characteristic of final phase of batch cultures. Nutrient starvation would reduce the cells division, but the availability of light energy would be channeled to the production of triacylglycerols, a reserve substance that can also contribute as an electron sink under photo-oxidative stress conditions (Guschina and Harwood, 2006; Hu et al., 2008). Several studies have demonstrated the effect of nutrient starvation, especially Nitrogen,

in the lipid production by microalgae (Suen et al., 1987; Guschina and Harwood, 2006). However, Hu et al. (2008) observe that the aging of microalgae in batch cultures may or may not be associated with nutrient depletion, since increase in lipid was also observed in old cultures plenty of nutrients.

According to the results of the Analysis of Variance (Tab. 2) differences found in lipid content were related to combined effects of growth phase and light intensity. In Figure 2 it is possible to observe that highest lipid content occurred in the stationary phase of 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – 15°C treatments. In general, the synthesis of triacylglycerols is favored by high light intensity (Thompson, 1996), while other studies have demonstrated that light intensity has greater influence on the polarity of formed lipid, and also on the degree of fatty acids saturation (Guschina and Harwood, 2006; Hu et al., 2008). In our study highest lipid content was observed at high light and low temperature, but not in treatments with high light and temperature, while treatment with 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – 15°C –Ammonium also showed high lipid content. Thus, it is likely that low temperature also contributed to the increment of lipid in the cells, though opposite results were found by Converti et al. (2009), who observed a significant increase (doubled) in lipid content in *N. oculata* after an increment of 5°C in the water temperature.

Lipid productivity, which was calculated after biomass increment and lipid cell content, was influenced by combined actions of temperature and light and temperature and nitrogen source (Tab. 2). The microalgae growth and lipid content was higher in treatment with 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 15° C and using nitrate as the main Nitrogen source (Figs. 1 and 2). For *N. oculata*, this light

intensity was considered to be its light saturation (IK), i.e., the light intensity at which the maximum photosynthesis (P_{max}) occurs (Borges et al., 2007). Also lipid productivity was superior with $400 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 15°C (Fig. 2b). Thus, high lipid productivity in this case would be the result of combined high values of growth and bigger lipid content. However, two other treatments that either did not show highest growth ($400 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1} - 15^\circ\text{C} - \text{Ammonium treatment}$), or lipid content ($40 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1} - 15^\circ\text{C} - \text{Nitrate}$) also presented high lipid productivity (Figs. 1a and 2a). On the other hand, the treatment $40 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1} - 15^\circ\text{C} - \text{Nitrate}$, which presented high biomass increment, did not present a high lipid productivity or yield due to the low lipid content.

Similar patterns are observed if we consider the lipid yield, especially at the stationary phase (Fig. 3). Note that the total lipid production varied according the biomass production and lipid content and also the growth phase, since *N. oculata* lipid yield at the end of LOG phase was considerably low (Fig. 3a). Thus, the results presented here clearly demonstrate that high lipid production can be achieved if *N. oculata* is cultured at high light intensity, low temperature and having nitrate as the main nitrogen source, since these cultivation conditions propitiate high microalgae growth and lipid accumulation. However, good lipid production would also be reached using Ammonium at high or low light intensity, but with low temperature.

Usually when microalgae are submitted to stressful conditions there is a decrease in growth rates and an increase in lipid production (Sukeník et al., 1989; Sukeník, 1991; Fábregas et al., 2004). However, under stress conditions,

the accumulation of lipids usually does not compensate for the decrease in biomass, resulting in low productivity.

The importance of cultivation conditions adjustment for best biomass and lipid production was also considered by other authors studying other microalgae species (Solovchenko et al., 2008; Courchesne et al., 2009). Courchesne et al., (2009) observed that one of the greatest disadvantage of the “Biochemical engineering approach” (culture conditions manipulation) of nutrient starvation is that the overall lipid productivity of microalgae in nutrient depleted medium can be low, since the cell division rate decrease, also decreasing the overall energy recovery. The authors suggest the use of the “two stage cultivation strategy”, where high biomass would be achieved in nutrient-sufficient culture and lipid accumulation would occur in nutrient-depleted medium. This two stage cultivation strategy occurs in batch culture, but authors suggest the use of a hybrid photobioreactor/open pond cultivation system.

In this study, the dominant fatty acids produced by *N. oculata* were C14:0, C16:0, C16:1, C18:1 and C20:5 (Fig. 4a), as also found in other studies (Hu and Gao, 2003, 2006; Fábregas et al. 2004). In general there was an increase of saturated fatty acids, especially C16:0, followed the increment of temperature, and the opposite was observed for the unsaturated fatty acids, similarly to the reported by Guschina and Harwood (2006) and Hu et al. (2008). It is very likely that changes in the saturation degree of fatty acids according to the temperature results in better cell membrane stabilization. However, the regulatory mechanisms that lead to a rapid physiological acclimatization of microalgae cells is still unknown (Hu et al., 2008).

Unsaturated fatty acids (C16:1 and C20:5) showed highest proportion at low temperatures. Sub-optimal temperatures generally increase the levels of unsaturated fatty acids to maintain stability and fluidity of membrane lipids (Hu, 2004). Conversely, increased proportions of C12:0, C14:0, C15:0, C16:0 and C18:0 were measured in treatments with higher temperatures. The increase in saturated fatty acids in high temperature follows the same pattern as the increase of unsaturated fatty acids at low temperatures, i.e., saturated fatty acids maintain membrane stability at high temperatures (Thompson Jr., 1996; Gushina and Harwood, 2006; Dowhan et al., 2008).

Percentage of unsaturated fatty acid was higher in NO₃ (Fig. 4a; Tab. 2). Studies have demonstrated an increase of lipids and PUFAs in cultures with higher concentrations of NO₃ (Lourenço et al., 2002; Feng et al., 2011). Feng et al. (2011) proposed that if surplus nitrogen was used for protein production by the algae, this would contribute to the production of elongase and desaturases enzymes that are responsible for the production of polyunsaturated fatty acids. However, this hypothesis was not tested.

Lower light intensity produced a higher proportion of unsaturated fatty acids such as C18:2, C19:1 and C20:5 (Fig. 4a). This likely to occur because, at sub-saturating light intensities, cells must improve their photosynthetic potential and thus invest in the production of chloroplasts with thylakoids, that are formed by PUFA (Schmid and Ohlrogge, 2008). The saturated fatty acids C17:0 and C20:0 were only observed in high light intensities. Additionally, more light led to an increase of C12:0, C14:0 and C15:0. This probably occurred because, with

the luminosity increment, the cells begin to store triacylglycerols, which are composed mainly of saturated fatty acids (Hu, 2004).

It is noteworthy that the isomers C18:1*c* and C18:1*t* showed highest proportions at low and high temperatures, respectively. The “cis” form is thermodynamically less stable than the “trans”, having the lowest melting point (Gurr et al., 2002). Thus, at higher temperatures, the trans isomers probably ensure better membrane stability. In contrast, at lower temperatures, the cis configuration, which is most common in nature (Gurr et al., 2002), fulfills this role.

EPA (C20:5) is a PUFA with high economic value due to its importance to human health and aquaculture (Hoshida et al., 2005). In this study in the logarithmic phase cells reached the highest content of C20:5 (Fig. 3a). This increased amount of EPA in the logarithmic phase was expected because, during exponential growth, the synthesis of membrane lipids is increased, especially the production of galactolipids, which are major constituents of the cell membrane of *N. oculata* (Sukenik et al., 1989). The content and productivity of EPA also was higher in NO₃ and 15°C (Fig. 4), by the reasons explained previously for unsaturated fatty acids.

The fatty acid productivity (Fig. 4b) followed the same patterns of lipid productivity, with biggest production at high light intensity, low temperature. Nitrate seems to play an important role to the production of EPA (C20:5) since high levels of this fatty acid were obtained in treatments with this nitrogen source. Note that in Fig 4b, the production of C20:5 in the 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – 15°C – Nitrate was bigger than in the 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – 15°C –

Ammonium treatment, whereas the production of other fatty acids were bigger in this last treatment.

In summary, the results of this study indicate that highest lipid and fatty acid production by the microalgae *Nannochloropsis oculata* can be achieved if cells are raised under high light intensity ($400 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), low temperature (15°C) and having nitrate as the main nitrogen source. However, increased lipid yield can also be obtained with the use of Ammonium that does not produce much biomass, but leads to higher lipid contents, even at low light intensity. Thus, different culture strategies can be applied in order to obtain high lipid and fatty acids yields.

Acknowledgements

The authors thank Sergiane Caldas for the help with the gas chromatography analysis. L. Borges was funded by a PhD grant from “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES”. M. D’Oca and P.C. Abreu are Research fellows of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq of the Brazilian Ministry of Sciences.

References

- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 37, 911-917.
- Borges L., Faria, B.M., Odebrecht, C., Abreu, P.C., 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de desenvolvimento limpo”. Atlântica 29: 35-46.

- Borges L., Morón-Villarreyes, J.A., D'Oca, M.G.M., Abreu, P.C. 2011. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and Bioenergy* 35, 4449-4454.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol* 7(1), 3-15.
- Chini Zitelli, G., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L. Vincenzini, M., Tredici, M.R., 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J Biotech* 70, 299-312.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biomass* 25, 294-306.
- Chiu, S., Kao, C., Tsai, M., Ong, S., Chen, C., Lin, C., 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource technol.* 100(2): 833-838.
- Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E., Perego, P., Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Engin. Process* 48: 1146-1151.
- Courchesne, N., Parisien, A., Wang, B., Lan, C. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcriptionfactor engineering approaches. *J. Biotechnol.* 14: 31-41.
- D'Oca, M.G.M., Viêgas, C.V., Lemões, J.S., Miyasaki, E.K., Morón-Villarreyes, J.A; Primel, E.G.; Abreu, P.C., 2011. Production of FAMES from Several Microalgal Lipidic Extracts and Direct Transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*. 35,1533-1538

- Dowhan, W., Bogdanov, M., Mileykovskaya, E. 2008. Functional roles of lipids in membranes, in: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Elsevier. Amsterdam, pp. 1-37.
- Fábregas J., Maseda, A., Dominguez, A., Otero, A. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semi-continuous culture. World J Microb Biot 20(1): 31-35.
- Feng, D., Chen, Z., Xue, S., Zhang, W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. Bioresource technol 102 (12): 6710-6716.
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture 166: 105-116.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds). Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, pp. 26-60.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N. 2002. Lipid Biochemistry: an introduction. 5th ed. Blackwell Science, Oxford.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog Lipid Res 45(2), 160-186.
- Hoshida, H., Ohira, T., Minematsu, A., Akada, R., Nishizawa, Y. 2005. Accumulation of eicosapentaenoic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. J Appl Phycol 17(1), 29-34.

