

EFEKT ZMIENNEJ KONCENTRACJI FOSFORU NA EFEKTYWNOŚĆ SYNTEZY LIPIDÓW MIKROGLONÓW *CHLORELLA VULGARIS*

Magdalena Rokicka¹, Marcin Zieliński¹, Karolina Szwarz¹, Dawid Szwarz¹, Marcin Dębowski¹

¹ Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauk o Środowisku, Katedra Inżynierii Środowiska, ul. Warszawska 117a, 10-719 Olsztyn; e-mail: magdalena.rokicka@uwm.edu.pl

STRESZCZENIE

Hodowla i wykorzystanie mikroglonów jest obecnie intensywnie rozwijającym się obszarem badawczym. Niektóre gatunki mikroalg, w odpowiednich warunkach, gromadzą duże ilości tłuszczu w komórkach, który ma odpowiedni profil kwasów tłuszczowych do produkcji biodiesela. Etapem kierującym mikroglony na akumulację lipidów jest hodowla w określonych warunkach fizykochemicznych. Celem badań było określenie wpływu zmiennej stężenia fosforu w medium hodowlanym na olejogenność mikroglonów *Chlorella vulgaris* oraz wyznaczenie parametrów hodowli w trybie szoku. Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość stosowania szoku fosforowego w celu maksymalizacji syntezy lipidów przez mikroglony *Chlorella vulgaris*. W trakcie badań uzyskano 45,23% oleju z biomasy z hodowli z szokiem fosforowym, natomiast z biomasy pochodzącej z hodowli standardowej uzyskano o 18% oleju mniej niż z biomasy pochodzącej z hodowli z deficytem fosforu.

Słowa kluczowe: mikroglony, lipidy, biodiesel

LIPID ACCUMULATION OF *CHLORELLA VULGARIS* UNDER DIFFERENT PHOSPHATE CONCENTRATIONS

ABSTRACT

The cultivation and utilization of microalgae is now a intensively developing area of research. Some species of microalgae, under appropriate conditions, accumulate large amounts of lipids in the cells. This lipids have a suitable profile of fatty acids for biodiesel production. The culture of microalgae for lipids accumulation should be performed in certain physicochemical conditions. The aim of the study was to determine the effect of variable orthophosphates concentrations in the culture medium for lipids accumulation of microalgae *Chlorella vulgaris* and to determine of parameters of the phosphoric shock in the medium. The study confirmed the possibility of the use of the phosphoric shock in the medium to maximize lipids accumulation by the microalgae *Chlorella vulgaris*. In the study, 45.23% of the oil was obtained from the biomass from the culture with phosphoric shock in the medium and 18% less of the oil was obtained from the biomass from the standard culture.

Keywords: microalgae, lipid, biodiesel

WPROWADZENIE

W mikroglonach upatruje się potencjał do produkcji biodiesla ze względu na odpowiednio generowany przez nie profil kwasów tłuszczowych [6, 15, 20]. Najnowsze badania wykazały, że wytwarzanie biopaliw przy użyciu mikroalg w dużej mierze opiera się na identyfikacji odpowiednich gatunków mikroalg oraz optymalizacji warunków uprawy [4, 13]. Jednym z głównych wyzwań na drodze do opłacalności tego procesu jest zwiększenie produktywności biomasy i wydajności lipidów [5]. Olejodajne szczepy mikro-

alg można podzielić na dwie grupy: pierwsza o wysokiej zawartości oleju, ale słabym wzroście oraz druga o niskiej zawartości oleju ale zdolności do szybkiego wzrostu [3, 14]. Szczepem mikroglonów, charakteryzującym się zarówno szybkim przyrostem biomasy jak i stosunkowo wysoką zawartością lipidów (25–55%) jest gatunek *Chlorella vulgaris* [2]. Hodowla mikroglonów opiera się na optymalizacji czynników powodujących wzrost tj. stężenia biogenów w pożywce, kontroli natężenia światła, temperatury, zasolenia oraz stężenia ditlenku węgla. Etapem kierującym mikroglony na akumulację lipidów (głównie

triacylgliceroli) jest hodowla w określonych warunkach fizykochemicznych [11, 18]. Zazwyczaj, gdy mikroalgi hoduje się w niskich stężeniach składników odżywczych ich wzrost jest zahamowany, lecz ograniczenie ilości składników pokarmowych jest skuteczną metodą stwarzania presji środowiskowej aby zwiększyć stopień gromadzenia lipidów (rys. 1) [16, 10].