- Hu, Q. 2004. Environmental Effects on Cell Composition. in: Richmond, A. (Ed) Handbook of Microalgal Culture. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp.83-93.
- Hu, H., Gao, K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. Biotechnol Lett 25(5), 421-425.
- Hu, H., Gao K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp to environmental factors under elevated CO₂ concentration. Biotechnol Lett 28(13), 987-992.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant J 54(4), 621-639.
- Huntley, M.E., Redalje, D.G. 2007. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 12, 573-608.
- Lalli, C.T., Parsons, T.R., 1993. Biological Oceanography: an introduction. Elsevier. Oxford. 301 p.
- Lomas, M.W., Glibert, P.M. 1999. Temperature regulation of nitrate uptake: A novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. Limnol. Oceanogr, 44(3) 556–572.
- Lourenço, S.O., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K.P., Aidar E. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. Phycologia 41 (2) 158-168.
- Metcalf, L., Schmitz, A. 1961. The Rapid Preparation of fatty acids esters for

gas chromatographic analysis. Anal Chem 33(3), 363.

Packer, M. 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. Energ Policy 37 (9) 3428-3437.

Reynolds, C. 2006. Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge.

Schmid, K.M., Ohlrogge, J.B. 2008. Lipid metabolism in plants, in: Vance, D. E., Vance. J. E. (Eds.), Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Elsevier. Amsterdam, pp. 97-130.

Solovchenko, A, Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M. 2008. Effects of light and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*. J. Appl. Phycol. 20: 245-251.

Stephens, E., Ross, I., Mussnug, J., Wagner, L., Borowitzka, M., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. 2010. Future prospects of microalgal biofuel production system. Trends in Plant Science, 15 (10) 554-564.

Suen, Y., Hubbard, J.S., Holzer G., Tornabene, T.G. 1987. Total Lipid Production of the Green-Alga *Nannochloropsis* sp. QII under Different Nitrogen Regimes. J Phycol 23(2), 289-296.

Sukenik, A. 1991. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Bioresource Technol 35(3), 263-269.

- Sukenik, A., Carmeli Y., Berner T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. J Phycol 25(4), 686-692.
- Sukenik A., Zmora, O., Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. 2. *Nannochloropsis* sp. Aquaculture 117(3-4), 313-326.
- Thompson Jr., G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. Biochimica et Biophysica Acta 1302: 17-45.
- Vargas, M. A., Rodriguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. J Phycol 34(5), 812-817.
- Vilchez, C., Garbayo, I., Lobato, M.V., Veja, J.M. 1997. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. Enzyme Microb Tech 20, 562-572.
- Wood, A.M., Everroad, R.C., Wingard, L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures in: Andersen, R.A. (ed) Algal culturing techniques. Elsevier Oxford. pp 269-285
- Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhu M., Zhou P.P., Yu L. 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. J Bioresour Technol; 84:93-95.
- Zhukova, N.V., Aizdaicher, N.A. 1995. Fatty-acid composition of 15 species of marine microalgae. Phytochemistry 39(2), 351-356.

Table 1: Experimental design.

Light	Temperature	Nitrogen source	Growth phase
40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	15 °C	NO ₃	Log.
			Sta.
		NH ₄	Log.
			Sta.
	30 °C	NO ₃	Log.
			Sta.
		NH ₄	Log.
			Sta.

Table 2: Statistical results (Factorial ANOVA). DF = degree of freedom, T = temperature, L = light, N = nitrogen source, GP = growth phase.

		Content (%)				Productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹)			
		DF	F	p	DF	F	p		
	Lipid	Intercept	1	24.311	<0.0001	Intercept	1	18.0447	<0.0001
		L*GP	1	6.553	0.0125	T*L	1	39.099	<0.0001
		Error	75		T*N	1	38.1964	<0.0001	
		Error	75		Error	83			
	C14:0	Intercept	1	3206.43	<0.0001	Intercept	1	3001.30	<0.0001
		L*N	1	20.06	0.0003	T*L	1	199.29	<0.0001
Error		16		T*N	1	165.53	<0.0001		
		Error	16		Error	24			
	C16:0	Intercept	1	3586.67	<0.0001	Intercept	1	3412.09	<0.0001
		T*L	1	5.21	0.0364	T*L*N	1	13.18	0.0013
Error		16		Error	24				
		Error	16		Error	24			
	C16:1	Intercept	1	7326.81	<0.0001	Intercept	1	6456.75	<0.0001
		T	1	16.87	0.0008	T*L*N	1	62.87	<0.0001
N		1	8.1	0.0117	Error	24			
		Error	16		Error	24			
	C18:0	Intercept	1	291.07	<0.0001	Intercept	1	404.83	<0.0001
		T	1	26.22	0.0001	T*L*N	1	4.54	0.0435
Error		16		Error	24				
		Error	16		Error	24			
	C18:1c	Intercept	1	4442.29	<0.0001	Intercept	1	2640.34	<0.0001
		T*L*GP	1	5.46	0.0327	T*L*N	1	158.26	<0.0001
Error		16		Error	24				
		Error	16		Error	24			
	C18:1t	Intercept	1	220.69	<0.0001	Intercept	1	212.27	<0.0001
		T*N	1	17.8	0.0006	Light	1	17.65	0.0003
Error		16		Error	24				
		Error	16		Error	24			
	C18:2	Intercept	1	477.77	<0.0001	Intercept	1	246.01	<0.0001
		L*N	1	32.49	<0.0001	T*L	1	25.20	<0.0001
Error		16		Error	24				
		Error	16		Error	24			
	C20:5	Intercept	1	748.67	<0.0001	Intercept	1	281.97	<0.0001
		L*N*GP	1	5.34	0.0343	T*L	1	18.91	0.0002
Error		16		T*N	1	15.15	0.0007		
		Error	16		Error	24			

Table 3. Biomass yield ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) of *Nannochloropsis oculata* in each treatment.

	40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$		400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	15° C	30° C	15° C	30° C
NO₃⁻	42.39	30.52	44.9	35.58
NH₄⁺	6.8	27.96	27.56	29.98

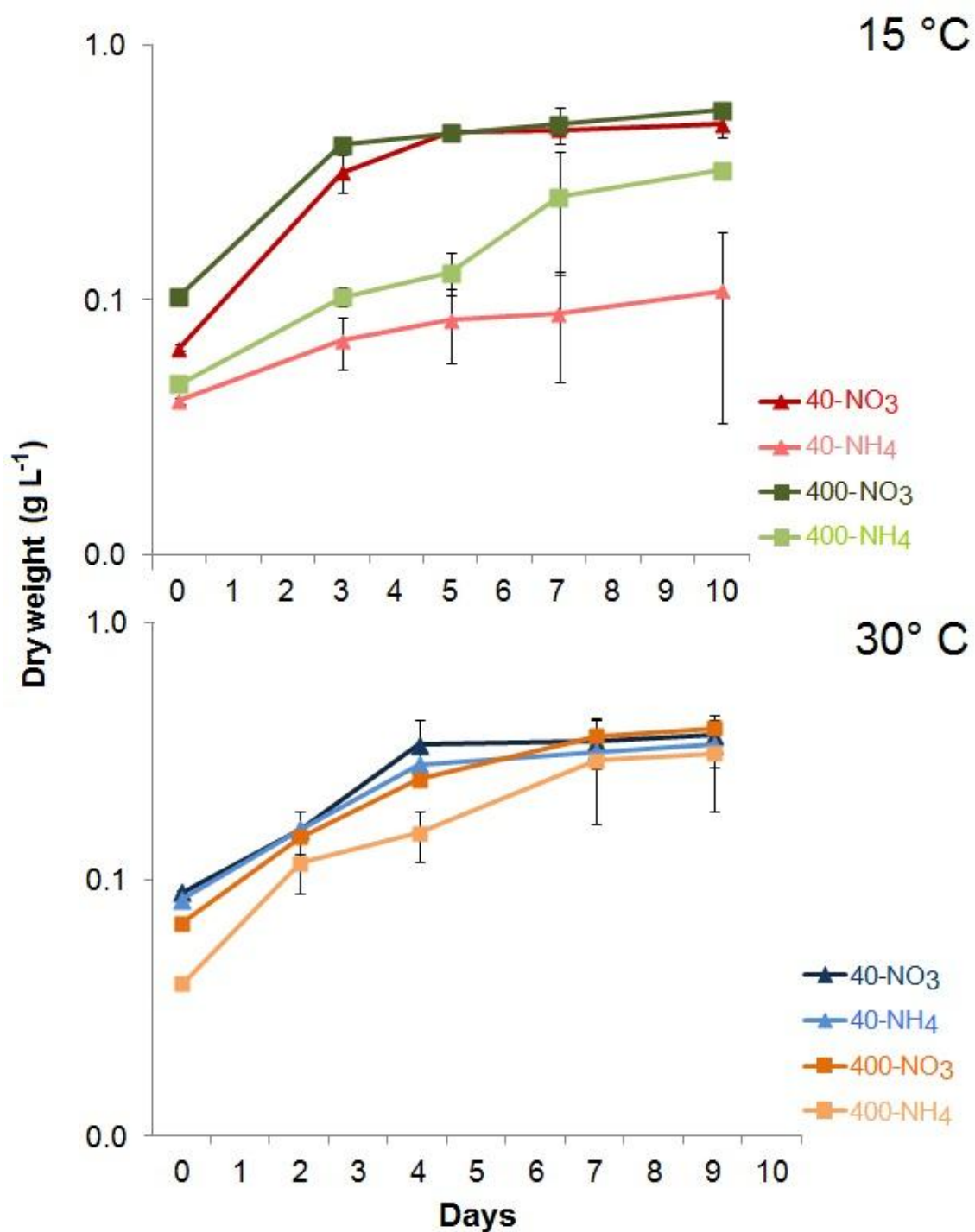


Figure 1. Growth curves in dry weight (g L^{-1}) of *Nannochloropsis oculata* in 15 and 30 °C of temperature. Light intensity ($\blacktriangle$ = 40; $\blacksquare$ = 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), nitrogen source (dark symbols = NO_3 ; light symbols = NH_4).

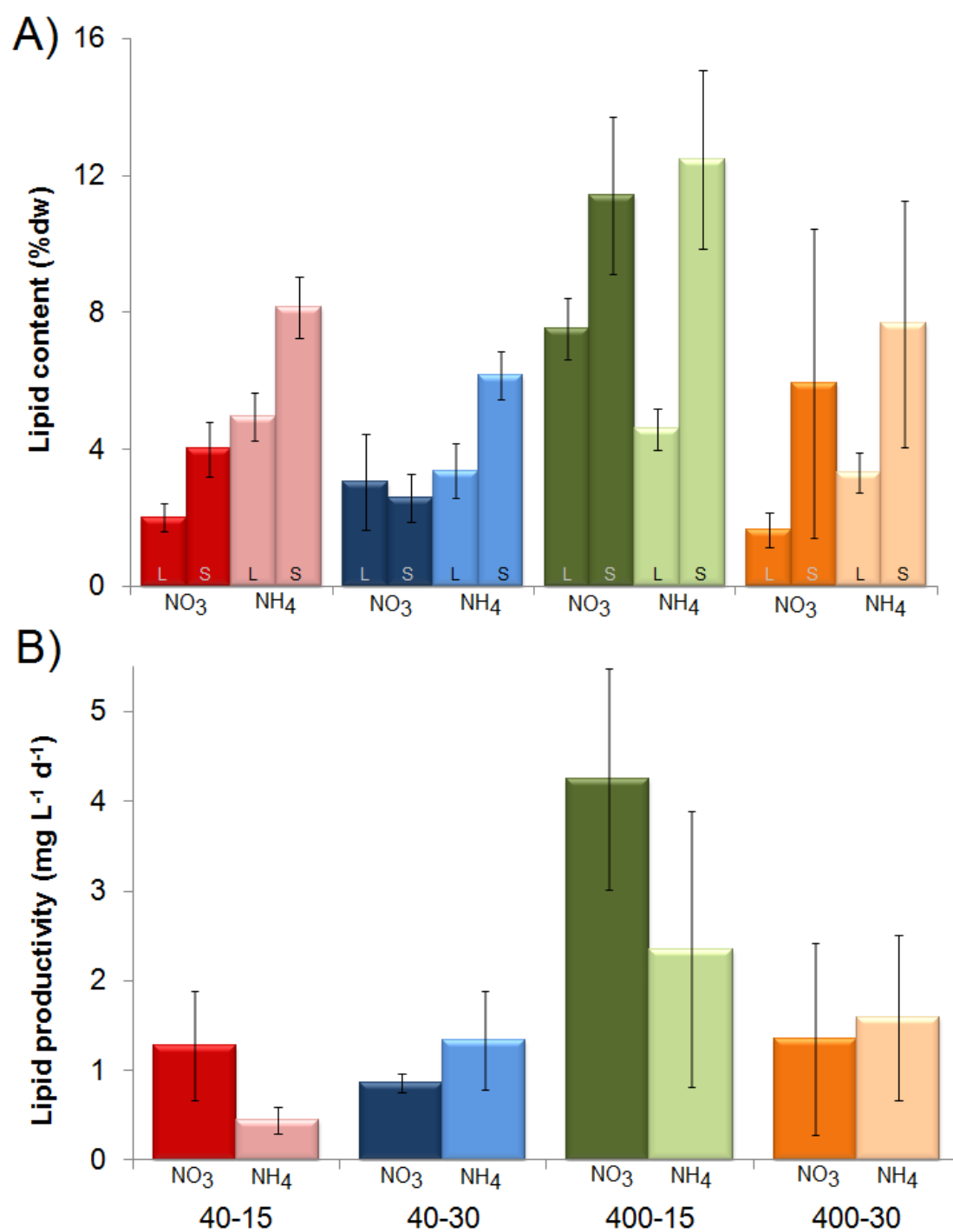


Figure 2. Lipid content (A) (% dry weight) and productivity (B) (mg L⁻¹ d⁻¹) from *Nannochloropsis oculata* culture in different treatments: Light (40 and 400 μmol photons m⁻²s⁻¹), temperature (15 and 30 °C), nitrogen source (NO₃ and NH₄) and the growth phase (L= logarithmic and S = stationary).

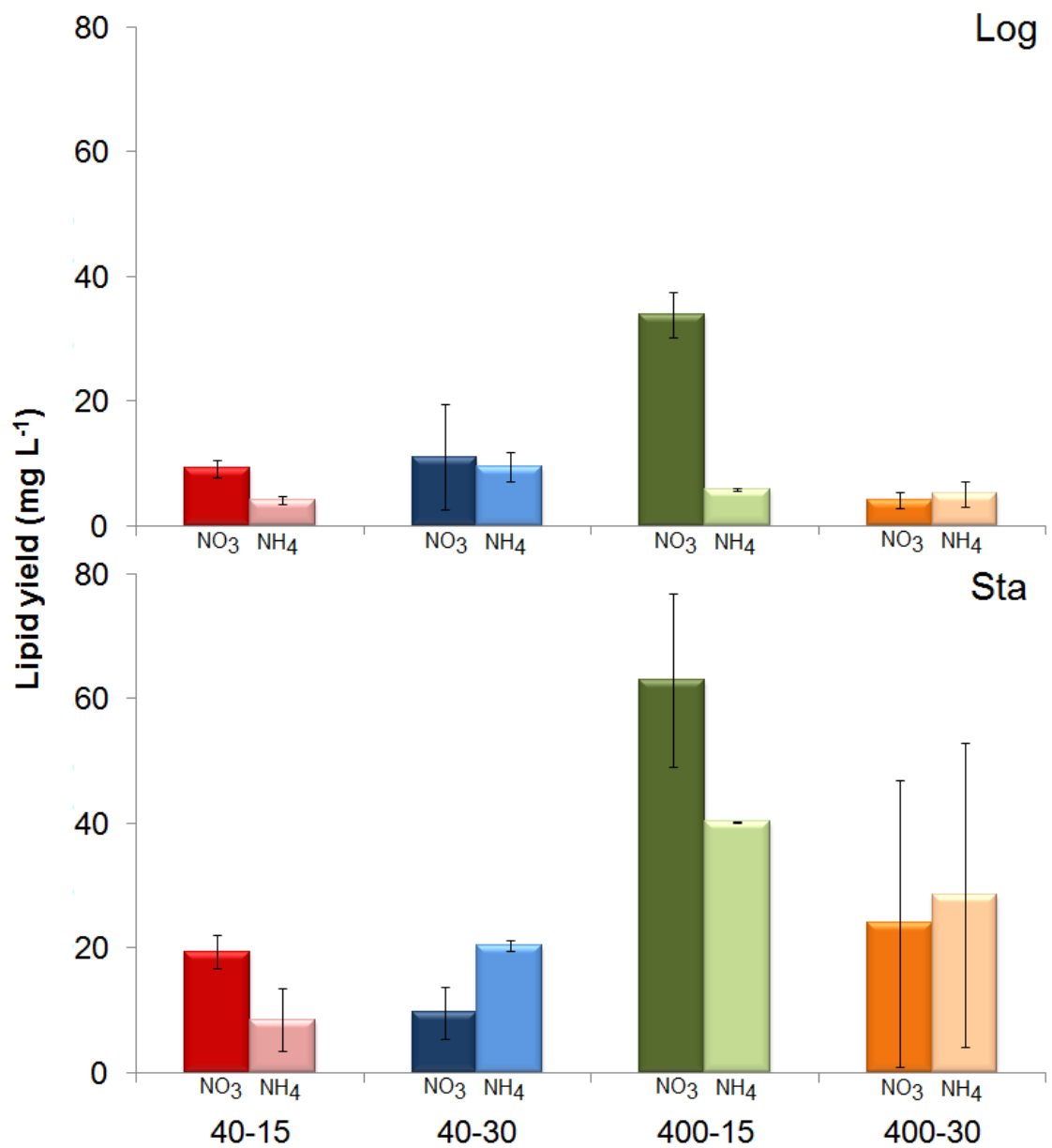


Figure 3. Lipid yield (mg L⁻¹) at LOG phase and Stationary phase of *Nannochloropsis oculata* culture in different treatments: Light (40 and 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperature (15 and 30 °C) and nitrogen source (NO₃ and NH₄).

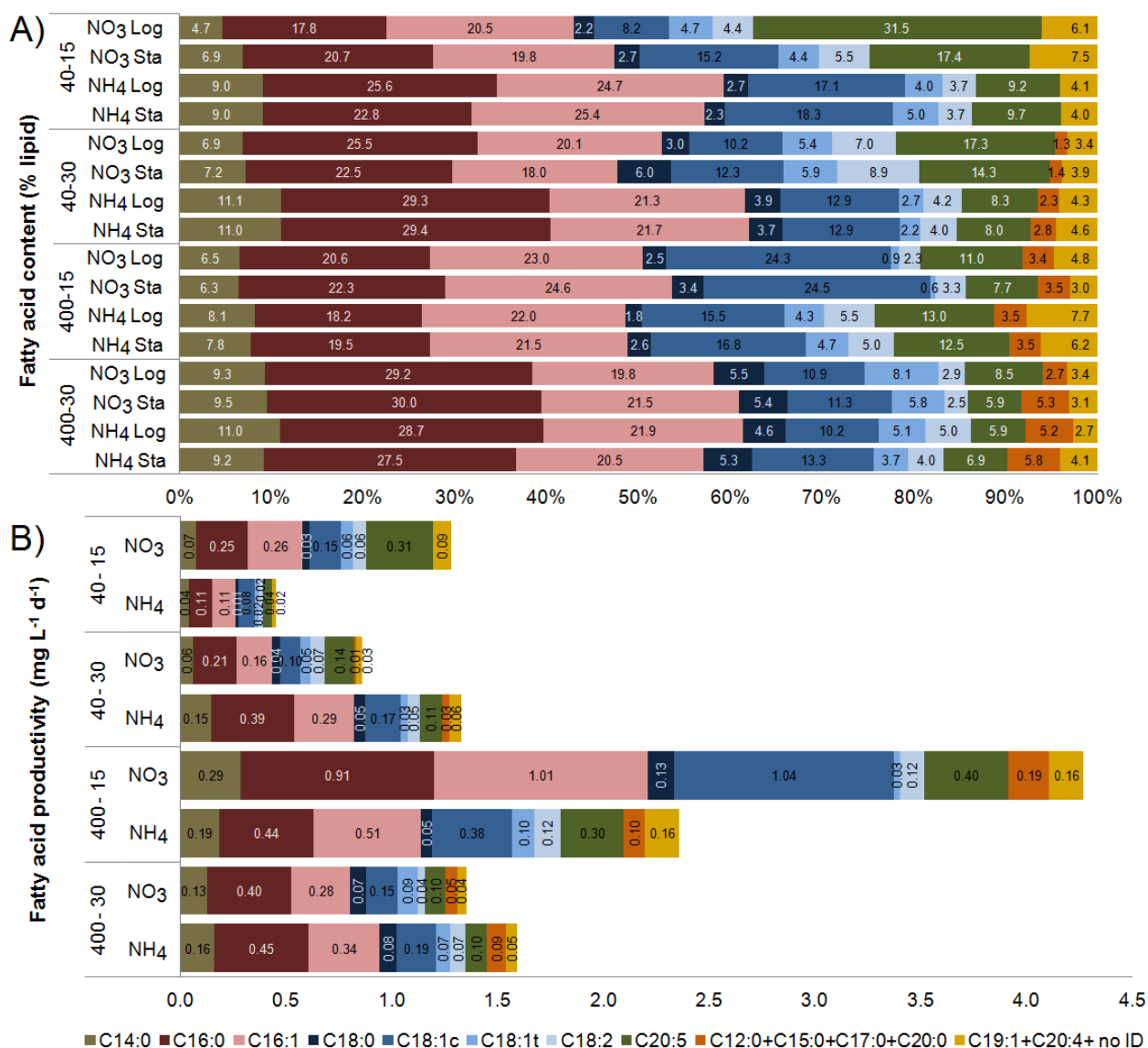


Figure 4: Fatty acid content (A) (% total lipid) and productivity (B) (mg L⁻¹ d⁻¹) of *Nannochloropsis oculata* culture in each treatment. Light (40 and 400 μ mol photons m⁻²s⁻¹), temperature (15 and 30 °C), nitrogen source (NO₃ and NH₄) and the growth phase (logarithmic and stationary).