Ograniczenie ilości biogenów prowadzi nie tylko do nagromadzenia substancji lipidowych, ale też powoduje stopniowe zmiany składu lipidowego z wolnych kwasów tłuszczowych do triacylogliceroli. Jest to sposób na manipulację hodowlą i ma istotny wpływ na zawartość lipidów u wielu gatunków mikroglonów [5]. Wśród składników odżywczych deficyt azotu jest jednym z najważniejszych czynników mających wpływ na metabolizm lipidów w glonach. Ogólna tendencja do gromadzenia się lipidów, zwłaszcza triacylogliceroli w odpowiedzi na deficyt azotu zaobserwowano dla wielu gatunków i szczepów różnych grup taksonomicznych glonów. Badania prowadzone przez Xin i in. wykazały, że prowadzenie hodowli glonów *Scenedesmus sp.* z deficytem biogenów skutkuje wzrostem zawartości lipidów w biomase z 14 do 31% [7, 17]. Składnikami odżywczymi, których deficyt stymuluje nagromadzenie lipidów są również fosforany i siarczany oraz węgiel organiczny w przypadku hodowli heterotroficznych (19).

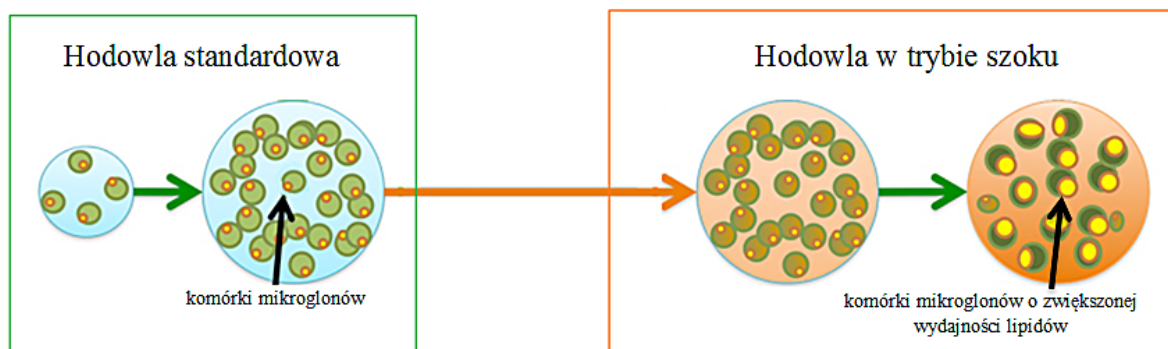
Celem badań było określenie wpływu zmiennego stężenia związków fosforu w medium hodowlanym na olejogenność mikroglonów *Chlorella vulgaris* oraz wyznaczenie parametrów hodowli w trybie szoku. Przyjęta teza badawcza zakładała, że manipulacje w prowadzeniu procesu hodowli poprzez zmiany zawartości fosforanów w medium wpłyną na ilość i skład uzyskiwanego oleju z biomasy mikroglonów.

METODYKA

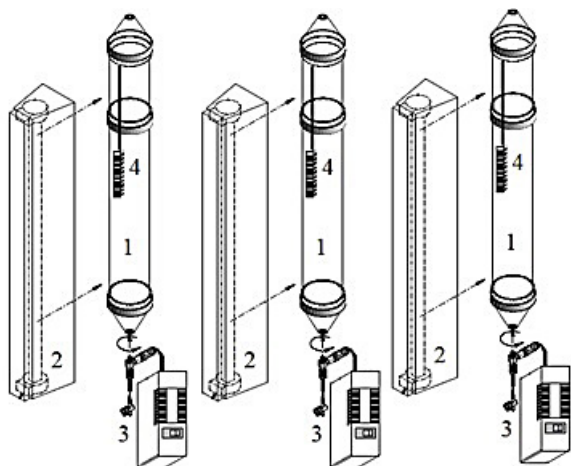
Kompozycja taksonomiczna inokulum oparta była na monokulturze zielenic *Chlorella vulgaris*. Hodowlę prowadzono w skali laboratoryjnej w 3 fotobioreaktorach rurowych o pojemności roboczej 2 dm³ każdy. Schemat stanowiska badawczego przedstawiono na rysunku 2.