CAPITULO 3

CONTEÚDO E PRODUTIVIDADE DE LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS DE *THALASSIOSIRA WEISSFLOGII* (BACILARIOFICEAE) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA, LUMINOSIDADE, FONTE DE NITROGÊNIO E FASE DECRESCIMENTO.

Lucélia Borges^{a,*}, Marcelo G. Montes D'Oca^b, Paulo Cesar Abreu^c.

^a Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brasil.

^b Escola de Química e Alimentos, Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brasil.

^c Instituto de Oceanografia, Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos, Universidade Federal do Rio Grande RS, Brasil.

*Autor para correspondência: Tel.:+55 5332336509; Fax:+55 5332336601.

Av. Itália Km Campus Carreiros. Caixa Postal 474 - Rio Grande/RS – Brasil.

E-mail: lu.fito@gmail.com

RESUMO

Diferentes condições de iluminação (40 e 400 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura (15 e 30°C), fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+) e fase de crescimento (logarítmica e estacionária) foram testadas em cultivos batelada de *Thalassiosira weissflogii*. O objetivo foi analisar o efeito simultâneo dessas variáveis no crescimento, na produção e conteúdo de lipídios e de ácidos graxos desta microalga. O maior crescimento de *T. weissflogii* ocorreu no tratamento com 400 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz, 15° C e com nitrato. O conteúdo lipídico foi mais alto nos tratamentos com maior luminosidade e menor temperatura, independente da fonte de Nitrogênio. Maiores conteúdos de lipídio ocorreram na fase estacionaria apenas dos tratamentos com 15°C. Em

luz alta e com NO_3^+ a produtividade e o rendimento dos lipídios foi significativamente maior. Os ácidos graxos predominantes foram C14:0, C16:0, C16:1, C18:1 e C20:5. As maiores proporções de AGs insaturados ocorreram em condições com menor luminosidade e temperatura, já os saturados foram mais abundantes em maior temperatura. A produção de EPA foi favorecida com o uso de nitrato e o conteúdo de DHA foi mais alto nos cultivos com amônio. Os resultados deste estudo demonstram que o rendimento de lipídio e ácidos graxos é mais dependente do aumento da abundância celular, do que do incremento de lipídio por célula.

Palavras chave: microalga, diatomácea, PUFA, biodiesel, sinergismo.

INTRODUÇÃO

As microalgas compõem um grupo heterogêneo de organismos unicelulares, microscópicos, clorofilados (Olaizola 2003) e desempenham um papel vital para o planeta, sendo a base da maioria das cadeias alimentares aquáticas e responsáveis por 45% da produtividade global (Field et al. 1998). Microalgas são mais eficientes que plantas terrestres, uma vez que podem converter CO_2 em biomassa em taxas maiores do que os vegetais superiores (Kumar et al. 2010). Quando comparadas a outros organismos fotossintetizantes, as microalgas marinhas apresentam a vantagem de crescer em água salgada ou salobra, que não pode ser usada na agricultura. Desta forma, seu cultivo pode ser uma alternativa para minimizar o aumento do efeito estufa, seja pela captação do dióxido de carbono atmosférico durante seu

crescimento (Borges et al. 2007), ou pela possível produção de biocombustíveis renováveis (Chisti 2007).

Além das altas taxas de crescimento, a rica composição bioquímica faz com que o cultivo destes microorganismos possa ser utilizado na produção de vários produtos de alto valor comercial. Metabólitos produzidos por várias espécies de microalgas já são utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e nutrição animal (Spolaore et al. 2006). Entre estes, os lipídios e ácidos graxos tem grande interesse econômico, devido não só ao seu uso nutricional, mas também como potencial fonte de biocombustível (Chisti 2007).

A maioria dos trabalhos que analisaram o cultivo de microalgas para a produção de biodiesel considerou, principalmente, as taxas de crescimento e o conteúdo lipídico das diferentes espécies (Griffiths e Harrison 2009). Porém, outras características precisam ser levadas em consideração, como o comprimento da cadeia e nível de saturação dos ácidos graxos, o que pode influenciar na qualidade do biodiesel produzido.

As microalgas produzem ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de grande interesse como os ômega-3, eicosapentaenóico (EPA – C20:5) e docosahexaenóico (DHA – C22:6), e os ômega-6 linoléico (C18:2) e aracdônico (AA – C20:4), (Vargas et al. 1998; Patil et al. 2007). Estes ácidos graxos são pouco abundantes na natureza e, ao mesmo tempo, essenciais para o metabolismo de diversos animais (Lourenço 2006), sendo as microalgas marinhas as maiores produtoras de EPA e DHA (Patil et al. 2007).

Sob condições ótimas de cultivo, microalgas sintetizam ácidos graxos principalmente para formação dos lipídios de membrana (polares), os quais constituem de 5-10% do seu peso seco (Hu et al. 2008) e são formados principalmente por ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (Thompson Jr. 1996). Quando em situações desfavoráveis ao crescimento, as microalgas geralmente alteram suas vias sintéticas em direção a formação e acúmulo de lipídios apolares, como substância de reserva.

Uma deficiência de nutrientes causa um contínuo decréscimo nas taxas de crescimento. Entretanto, sob estas circunstâncias, muitas espécies de microalgas continuam sintetizando ácidos graxos ativamente (Thompson Jr. 1996), e a sua não utilização na formação de lipídeos de membrana, levaria ao acúmulo de lipídeos de reserva (triglicerídeos) (Guschina e Harwood 2009). Assim, o conteúdo dos ácidos graxos das microalgas e a transformação destes em triglicerídeos dependem, não somente das espécies, mas também das condições de cultura, incluindo composição do meio, aeração, intensidade luminosa, temperatura e idade da cultura (Dunstan et al. 1993; Guschina e Harwood 2009).

A diatomácea *Thalassiosira weissflogii* (*T. fluviatilis*), é apresenta característica eurialina (Radchenko e Il'yash 2006) e alta taxa de fixação de carbono, assim como uma ótima eficiência fotossintética (Borges et al. 2007). É usada na aquicultura como fonte de alimento para larvas de camarões peneídeos (Jensen et al. 2006; Silva et al. 2009; Kiatmetha et al. 2010), e seu conteúdo lipídico vem sendo analisado, principalmente como fonte de ácidos

graxos para copépodes (Cowie e Hedges 1996; Støttrup et al. 1999; Breteler et al. 2005).

Araujo et al. (2011) analisaram seu potencial para produção de óleo e biomassa em diferentes salinidades. Ishida et al. (2000) analisaram o efeito da adição de CO₂ na composição dos ácidos graxos e Derner (2006) a influência de diferentes fontes de carbono no crescimento e perfil bioquímico desta espécie. Shifrin e Chisholm (1981) estudaram as diferenças e efeitos da limitação de nitrogênio e sílica no seu conteúdo de lipídios.

Entretanto, ainda se conhece pouco sobre a influência da variação de diferentes fatores abióticos atuando simultaneamente sobre na produção de lipídios e no perfil de ácidos graxos de *T. weissflogii*.

O objetivo deste trabalho foi determinar as interações entre diferentes níveis de intensidade luminosa, temperatura, fonte de nitrogênio e fase de crescimento que favorecem a produção de lipídios e ácidos graxos em *T. weissflogii*.

MATERIAL E MÉTODOS

A cepa de *Thalassiosira weissflogii* (THAL WEIS-1) (Bacillariophyceae) analisada faz parte da Coleção de microalgas do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG e é mantida em meio f/2 (Guillard 1975), salinidade 28, temperatura 20 °C, intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo 12:12 horas (claro/escuro).

O conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos foram determinados em 16 tratamentos com duas réplicas cada. Os tratamentos envolviam diferentes condições de intensidade luminosa (40 e 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperatura (15 e 30°C), fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+) e fase de cultivo (logarítmica e estacionária) como apresentado na Tabela 1.

O meio utilizado foi f/2 (Guillard 1975) com nitrogênio na concentração final de $8.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ (1mL L^{-1} de soluções estoque com 75g L^{-1} de NaNO_3 e 47.1g L^{-1} em NH_4Cl). Condições de luz e temperatura foram mantidas em câmara de germinação (347-CDG Fanem).

O volume das culturas foi aumentado, em cultivos tipo batelada, de 250 mL até a obtenção de 5 litros para cada réplica de cada tratamento. O acompanhamento do crescimento dos cultivos aclimatados foi feito a partir da coleta de amostra, retirada periodicamente e aproximadamente no mesmo horário, para medida da clorofila (fluorescência *in vivo*), em fluorímetro calibrado Turner modelo TD-700. As leituras de fluorescência foram convertidas a Clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$) pela equação

$$y = 7.2365x - 164.92 \quad (R^2 = 0.99) \quad \text{eq. 1}$$

previamente determinada, onde y é a concentração de Clorofila a e x a leitura de fluorescência *in vivo*. Esses resultados foram convertidos a peso seco considerando que Clorofila a representa 1% do peso seco (Reynolds 2006). O rendimento de *T. weissflogii* em cada tratamento foi calculado pela equação

$$Y = \Delta x / \Delta t \quad \text{eq. 2}$$

onde Δx = peso seco final – peso seco inicial e Δt = tempo final - inicial (Wood et al. 2005).

Assim que os cultivos alcançaram a fase LOG, após 4 dias (30° C) e 5 dias (15° C) aproximadamente 2.5 L foram coletados e as células concentradas por variação de pH conforme Borges et al. (2011). Os 2.5L restantes permaneceram na câmara germinadora até alcançarem a fase estacionária (9 dias - 30 °C; 10 dias -15 °C), quando foram então concentrados da mesma forma.

A biomassa concentrada foi mantida a 60 °C em estufa por 24 horas e após a secagem foi armazenada em refrigerador até a extração dos lipídios.

Extração e quantificação dos lipídios

Os lipídios foram extraídos usando o método adaptado Bligh e Dyer (1959) (D'Oca et al., 2011). A biomassa seca (0.5 g) foi colocada em tubo de ensaio (três réplicas) com 1.5 mL de uma mistura 2:1 de clorofórmio:metanol. A solução foi sonificada em um banho de ultrasom (Unique UltraCleaner model 1400A – 40kHz; 120W) por 20 minutos. Após a mistura foi centrifugada por três minutos a 50 Hz. A extração foi repetida por três vezes para cada tubo. A fase líquida foi transferida para frascos previamente pesados. O solvente foi evaporado a vácuo em rotaevaporador.

As amostras foram então levadas à estufa para completa evaporação do solvente, e após esfriarem foram pesados novamente. A fração lipídica total foi calculada pela diferença gravimétrica.

Determinação do perfil de ácidos graxos

Os lipídios foram esterificados com base no método descrito por Metcalfe e Schmidt (1961) e o perfil de ácidos graxos foi caracterizado por cromatografia gasosa (GC) com detecção por espectrometria de massas (MS).

As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico GCMS-QP2010Plus (Shimadzu) equipado com um injetor split/splitless junto ao detector de massas. A temperatura de operação do detector foi: 280 °C interface e 230 °C fonte. Detecção usando um scan completo de m/z 30 a m/z 500 com um tempo de scan de 0.20 segundos foi realizada. O modo de ionização usado foi impacto de elétrons a 70 eV. As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes: injetor, 250 °C; coluna, 80 °C (temperatura inicial, 0 min), seguida pelo gradiente de 10 °C/min a 180 °C e então 7 °C/min até uma temperatura final de 330 °C; fluxo do gás, 1.3 mL/min; pressão, 88.5 kPa; velocidade média linear, 42 cm/s; e volume de injeção de 1 mL com uma “razão de split” de 1:100. Foi usado um Crossbond 5% Dimetil polissiloxano difenil 95% coluna (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m Restek). Os metil ésteres dos ácidos graxos foram identificados pela comparação com padrões conhecidos e quantificados pelo método de padronização das áreas.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) comparando os tratamentos com nível de significâncias de $\alpha = 0.05$. O teste de múltiplas comparações post-hoc Tukey ($\alpha = 0.05$) foi aplicado para conteúdo e produtividade de lipídios e ácidos graxos (Zar, 1996).

RESULTADOS

O maior rendimento de *Thalassiosira weissflogii* ocorreu no tratamento com luz 400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura 15° C e nitrato como fonte de nitrogênio (Fig. 1; Tab. 2). Já o menor crescimento ocorreu no tratamento com 40 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 30° C e amônio (Tab. 2). De maneira geral, os tratamentos com maior luminosidade e com nitrato apresentaram maior aumento de biomassa da microalga (Tab. 2).

A porcentagem de lipídios em relação ao peso seco em *T. weissflogii* variou de 1.0% $\pm$ 0.2 a 4.7% $\pm$ 0.9 (Fig. 2a). Os maiores valores de lipídio ocorreram nos tratamentos com maior intensidade luminosa (400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Observe-se que os maiores conteúdos de lipídio só aconteceram na fase estacionária nos tratamentos com temperatura de 15° C, independente da intensidade luminosa e fonte de nitrogênio (Fig. 2a; Tab. 3).

A produtividade dos lipídios, que leva em consideração o aumento do número de células e o conteúdo celular deste elemento, foi maior nos tratamentos com maior luminosidade e tendo nitrato como fonte de nitrogênio. Entretanto, os tratamentos com 40 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e nitrato, e com 400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e amônio também apresentaram elevada produtividade (Fig. 2b; Tab. 3).

O rendimento de lipídio seguiu os mesmos padrões da produtividade, i.e., maiores valores foram obtidos ao final do experimento nos tratamentos com maior luminosidade e nitrato (Fig. 3).

Os ácidos graxos mais produzidos por *T. weissflogii* foram o C14:0, C16:0, C16:1, C18:1t, e C20:5 (Fig. 4a).

De maneira geral houve um aumento dos ácidos graxos saturados com o aumento da temperatura, sendo este efeito maior para os tratamentos mantidos em baixa luminosidade (Fig. 3; Tab. 3). Ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Fig. 4a) ocorreram em maiores proporções na maior temperatura, enquanto que os ácidos graxos poli-insaturados C16:3, C20:5 e C22:6 ocorreram em maiores proporções na temperatura de 15° C.

A proporção dos insaturados C18:1c e C18:2 foi significativamente maior na fase logarítmica do tratamento 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 15 °C e nitrato (Fig. 4a). Já na C18:0 foi significativamente maior na fase estacionária dos tratamentos (Tab 3).

O conteúdo dos ácidos graxos insaturados C16:3, C18:1c e C20:5 foi maior em baixa intensidade luminosa. A alta luminosidade, por outro lado, aumentou a quantidade de C16:1 e C18:1t (Tab. 3). O uso de nitrato aumentou as concentrações de C18:1c e C18:2. Já com amônio foram maiores os valores percentuais de C14:0 e C22:6.

A produtividade dos ácidos graxos seguiu o mesmo padrão da produtividade de lipídio, com maiores valores nos tratamentos com maior luminosidade (Fig. 4b; Tab. 3). Entretanto, alguns tratamentos que não alcançaram a maior produtividade de lipídios obtiveram a maior produtividade de ácidos graxos específicos. Em 40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 15 °C e nitrato, C18:2 foi mais produtivo. Em 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 30 °C e nitrato ocorreram altas produtividades de C14:0 e C20:5 (Fig. 4b).

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, *Thalassiosira weissflogii* apresentou um maior rendimento quando cultivada em intensidade luminosa mais alta. Apesar de em estudo prévio ter apresentado um melhor crescimento em intensidade luminosa mais baixa (Borges et al. 2007). Portanto, talvez as células de *T. weissflogii* nos tratamentos com maior intensidade luminosa estivessem fotorespirando, ou produzindo lipídios como uma forma de balancear o excesso energético decorrente da alta luminosidade (Hu 2004).

O maior crescimento celular observado em tratamentos com nitrato também pode estar relacionado ao excesso de energia luminosa. Segundo Lomas e Glibert (1999) o uso de nitrato poderia permitir uma maior dissipação energética, uma vez que este nutriente pode funcionar como um acceptor final de elétrons. Da mesma forma, a maior concentração de lipídio em células expostas a maior quantidade de luz pode também representar uma tentativa de equilíbrio energético, uma vez que a produção de lipídeo consome mais NADPH do que o necessário para a síntese de carboidratos ou proteína (Hu et al. 2008).

Por outro lado, chama a atenção o fato de que nos tratamentos com maior temperatura não houve maior acúmulo de lipídio na fase estacionária de crescimento. Geralmente o meio em culturas que atingiram a fase estacionária mostra uma deficiência de nutrientes e, por causa disso, um aumento de lipídio (Guschina e Harwood 2009). Entretanto, o efeito dessa limitação de nutrientes em diatomáceas não é tão generalizado quanto para outros grupos (Shifrin e Chisholm 1981). Uma vez que, mesmo em privação de nutrientes as

microalgas continuam realizando fotossíntese o fluxo de carbono é desviado de proteínas para lipídios e carboidratos, sendo que carboidratos podem ser acumulados sem redução na produtividade da biomassa, enquanto que acumulação de lipídios é frequentemente associada à diminuição na produtividade (Rodolfi et al. 2008). Entretanto, as diatomáceas apresentam uma fase logarítmica rica em lipídios e nem sempre respondem à limitação de nutrientes com o aumento desse composto. Ao invés disso, algumas espécies de diatomáceas acumulam carboidratos nessa situação (Shifrin e Chisholm 1981; Harrison et al. 1990).

Portanto, uma possível explicação para a diminuição de lipídios na fase estacionária de *T. weissflogii* em alta temperatura pode ser a acumulação de carboidratos ao invés de lipídios.

A intensidade luminosa é outra variável que afeta a composição dos lipídios (Hu et al. 2008) e, uma vez que atua no crescimento e na atividade fotossintética, o conteúdo total de lipídios refletirá tais mudanças ambientais (Guschina e Harwood 2009). Em nosso estudo, a produtividade de lipídio foi bastante influenciada pela alta luminosidade e pela presença de nitrato. A produtividade leva em conta tanto a concentração de lipídios no interior das células quanto a biomassa produzida por elas, portanto, é um útil indicador da produção de lipídios para fins comerciais (Brennan e Owende 2010). No geral, as melhores produtoras de lipídios são as cepas que mostram a melhor combinação de produtividade de biomassa e conteúdo de lipídios (Rodolfi et al. 2008)

Nos nossos resultados verificou-se que altos rendimentos de lipídios resultaram da alta produtividade nos tratamentos em que a produtividade da biomassa também foi alta. Apesar de alguns tratamentos terem apresentado bom crescimento (40 - 30) ou alto conteúdo lipídico (400 - NH_4^+) quando se estimou a produtividade, os valores não foram tão altos. Por outro lado, o tratamento 400-15 nitrato foi o mais produtivo porque apresentou não só alto conteúdo de lipídios, mas, principalmente, alta produtividade de biomassa.

Assim, analisar o conteúdo de lipídios sem informar o crescimento ou a produtividade da biomassa não possibilita uma boa seleção para produção de lipídios, uma vez que espécies com rápido crescimento podem apresentar melhor produtividade de lipídios do que aquelas com alto percentual de lipídios por célula (Griffiths e Harrison 2009).

Geralmente a temperatura possui um papel maior na composição dos lipídios produzidos pelas microalgas do que na quantidade, devido a relação desses com a fluidez e estabilidade das membranas (Harwood e Guschina 2009), e a concentração de lipídios em diferentes temperaturas é uma resposta espécie-específica (Guschina e Harwood 2009).

Os ácidos graxos produzidos em maior quantidade por *T. weissflogii* foram C14:0, C16:0, C16:1, C18:1 e C20:5, resultado semelhante aos encontrados em outros estudos (Ishida et al. 2000; Breteler et al. 2005; Derner 2006; Kiatmetha et al. 2010; Borges et al. 2011). Assim como para a maioria das microalgas (Harwood e Guschina 2009), também se verificou neste estudo que o palmitato (C16:0) foi o ácido graxo saturado mais abundante, enquanto o

ácido palmitoleico (C16:1) foi o monosaturado encontrado em maior quantidade.

Na fase logarítmica dos cultivos com luz e temperatura mais baixas, foram encontradas as maiores concentrações de ácidos graxos insaturados, com predominância de C18:2 e C18:1c, já a fase estacionária C18:0 apresentou maiores valores. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que na fase logarítmica as microalgas investem suas energias na produção de nova biomassa. Sendo assim, precisam sintetizar os lipídios de membrana, ricos em ácidos graxos insaturados. Já na fase estacionária, quando ocorreu a diminuição dos nutrientes do meio, as células armazenam energia na forma de triglicerídeos, ricos em ácidos graxos saturados. O ácido linoleico (C18:2) é conhecido por ser um ácido graxo essencial, ou seja, apesar de ser primordial para manter os animais em condições saudáveis ele não pode ser sintetizado por eles, devendo ser suprimido pela dieta (Gurr et al. 2002).