Reaktory umieszczono w szafie klimatycznej, w której panowała temperatura 24±1°C. Oświetlenie z intensywnością 0,7 kLux realizowano za pomocą świetlówek żeżeńiowych o temperaturze barwowej 3600K. W celu równomiernego dostępu glonów dwutlenku węgla, składników pokarmowych i światła reaktory mieszano za pomocą sprężonego powietrza z wydajnością 5 l/min. Czas trwania hodowli wynosił 28 dób. Do układu eksperymentalnego wprowadzono taką ilość zagęszczonej biomasy, aby początkowa koncentracja mikroglonów w medium hodowlanym wynosiła 200±10 mg s.m./dm³. Pożywkę syntetyczną stworzono wg przepisu SAG dedykowaną badalnemu gatunkowi mikroglonów. Skład pożywki przedstawiono w tabeli 1.

Badania podzielono na 2 etapy badawcze. W części pierwszej zmierzano do określenia efektywności oraz tempa wykorzystania biogennych substancji pożywkowych, tzn. ortofosforanów (PO₄³⁻) i azotanów (N-NO₃⁻) medium hodowlanego w procesie początkowej fazy przyrostu biomasy mikroglonów. Etap I (hodowla standardowa STD) prowadzono do momentu uzyskania koncentracji biomasy >1500 mg/dm³. Następnie biomasę zagęszczano do 15% objętości początkowej. Biomasa ta stanowiła inokulum w II etapie badań, którym była hodowla w trybie szoku fosforowego (SZOK_P). Tryb szoku fosforowego polegał na rozpoczęciu hodowli z pożywką syntetyczną SAG bez suplementacji związków fosforu. Po 7



Rys. 1. Wpływ parametrów hodowli na powstającą biomasę [na podstawie 21]
Fig. 1. Influence of breeding parameters on biomass [based on 21]



Rys. 2. Schemat stanowiska do hodowli mikroglonów: 1 – fotobioreaktor rurowy, 2 – źródło światła, 3 – pompa perystaltyczna, 4 – sonda multiparametryczna

Fig. 2. Scheme of the experimental stand: 1 – tube photobioreactor, 2 – light, 3 – peristaltic pump, 4 – probe

dniach do hodowli dostarczano związki fosforu tj. K_2HPO_4 oraz KH_2PO_4 .

W etapie I i II co 48h wykonywano analizy fizykochemiczne. Do określenia stężenia związków biogennych zastosowano metodę testów kuwetowych LCK Hach Lange. W medium hodowlanym kontroli podlegały następujące parametry: związki organiczne wyrażone w ChZT, węgiel organiczny (TOC), azot całkowity (N_{Tot}), azot azotanowy V ($N-NO_3^-$), azot azotanowy III ($N-NO_2^-$), fosfor całkowity (P_{Tot}), ortofosforany (PO_4^{3-}) oraz pH. W celu określenia tempa przyrostu biomasy wykorzystywano sondę Zolitax firmy Hach Lange (Niemcy) umieszczoną w medium hodowlanym w całym okresie hodowli zarówno w I i II etapie badawczym. Po 14 dobach Etapu II biomasę zagęszczano do objętości 200ml oraz poddawano analizie ilościowej z użyciem

wagosuszarki Onyx. Lipidy ekstrahowano z zawiesiny mikroglonów wg zmodyfikowanej metody Bligh and Dyer z użyciem chloroformu oraz metanolu w stosunku 2:1 [1]. Po 48 h biomasę odwirowywano a uzyskany ekstrakt odparowywano na łaźni wodnej. Analizę profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) wykonywano metodą chromatografii gazowej na chromatografie płomieniowo-jonizacyjnym. Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano w oparciu o pakiet STATISTICA 10 PL. Weryfikację hipotezy dotyczącej rozkładu każdej badanej zmiennej określano na podstawie testu W Shapiro – Wilka. W celu stwierdzenia istotności różnic między zmiennymi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W celu sprawdzenia istotności między analizowanymi zmiennymi wykorzystano test rozsądnej istotnej różnicy RIR Tukeya. W testach przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