A temperatura mais baixa aumentou a produção dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) C16:3, C20:5 e C22:6. De maneira geral, baixa temperatura leva a um aumento significativo da quantidade de EPA e DHA na maioria das microalgas (Gushina e Harwood 2009). Em microalgas crescendo em temperatura abaixo do ótimo, geralmente ocorre um aumento da insaturação dos ácidos graxos, isso garante a estabilidade e fluidez dos lipídios de membrana, já a temperatura mais alta favoreceu a saturação (Hu 2004). Os lipídios de membrana podem existir na forma gel ou líquida dependendo da temperatura, e a temperatura de transição entre uma fase e outra depende da composição dos ácidos graxos que formam esses lipídios (Gurr et al. 2002).

Além da baixa temperatura, a baixa intensidade luminosa também favoreceu a produção de PUFA's (C16:3, C18:2 e C20:5), enquanto que na luz alta aumentaram as quantidades de C16:1 e C18:1t. Em baixa intensidade luminosa o EPA garante a fluidez da membrana do tilacóide e assim a velocidade do fluxo elétron fazendo com que a fotossíntese, nessa condição, seja mais eficiente (Guschina e Harwood 2009). Geralmente, baixas intensidades favorecem a produção de ácidos graxos insaturados que são incorporados principalmente às membranas celulares (Fábregas et al. 2004), enquanto que em altas intensidades luminosas há um aumento de lipídios saturados e monosaturados, formadores de lipídios neutros (Hu et al. 2008).

Em resumo, os resultados deste estudo demonstram que as melhores condições para a maior produtividade de lipídios em *T. weissflogii* foram intensidade luminosa de 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e usando NO_3 . É importante ressaltar que estas condições propiciaram, principalmente, uma maior produção celular de *Thalassiosira weissflogii*, mais do que um aumento do conteúdo de lipídio celular e este aumento de biomassa gerou uma maior produção e rendimento de lipídio.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sergiane Caldas pela ajuda com as análises cromatográficas. Lucélia Borges foi financiada pela “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES”. Marcelo D'Oca e Paulo Abreu são bolsistas de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERENCIAS

- Araujo G.S., Matos L.J.B.L., Gonçalves L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L. 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technol* 102 (8) 5248-50.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37, 911-17.
- Borges L., Faria, B.M., Odebrecht, C., Abreu, P.C. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de desenvolvimento limpo”. *Atlântica* 29: 35-46.
- Borges L., Morón-Villarreyes J., D’Oca M.G.M., Abreu, P.C. 2011. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*, *Biomass Bioenerg* 35 (10) 4449 – 54.
- Brennan, L. , Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev* 14: 557-77.
- Breteler, W.C.M.K., Schogt, N., Rampen, S. 2005. Effect of diatom nutrient limitation on copepod development : role of essential lipids. *Mar Ecol Prog Ser* 291: 125-33.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biomass* 25, 294-306.
- Cowie, G.L., Hedges J.I. 1996. Digestion and alteration of the biochemical constituents of a diatom (*Thalassiosira weissflogii*) ingested by an

- herbivorous zooplankton (*Calanus paczfkxs*). Limnol. Ocenogr. 41:(4) 581:94.
- D'Oca, M.G.M., Viêgas, C.V., Lemões, J.S., Miyasaki, E.K., Morón-Villarreyes, J. A; Primel, E.G.; Abreu, P.C. 2011. Production of FAMES from Several Microalgal Lipidic Extracts and Direct Transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. Biomass Bioenerg. 35,1533-38
- Derner, R.B. 2006. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Florianópolis, 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrrt S.M., Leroi J.M., Jeffrey S.V. 1993. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatoms (Bacillariophyceae). Phytochemistry 35 (1):155–61.
- Fábregas J., Maseda, A., Dominguez, A., Otero, A. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semi-continuous culture. World J Microb Biot 20(1): 31-35.
- Field, C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T. Falkowski P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. Science 281: 237-40.
- Griffiths, M.J., Harrison S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. J Appl Phycol 21:493-507.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates,

- in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds). Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, pp. 26-60.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N. 2002. Lipid Biochemistry: an introduction. 5th ed. Blackwell Science, Oxford.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2009. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry in: Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (eds) Lipids in aquatic ecosystems. Springer New York. p. 1-24.
- Harrison, P.J., Thompson, P.A., Calderwood, G.S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J Appl Phycol 2: 45-56.
- Harwood, J.L., Guschina, I.A. 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. Biochimie 91: 679-684.
- Hu, H. 2004. Environmental effects on cell composition in: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell. p.97–115.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. Plant J 54(4), 621-39.
- Ishida, Y., Hiragushi, N., Kitaguchi, H., Mitsutani, A., Nagai, S., Yoshimura, M. A. 2000. Highly CO₂ tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. Fisheries Sci 66: 655-59.
- Jensen, L.V., Wasielesky, W.J., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Santos, M.S. 2006. Role of microalgae *Thalassiosira fluviatilis* in weight gain and survival of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* reared in indoor nursery tanks.

Nauplius 14 (1) 37-42.

- Kiatmetha, P., Siangdang, W., Bunnag, B., Senapin, S., B., Withyachumnarnkul
2010. Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*.
Aquacult Int 19 599-609.
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Xavier Malcata,
F., van Langenhove, H. 2010. Enhanced CO₂ fixation and biofuel
production via microalgae: recent developments and future directions.
Trends Biotechnol 28 (7): 371-80.
- Lomas, M.W., Glibert, P.M. 1999. Temperature regulation of nitrate uptake: A
novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms.
Limnol. Oceanogr, 44(3) 556–572.
- Lourenço, S. O. 2006. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações.
São Carlos, RiMa, 588P.
- Metcalf, L., Schmitz, A. 1961. The Rapid Preparation of fatty acids esters for
gas chromatographic analysis. Anal Chem 33(3), 363.
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from
the test tube to the marketplace. Biomol. Eng 20: 459-66.
- Patil, V., Källqvist, T. Olsen, E. Vogt, G. Gislerod, H.R. 2007. Fatty acid
composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquacult
Int 15: 1-9.
- Radchenko, I.G., Il'yash, L.V. 2006. Growth and photosynthetic activity of
diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. Biol Bull 33 (3): 3
242-47.

- Reynolds, C. 2006. Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2008. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102 (1): 100-112.
- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W. 1981. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol* 17: 374-384.
- Silva, B.C., Andre, R.C., Belettini, F., Buglione, C.C., Jatobá, A., Vieira, F.N., Andreatta, E.R., Derner, R.B. 2009. Utilização de *Thalassiosira weissflogii* em larvicultura de *Litopenaeus vannamei*. *Atlântica* 31(1) 39-50.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan C, Duran E and Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101 (2) 87-96.
- Støttrup, J.G., Bell J.G., Sargent J.R. 1999. The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, in response to different algal diets. *Aquaculture* 176: 257-69.
- Thompson Jr., G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim Biophys Acta* 1302: 17-45.
- Vargas, M. A., Rodriguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J Phycol* 34(5), 812-17.
- Wood, A.M., Everroad, R.C., Wingard, L.M. 2005. Measuring growth rates in

microalgal cultures in: Andersen, R.A. (ed) *Algal culturing techniques*.

Elsevier Oxford. pp 269-285

Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

Tabela 1: Desenho experimental.

Luz	Temperatura	Fonte de nitrogênio	Fase de crescimento
40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	15 °C	NO_3^-	Log.
			Est.
		NH_4^+	Log.
			Est.
	30 °C	NO_3^-	Log.
			Est.
		NH_4^+	Log.
			Est.

Tabela 2: Rendimento do crescimento ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) de *Thalassiosira weissflogii* nos diferentes tratamentos. Luz (40 e 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura (15 e 30 °C) e fonte de nitrog\^enio (NO_3^- e NH_4^+).

	40 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$		400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$	
	15° C	30° C	15° C	30° C
NO_3^-	16.40	33.65	40.01	32.94
NH_4^+	11.85	2.50	23.30	29.38

Tabela 3: Resultados estatísticos. GL = graus de liberdade, T = temperatura, L = luz, N = fonte de nitrogênio, F = fase de crescimento.

		Conteúdo				Produtividade			
			GL	F	p		GL	F	p
	Lipídios	Intercept	1	1537.29	<0.0001	Intercept	1	453.29	<0.0001
		T*L	1	22.96	<0.0001	L*N	1	42.82	<0.0001
		T*F	1	90.93	<0.0001				
		Error	80			Error	88		
Ácidos Graxos	C14:0	Intercept	1	694.85	<0.0001	Intercept	1	375.61	<0.0001
		N	1	8.12	0.0116	T*N	1	5.82	0.0238
		T*L	1	13.65	0.0020				
		Error	16			Error	24		
	C16:0	Intercept	1	1774.86	<0.0001	Intercept	1	819.06	<0.0001
		T	1	21.25	0.0003	L*N	1	9.48	0.0051
		Error	16			Error	24		
	C16:1	Intercept	1	1080.22	<0.0001	Intercept	1	685.79	<0.0001
		T	1	1.10	0.3099	L*N	1	29.99	<0.0001
		Error	16			Error	24		
	C16:3	Intercept	1	295.57	<0.0001	Intercept	1	92.08	<0.0001
		T*L	1	27.21	0.0001	L	1	15.26	0.0007
		Error	16			Error	24		
	C18:0	Intercept	1	166.70	<0.0001	Intercept	1	161.65	<0.0001
		F	1	9.39	0.0074	T*L*N	1	14.99	0.0007
		Error	16			Error	24		
	C18:1c	Intercept	1	210.41	<0.0001	Intercept	1	248.13	<0.0001
		T*L	1	11.30	0.0040	T*L*N	1	6.55	0.0172
		Error	16			Error	24		
	C18:1t	Intercept	1	462.25	<0.0001	Intercept	1	286.76	<0.0001
		T*L	1	12.82	0.0025	T*L*N	1	35.41	<0.0001
		Error	16			Error	24		
	C20:5	Intercept	1	427.84	<0.0001	Intercept	1	178.44	<0.0001
		T*L	1	15.31	0.0012	L	1	36.72	<0.0001
						N	1	18.34	0.0003
		Error	16			Error	24		
	C22:6	Intercept	1	244.41	<0.0001	Intercept	1	73.23	<0.0001
		T	1	6.10	0.0251	L	1	26.83	<0.0001
		N	1	5.46	0.0328				
		F	1	5.05	0.0392				
		Error	16			Error	24		

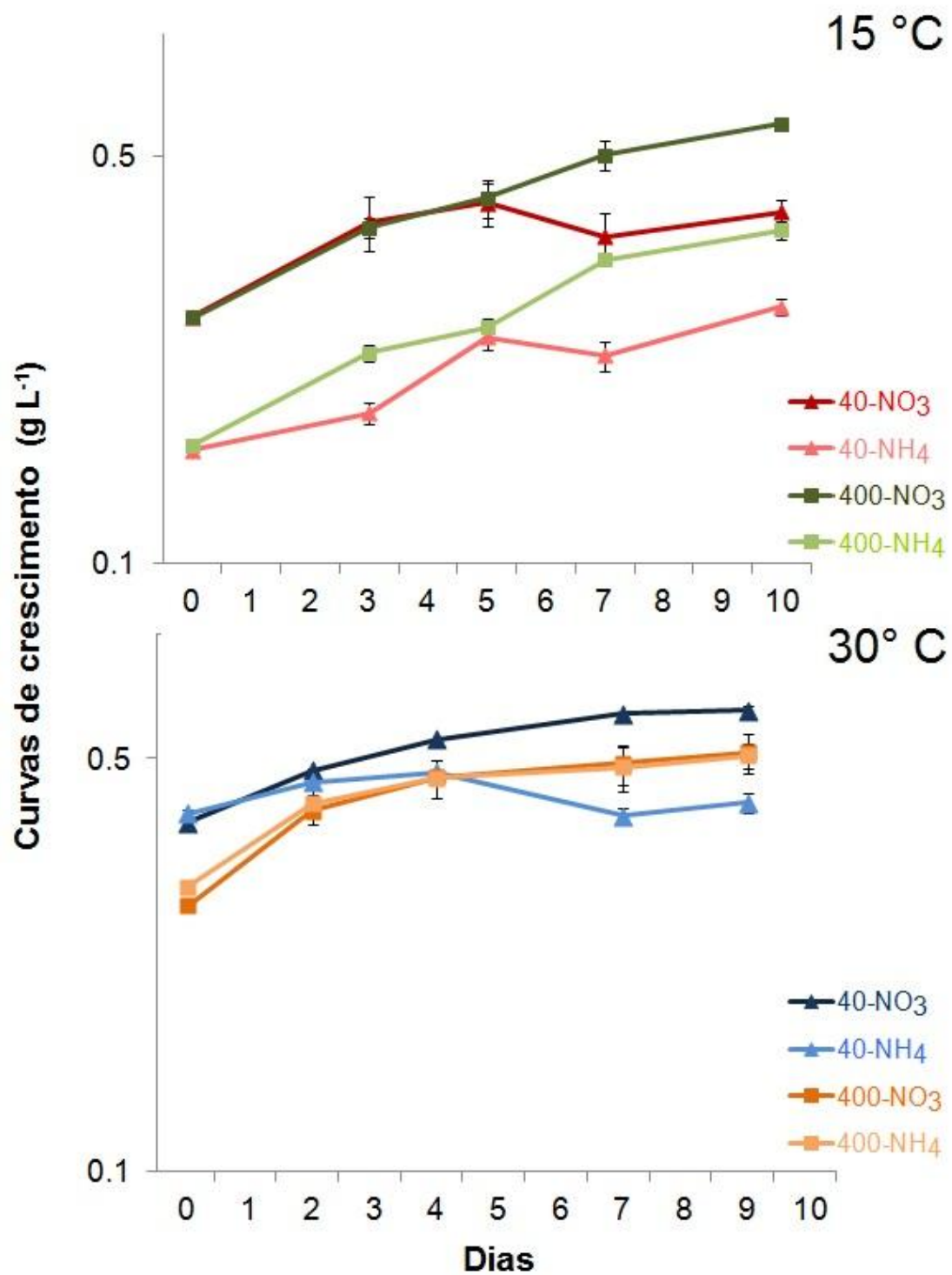


Figura 1. Crescimento em peso seco (g L⁻¹) de *Thalassiosira weissflogii* nas temperaturas de 15 e 30°C. Intensidade luminosa (▲ = 40; ■ = 400 μmol fótons m⁻²s⁻¹) e fonte de nitrogênio (símbolos escuros = NO₃⁻ e símbolos claros = NH₄⁺).

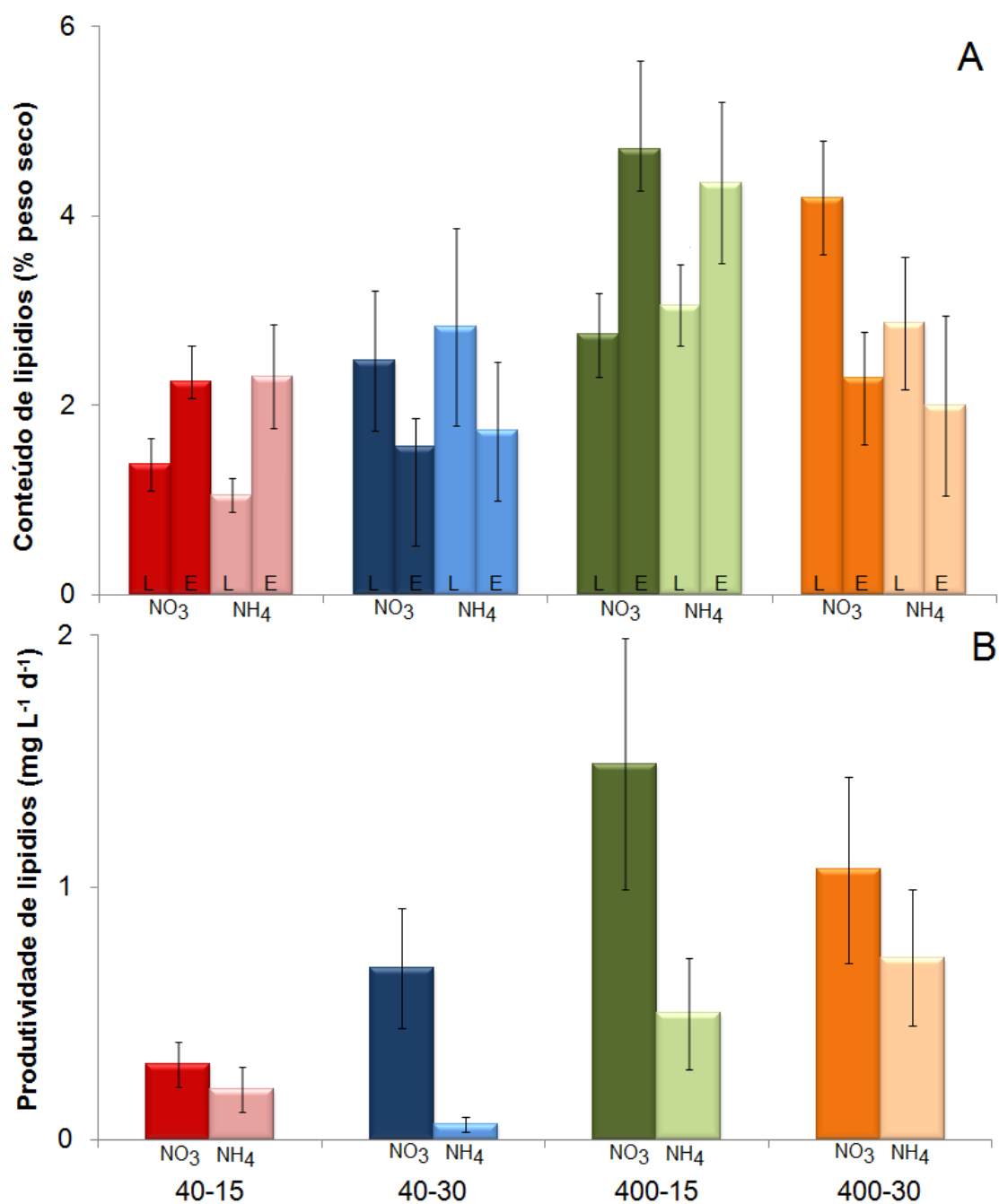


Figura 2. Conteúdo de lipídios (A) (% peso seco) e produtividade (B) (mg L⁻¹ d⁻¹) de *Thalassiosira weissflogii* em cada tratamento. Luz (40 e 400 μmol fótons m⁻²s⁻¹), temperatura (15 e 30 °C), fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺) e fase de crescimento (L= logarítmica e E = estacionária).

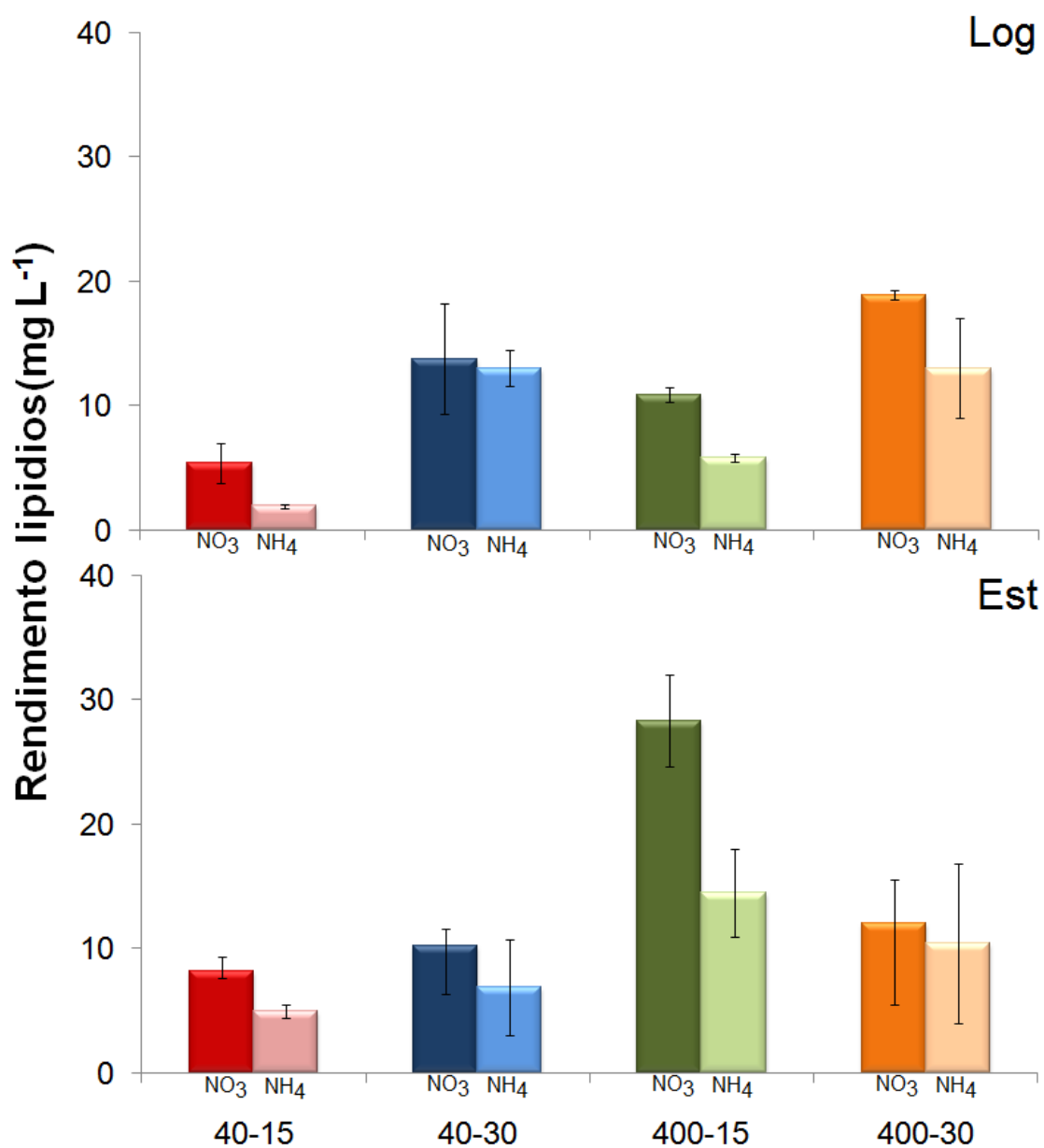


Figura 3. Rendimento dos lipídios (mg L⁻¹) em (A) fase logarítmica e (B) fase estacionária de *Thalassiosira weissflogii* em cada tratamento. Luz (40 e 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura (15 e 30 °C) e fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺).