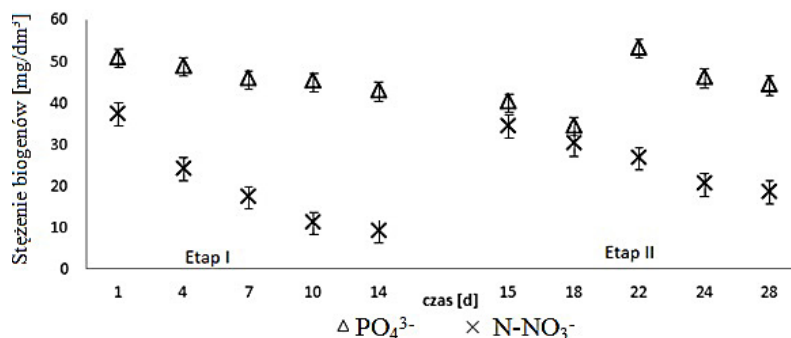
Pierwsza część prowadzonych badań trwała 14 dób. W tym okresie nastąpiło sukcesywne zmniejszanie się stężenia biogenów w medium hodowlanym (rys. 3). Poziom wyjściowy ortofosforanów wynosił $50,3 \text{ mg } PO_4^{3-}/\text{dm}^3$. W czasie trwania etapu I ilość tego związku ograniczono o 16% do wartości $42,1 \text{ mg } PO_4^{3-}/\text{dm}^3$. W etapie II początkowa zawartość ortofosforanów wynosiła $40,1 \text{ mg } PO_4^{3-}/\text{dm}^3$ i do 7 doby hodowli w trybie szoku następowało zużywanie fosforu do wartości $36,2 \text{ mg } PO_4^{3-}/\text{dm}^3$. W 7 dobie do medium hodowlanego dodano K_2HPO_4 oraz KH_2PO_4 w ilości wynikającej z przepisu na pożywkę SAG. Skutkiem tego zabiegu była zmiana koncentracji ortofosforanów w medium hodowlanym, tj. wzrostu stężenia PO_4^{3-} do wartości $53,2 \text{ mg } PO_4^{3-}/\text{dm}^3$. Do

Tabela 1. Medium hodowlane

Table 1. Culture medium

Wyszczególnienie	R-r wyjściowy, g/dm ³	Dawka, ml
NaNO ₃	75,0	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5	10
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	7,5	10
KH ₂ PO ₄	17,5	10
NaCl	2,5	10
Mikroelementy		6

Mikroelementy	R-r wyjściowy, mg/dm ³
FeCl ₃ ·3H ₂ O	97,0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	41,0
ZnCl ₂	5,0
CoCl ₂ ·3H ₂ O	2,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4,0



Rys. 3. Zmiany zawartości PO_4^{3-} i N-NO_3^- w medium hodowlanym w I i II części badań
Fig. 3. Changes in the content PO_4^{3-} and N-NO_3^- in the culture medium in the first and second part of the research

końca eksperymentu ilość ortofosforanów została ograniczona do wartości 43,7 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{dm}^3$.

Zarówno w etapie I jak i II obserwowano stopniowe zmniejszanie się ilości azotanów (rys. 3), w etapie I jego stężenie zostało ograniczone o 76% z wyjściowego poziomu 37,3 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{dm}^3$ do wartości 9,17 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{dm}^3$. W II etapie ilość tego wskaźnika ograniczono jedynie o 26% (rys. 3).

Wraz ze wzrostem biomasy wzrastała wartość ChZT (rys.4). Początkowo zapotrzebowanie wynosiło 26,2 mg O_2/dm^3 i do końca etapu I wartość tego parametru wzrosła do 310 mg O_2/dm^3 . W etapie II końcowa wartość wynosiła 384 mg O_2/dm^3 . Analogiczną zależność zaobserwowano w wartościach węgla ogólnego (TOC). Początkowo wartość tego parametru wynosiła 26,2 mg O_2/dm^3 , w 14 dobie 42,2 mg O_2/dm^3 a jego ostateczna wartość wyniosła 48,5 mg O_2/dm^3 (rys.4).

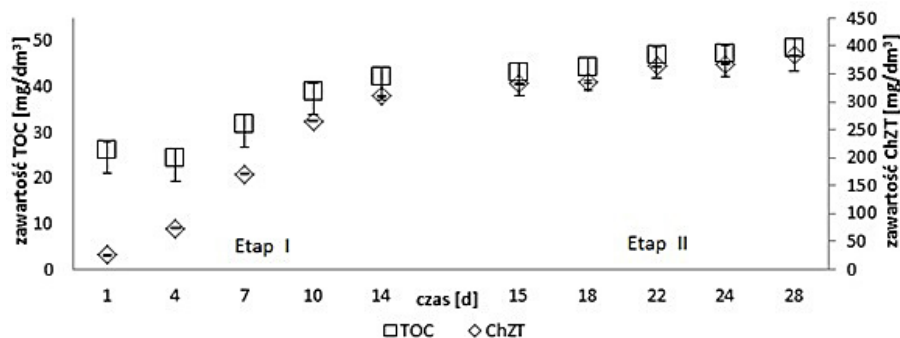
Tempo wzrostu mikroglonów w medium hodowlanym przedstawiono na rys. 5 (rys.5). Istotny wzrost koncentracji biomasy glonów w reaktorze eksperymentalnym obserwowano od 4 doby trwania procesu (rys. 5). Szybkość wzrostu bio-

masy w etapie I wynosiła $105 \pm 3 \text{ mg}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$. Końcowa ilość biomasy w reaktorze wynosiła $1536 \text{ mg}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$.

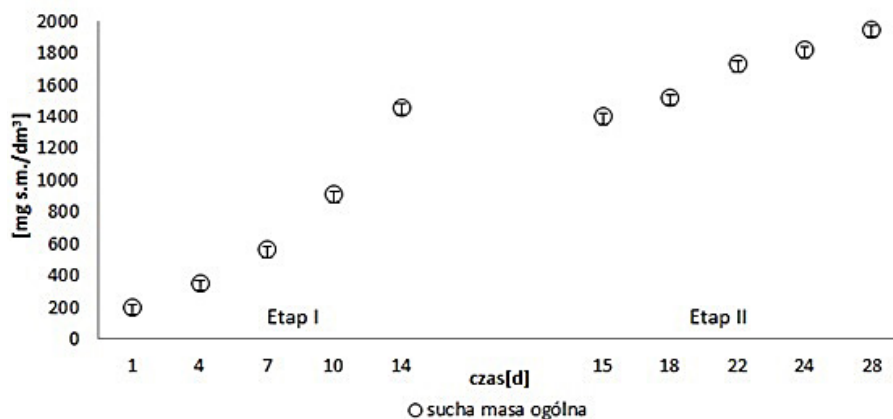
W 15 dobie trwania eksperymentu rozpoczęto realizację drugiej części badań, w której zawartość biogenych składników odżywczych była pozbawiona związków fosforu. W okresie kolejnych 14 dni obserwowano wykładniczy wzrost koncentracji glonów w fotobioraktorze do wartości końcowej wynoszącej $1892 \text{ mg}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$ (rys. 2). W etapie II szybkość wzrostu biomasy wynosiła $25 \pm 5 \text{ mg}_{\text{s.m.}}/\text{dm}^3$.

Uzyskaną biomasę z hodowli STD w ilości $2,26 \text{ g}_{\text{s.m.o.}}/\text{dm}^3$, oraz biomasę z hodowli SZOK w ilości $1,68 \text{ g}_{\text{s.m.o.}}/\text{dm}^3$ ekstrahowano metodą Bligh&Dyer (tab. 2). Powstały ekstrakt oznaczano ilościowo metodą grawiteryczną. W trakcie badań uzyskano 45,23 % oleju z biomasy z hodowli SZOK_P, natomiast z biomasy pochodzącej z hodowli STD uzyskano o 18% oleju mniej niż z biomasy pochodzącej z hodowli SZOK_P (tab. 2).