DISCUSSÃO GERAL

Nos cultivos de microalgas, a colheita da biomassa é considerada atualmente como um gargalo tecnológico na produção de matéria prima para a indústria, principalmente a dos combustíveis renováveis (Chisti 2007; Griffiths e Harrison, 2009). Entre os processos utilizados a floculação parece ser a mais conveniente, e a de menor custo, pois permite recolher grandes volumes de biomassa (Grima et al. 2003). Entretanto, como o objetivo é o aproveitamento dos lipídios e ácidos graxos, é preciso garantir a integridade desses compostos usando um flocculante que não cause impacto no produto final.

Como vimos, o uso de flocculantes pode alterar o perfil dos ácidos graxos, portanto deveria ser evitado especialmente se o objetivo maior é obter ácidos graxos poli-insaturados de cultivos de *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii*, que são duas espécies ricas em ácidos graxos polinsaturados.

As espécies estudadas, apesar de pertencerem a classes distintas, mostram algumas respostas semelhantes frente às variações impostas aos cultivos. Isto talvez se deva a capacidade de adaptação das microalgas a condições ambientais, através da produção de uma variedade de lipídios e ácidos graxos (Thompson Jr. 1996).

O rendimento da biomassa mais alto para *N. oculata* e *T. weissflogii* ocorreu em 15°C de temperatura. *Nannochloropsis* sp. pode se adaptar a um amplo intervalo de temperatura crescendo melhor em temperaturas em torno de 20° C (Hu e Gao 2006). Já *T. weissflogii* apresenta o crescimento relacionado diretamente com o aumento da temperatura (Strzepek e Price

2000). Em nosso estudo, o maior aumento de biomassa de *T. weissflogii* em temperatura mais baixa deve estar relacionado ao maior peso de outros fatores como fonte de nitrogênio e intensidade luminosa.

A intensidade luminosa pareceu afetar significativamente o crescimento de *N. oculata*, e *T. weissflogii*, que alcançaram maiores rendimentos de biomassa em tratamentos com 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Essa resposta é compreensível para *N. oculata*, uma espécie adaptada a intensidades maiores de luz (Borges et al. 2007).

O conteúdo de lipídios em *N. oculata* foi significativamente maior na fase estacionária e luz 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para *T. weissflogii*, o conteúdo foi maior em 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Porém, maiores valores de conteúdo de lipídio na fase estacionária só foram observados nos tratamentos com menor temperatura (15°C). Maior conteúdo na fase estacionária é esperado devido à diminuição dos nutrientes do meio e a redução da divisão celular, havendo então uma canalização da energia fotossintética para a produção de substâncias de reserva (Guschina e Harwood 2009).

A diferença no conteúdo lipídico em cada fase dependendo da temperatura pode ter sido proporcionada por um ganho energético nas células de *T. weissflogii* crescendo em 15° C e um gasto maior nas células em 30°C. Além disso, já foi observado que diatomáceas não apresentam um acúmulo de lipídio na fase estacionária, provavelmente porque seu metabolismo é direcionado para a produção de carboidratos (Shifrin e Chisholm, 1981; Rodolfi et al. 2008).

O conteúdo de lipídio e a composição dos ácidos graxos formados durante as fases de crescimento têm relação direta com a disponibilidade de nutrientes do meio. A produção de lipídios e a composição dos ácidos graxos estão sujeitas a variabilidade durante o ciclo de crescimento (Hu et al. 2008). Células que estão crescendo e se multiplicando não acumulam lipídios e são ricas em ácidos graxos insaturados formadores de membranas (Thompson Jr. 1996). Já as células na fase estacionária estão em meio com uma deficiência de nutrientes o que causa um contínuo decréscimo nas taxas de crescimento. Assim na falta da usual utilização dessas substâncias, isto é, construção de novas membranas, as células convertem os ácidos graxos em triglicerídeos (Thompson Jr. 1996).

A produtividade de lipídios em *N. oculata* e *T. weissflogii* foi maior em 400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 15° C e NO_3 . A produtividade leva em conta tanto a concentração de lipídios no interior das células quanto a biomassa produzida por elas (Brennan e Owende 2010). Assim, cultivar microalgas em condições que aumentam as concentrações de lipídios (estressantes) sem levar em conta o efeito destas condições no crescimento pode levar a uma redução na produção total de lipídio. O aumento do conteúdo e produtividade dos lipídios em alta luz já havia sido relatado para *N. oculata* (Su et al. 2011; Pal et al. 2011). Griffiths e Harrison (2009) observaram uma relação direta entre a produtividade de lipídio e produtividade de biomassa para várias espécies de microalgas, destacando que as que apresentaram os maiores conteúdos de lipídio não eram as maiores produtoras deste elemento devido às baixas taxas de crescimento.

Os ácidos graxos com maior conteúdo tanto em *N. oculata* como em *T. weissflogii* foram C14:0, C16:0, C16:1, C18:1 e C20:5. A dominância destes mesmos ácidos graxos para estas espécies foi também relatado em outros estudos (Hu e Gao, 2003, 2006; Fábregas et al. 2004; Derner 2006; Kiatmetha et al. 2010).

Além disso, o perfil de ácidos graxos em ambas as espécies seguiu um padrão esperado para microalgas no que se refere à resposta a luz, temperatura e fase de crescimento. Em baixa Intensidade luminosa, baixa temperatura e fase logarítmica houve um aumento nos ácidos graxos insaturados, por outro lado em alta intensidade luminosa, alta temperatura e fase estacionária aumentaram os saturados e mono-insaturados (Hu et al., 2008; Guschina e Harwood, 2009).

A intensidade luminosa atua no aumento ou diminuição dos ácidos graxos formadores de membranas. Geralmente baixas intensidades favorecem a produção de ácidos graxos insaturados que são incorporados principalmente às membranas celulares (Fábregas et al. 2004), enquanto que em altas intensidades luminosas há um aumento de lipídios saturados e monosaturados, formadores de lipídios neutros (Hu et al. 2008).

A temperatura atua no nível de saturação dos ácidos graxos para que as membranas mantenham sua integridade. Em microalgas crescendo em temperaturas abaixo do ótimo ocorre o aumento da insaturação dos ácidos graxos, o que garante a estabilidade e fluidez dos lipídios de membrana. Altas intensidades luminosas aumentam a síntese de ácidos graxos saturados que são os principais formadores dos lipídios de reserva (Hu et al. 2008).

Na fase logarítmica as células estão se reproduzindo exponencialmente investindo energia na produção de membranas para a construção de novas células e de cloroplastos. Altas proporções de PUFA são encontradas nos monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) e digalactosil-diacilglicerol (DGDG), que são os principais glicolipídios das membranas fotossintéticas das algas (Gurr et al. 2002). Na fase estacionária, quando há uma diminuição na concentração dos nutrientes, o crescimento diminui e as células passam a estocar os lipídios produzidos na forma de triglicerídeos (Thompson Jr. 1996). Devido à maioria dos estudos serem feitos com culturas em batelada, é difícil separar o efeito das diferentes fases de crescimento do efeito da diminuição dos nutrientes no metabolismo dos lipídios (Hu et al. 2008).

Além disso, a produção de lipídios e de ácidos graxos é dependente de outras variáveis como salinidade, pH e disponibilidade de outros nutrientes como fosfato e silicato (Guschina e Harwood 2009). Entretanto, a habilidade de modificar eficientemente o metabolismo dos lipídios em resposta as mudanças ambientais, permite que as microalgas sobrevivam e se multipliquem em diversos ambientes (Guschina e Harwood 2006). Muitos arranjos com essas variáveis ambientais podem ser feitos para que as espécies aumentem o conteúdo de lipídios ou a produção de ácidos graxos de interesse.

Os resultados desse trabalho pretendem ser uma contribuição ao conhecimento sobre *N. oculata* e *T. weissflogii* e indicam alguns arranjos que podem ser escolhidos dependendo do alvo de interesse, seja ele o aumento da produtividade dos lipídios ou a produção de ácidos graxos saturados ou PUFA.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Comparar o conteúdo de lipídios em biomassas coletadas com diferentes métodos.
- ✓ Testar meios de cultivo alternativos para aumentar a produção de lipídios.
- ✓ Avaliar o conteúdo de lipídios de outras espécies presentes no Banco de Cultivo do Laboratório.

REFERENCIAS

- Borges L., Faria, B.M., Odebrecht, C., Abreu, P.C. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de desenvolvimento limpo”. Atlântica 29: 35-46.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew Sust Energ Rev 14: 557-77.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biomass 25, 294-306.
- Derner, R.B. 2006. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Florianópolis, 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

- Fábregas J., Maseda, A., Dominguez, A., Otero, A. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semi-continuous culture. *World J Microb Biot* 20(1): 31-5.
- Griffiths, M.J., Harrison S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21:493-507.
- Grima, E.M., Belarbi, E.H., Fernández, F.G.A., Medina, R.A., Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv* 20: 491-515.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., Frayn, K.N. 2002. *Lipid Biochemistry: an introduction*. 5th ed. Blackwell Science, Oxford. 320p.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 45(2), 160-86.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2009. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry in: Arts, M.T., Brett, M.T. and Kainz, M.J. (eds) *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer New York. p. 1-24.
- Hu, H., Gao, K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnol Lett* 25(5), 421-25.
- Hu, H., Gao K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol Lett* 28(13), 987-92.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54(4), 621-39.

- Kiatmetha, P., Siangdang, W., Bunnag, B., Senapin, S., B., Withyachumnarnkul 2010. Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. Aquacult Int 19 599-609.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp.. Appl Microbiol Biotechnol 90:1429-41.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2008. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnol Bioeng 102 (1): 100-112.
- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W. 1981. Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. J Phycol 17: 374-384.
- Strzepek, R.F., Price, N.M. 2000. Influence of irradiance and temperature on the iron content of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). Mar Ecol Prog Ser 206: 107-17.
- Su, C., Chien, L., Gomes, J., Lin, Y., Yu, Y. Liou, J., Syu, R. 2011. Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. J Appl Phycol 23: 903-08.
- Thompson Jr., G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae. Biochim Biophys Acta 1302: 17-45.