Zmiany w sposobie hodowli mikroglonów wpłynęły także na jakość otrzymywanego oleju (tab. 3). Analiza FAME wykazała, że kwasy



Rys. 4. Zmiany zawartości ChZT i TOC w medium hodowlanym w I i II części badań
Fig. 4. Changes in the content of COD and TOC in the culture medium in the first and second part of the research



Rys. 5. Zmiany koncentracji biomasy mikroglonów w I i II części badań

Fig. 5. Changes in concentration of microalgae biomass in first and second part of the research

Tabela 2. Uzysk oleju z biomasy STD i SZOK-P

Table 2. The yield of oil from biomass STD and SHOCK_P

Parametr	Jednostka	STD	SZOK_P
Uzysk oleju	g	0,61	0,76
Ilość suchej masy organicznej biomasy użytej do ekstrakcji	g s.m.o.	2,26	1,68
Udział oleju w biomacie	% s.m.o.	26,99	45,23

Tabela 3. Zmiany zawartości kwasów tłuszczowych

Table 3. Changes in fatty acid content

Wyszczególnienie	STD	SZOK_P	% udział w STD	% udział w SZOK_P
C13:0	3,58	5,39	3,17	3,54
C16:0	34,44	48,53	30,51	31,87
C18:0	12,11	16,12	10,72	10,59
C18:1 TRANS 9	44,50	56,84	39,43	37,33
C18:3 CIS 6	13,54	16,59	12,00	10,89
C20:3 CIS 11	4,71	7,79	4,17	5,12
C20:4 CIS 5	–	1,00	0,00	0,66
Razem	112,87	152,25	100,00	100,00

tłuszczowe występujące w gatunku *Chlorella vulgaris* to: kwas tridekanowy (C13:0), kwas palmitynowy (C16:0), kwas stearynowy (C18:0), kwas kwas elaidynowy (C18:1 TRANS 9), kwas gamma-linolenowy (C18:3 CIS 6), kwas eikozatrienowy (C20:3 CIS 11). W oleju pochodzącym z hodowli SZOK_P uzyskano także kwas arachidynowy (C20:4 CIS 5).

W hodowli prowadzonej z deficytem fosforu uzyskano znacznie większą sumaryczną ilość kwasów tłuszczowych, jednak analiza ich procentowego udziału zarówno w hodowli standardowej jak i hodowli w trybie szoku nie wykazała istotnych różnic (tab. 3). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe stanowiły większościowy udział w profilu kwasów tłuszczowych i stanowiły ponad 55% zdefiniowanych kwasów.

DYSKUSJA

W literaturze szeroko opisuje się wpływ szoku wywołanego deficytem azotu, na możliwości komorek mikroglonów do generowania znaczących ilości lipidów. Z badań przeprowadzonych przez Larned [1998] wynika, że oprócz azotu to właśnie fosfor jest podstawowym składnikiem ograniczającym wpływającym na metabolizm mikroglonów. Efekt ten jest zależny od gatunku mikroglonów. W warunkach ograniczeń zarówno azotu jak i fosforu w badaniach Xin L i in. [2010b], zawartość lipidów *Scenedesmus* sp. LX1 była wysoka, ale wydajność lipidów i szybkość ich gromadzenia nie była najwyższa z powodu względnie niskiej biomasy glonów. Potwierdzają to wyniki otrzymane w opisywanym

doświadczeniu. W drugim etapie badań, gdy hodowlę prowadzono z deficytem fosforu wzrost biomasy został znacząco ograniczony i w czasie 14 d przyrost biomasy wyniósł jedynie 25 mg/dm³/d. W tym samym czasie w hodowli STD uzyskiwano przyrost rzędu 100 mg/dm³/d.

W badaniach Mujtaba i in. [2012] zastosowano dwuetapowy proces, aby zwiększyć gęstość komórek gatunku *Chlorella* przez 10 dni. Zastosowano tu tzw. szok azotowy tzn. hodowlę prowadzono z dodatkiem azotu, a następnie warunki w medium hodowlanym zostały drastycznie zmienione: od bogatej w składniki odżywcze do warunków niedoboru azotu. Analogiczne warunki zastosowano w przeprowadzonym doświadczeniu, badania również prowadzono dwuetapowo, lecz jako składnika limitującego użyto fosforu. Z badań Mujtaby i in. wynika, że zawartość lipidów wzrosła z 14,5% (hodowla bogata w azot) do 24,6% (hodowla z deficytem azotu). Z przeprowadzonych badań wynika, że z biomasy uzyskanej z hodowli prowadzonej z początkowym deficytem fosforu uzyskano o 18% oleju więcej niż z hodowli standardowej.

W badaniach Khozin-Goldberg and Cohen [2006] ograniczenie dostępności fosforu spowodowało wzrost poziomu lipidów, głównie triacylogliceroli, w hodowli gatunku *Monodus subterraneus*. W przeprowadzonych badaniach różny spodeb pozyskania biomasy nie wpłynął istotnie na jakość otrzymywanych estrów metyowych.

PODSUMOWANIE

Przez zmiany zużywalności biogenów, w wartości ChZT i TOC oraz obserwacji koncentracji biomasy mikroglonów stwierdzono, że w II etapie badań w wyniku reakcji stresowej na deficyt fosforu nastąpiły zmiany w metabolizmie mikroglonów. Znacznie zmniejszył się stopień redukcji biogenów zużywanych na przyrost biomasy, co skutkowało na zmniejszenie tempa przyrostu biomasy. Zmiany te wpłynęły na ilość i jakość uzyskanego oleju. W trakcie badań stwierdzono, że uzysk oleju pozyskany z hodowli SZOK_P osiągnął wartość 45,23%. Deficyt fosforu znacząco wpłynął na koncentrację lipidów w komórkach mikroglonów, ponieważ z biomasy pochodzącej z hodowli STD uzyskano o 18% oleju mniej niż z biomasy pochodzącej z hodowli SZOK_P. Prowadzony dwustopniowy sposób hodowli mikroglonów *Chlorella vulgaris* z deficy-

tem fosforu zakończył się sukcesem i analogiczna hodowla może być zastosowana dla innych gatunków mikroglonów.

Podziękowania

Badania zostały zrealizowane w ramach tematu badawczego nr 18.620.017–300 realizowanego w ramach działalności statutowej na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.

LITERATURA

1. Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (8), 911–917.
2. Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25, 294–306.
3. Feng P., Deng Z., Fan L., Hu Z. 2014. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114 (4), 405–410.
4. Gao B., Yang J., Lei X., Xia S., Li A., Zhang C. 2016. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 821–830.
5. Griffiths M. J., van Hille R. P., Harrison S. T. 2014. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(5), 2345–2356.
6. Guo X., Su G., Li Z., Chang J., Zeng X., Sun Y., Lin L. 2015. Light intensity and N/P nutrient affect the accumulation of lipid and unsaturated fatty acids by *Chlorella* sp. *Bioresource technology*, 191, 385–390.
7. Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Tech.*, 27, 631–635.
8. Khozin-Goldberg I., Cohen Z. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67, 696–701.
9. Larned S. T. 1998. Nitrogen-versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral

- reef macroalgae. *Marine Biology*, 132(3), 409–421.
10. Li X., Hu H.Y., Gan K., et al., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. *Bioresour. Technol.*, 101, 5494–5500.
 11. Li X., Wang M., Liao X., Chen H., Dai Y., Chen B. 2015. Two Stages of N-Deficient Cultivation Enhance the Lipid Content of Microalga *Scenedesmus* sp. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(4), 503–512.
 12. Mujtaba G, Choi W, Lee C-G, Lee K. 2012. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresour Technol.*, 123, 279–283.
 13. Prommuak C., Pavasant P., Quitain A.T, Goto M., Shotipruk A. 2013. Simultaneous production of biodiesel and free lutein from *Chlorella vulgaris*. *Chem Eng Technol.*, 36, 733–739.
 14. Ruangsomboon S. 2015. Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. *Bioresource Technology*, 191, 377–384.
 15. Wijffels R.H., Barbosa M.J. 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329 (5993), 796–799.
 16. Xin L., Hong-ying H., Jia Y. 2010a. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*, 27, 59–63.
 17. Xin L., Hong-ying H., Ke G., Ying-xue S. 2010b. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. *Bioresource Technology*, 101, 5494–5500.
 18. Xin L., Hong-ying H., Yu-ping Z. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102, 3098–3102.
 19. Xu H., Miao X., Wu Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4), 499–507.
 20. Zeng X., Danquah M.K., Zhang S., Zhang X., Wu M., Chen X.D., Ng I.S., Jing K., Lu Y. 2012. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. *Chem. Eng. J.*, 183, 192–197.
 21. <http://www.amnh.org/learn-teach/young-naturalist-awards/winning-essays2/2013-winning-essays/optimizing-algae-biofuels-applied-natural-selection-to-improve-lipid-synthesis/> Optimizing Algae Biofuels: Applied Natural Selection to Improve Lipid Synthesis.