

Carbohydrates in *Ankistrodesmus braunii* biomass cultivated in tubular photobioreactors

Carboidratos em biomassa de Ankistrodesmus braunii cultivada em fotobioreatores tubulares

Ana Lucía Morocho-Jácome¹, Marcello Dapievi Bresaola², João Carlos Monteiro de Carvalho², Marisa Nicolai³, Catarina Rosado³, André Rolim Baby¹

¹Pharmacy Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Biochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lisbon, Portugal

Email: catarina.rosado@ulusofona.pt

Abstract

The great need for microalgae biomass production in tubular photobioreactors has increased for use in biofuels, pharmaceuticals and even cosmetic applications. In order to better understand the potential applications of this material, it is imperative to know in detail its composition. *Ankistrodesmus braunii* was cultivated in 3.5 L tubular air-lift photobioreactors using 10 mM sodium nitrate as nitrogen source in batch mode at 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The maximum biomass concentration (X_m) and the biomass productivity (PX) reached at 6th day of cultivation was $1249 \pm 72 \text{ mg L}^{-1}$ and $165 \pm 13 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectively. Carbohydrates productivity expressed in terms of glucose, galactose and glucose+galactose (1:1) were 2.57 ± 0.04 , 4.12 ± 0.06 and $3.22 \pm 0.05 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectively. Results show a statistical difference that was found between carbohydrate productivity values expressed as glucose, galactose and glucose+galactose (1:1).

Keywords: *Ankistrodesmus braunii*, carbohydrates, tubular photobioreactor

Resumo

A grande necessidade para produzir biomassa de microalgas em fotobioreatores tubulares aumentou no sentido da obtenção de biomassa para biocombustíveis, produtos farmacêuticos e inclusive aplicações cosméticas. A fim de compreender melhor as potenciais aplicações deste material, é importante conhecer em detalhe a sua composição. *Ankistrodesmus braunii* foi cultivado em fotobioreatores tubulares tipo air-lift de 3,5 L usando 10 mM nitrato de sódio como fonte de nitrogénio em cultivo em batelada sob 60 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A concentração máxima de biomassa (X_m) e a produtividade de biomassa (PX) atingida ao sexto dia de cultivo foram $1249 \pm 72 \text{ mg L}^{-1}$ e $165 \pm 13 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. A produtividade de carboidratos expressa como glucose, galactose e glucose+galactose (1:1) foi $2,57 \pm 0,04$, $4,12 \pm 0,06$ e $3,22 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Os resultados mostram uma diferença estatística entre os valores de produtividade expressos como glucose, galactose e glucose+galactose (1:1).

Palavras chave: *Ankistrodesmus braunii*, carboidratos, fotobioreatores tubulares

Introduction

Microalgae can be cultivated to produce a wide variety of metabolites as proteins, lipids, carbohydrates, carotenoids and vitamins which can be used in food, pharmaceuticals and even cosmetics. *Ankistrodesmus braunii* UTEX 245 (part of the Chlorophyceae class) has been cited as capable of producing large amounts of lipids. Studies in the literature with the microalgae *A. braunii* are to date limited to a few reports about cultivation in photobioreactors (PBR) using complex culture medium (Bresaola, 2016).

Photosynthesis and the carbon fixation metabolism produce mainly carbohydrates (Ho, Chen & Chang, 2012), among other compounds. Carbohydrates can be accumulated as reserve materials (e.g., starch) in the plastids or become part of cell walls (e.g. cellulose, pectin and sulfated polysaccharides). However, the composition and metabolism of microalgae carbohydrates differ between species (Rismani-Yazdi, Haznedaroglu, Bibby & Peccia, 2011; Chen et al., 2013). The cell walls of Chlorophytae are mainly composed of cellulose and hemicellulose. Glucose polymers produced via cellulose/starch are the predominant component of stored products in different microalgae species (Metting, 1996).

Cultivation of photosynthetic microorganisms can be carried out in both open ponds and photobioreactors, such as vertical or horizontal tubular photobioreactors (Barbosa & Hadiyanto, 2004; Mirón, Camacho, Gómez, Grima & Yusu, 2000), flat-plate reactors (Morita, Watanabe & Saiki, 2000) or membrane photobioreactors (Kumar, Yuan, Sahu, Ergas & Van Langenhove, 2010). The most popular types of photobioreactors are tubular, such as airlift bioreactors, due to their good gas transfer and light utilization efficiency. These properties allow them to achieve high biomass concentrations with consequently high harvesting efficiencies (Carvalho, Francisco, Almeida, Sato & Converti, 2004).

Regarding microalgae production, nitrogen is the essential nutrient for the proper growth in all the cultivations systems. Different nitrogen sources could be used by microalgae, such as nitrate, nitrite, ammonia and urea (Carvalho, Matsudo, Bezerra, Ferreira-Camargo & Sato, 2014). There are many examples in the literature that indicate the importance of nitrogen depletion for production of biomass with high levels of carbohydrates. Particularly, *Chlorella vulgaris* (Chlorophytae) cultivated in medium with low nitrogen content can achieve 55 % carbohydrate content (Illman, Scragg & Shales, 2000). However, there are at present no reports in the literature for *A. braunii* cultivation.

Although carbohydrates from microalgae are been de-

Introdução

As microalgas podem ser cultivadas para produzir uma variedade de metabolitos como proteínas, lipídios, carboidratos, carotenóides e vitaminas, que poderiam ser usados em alimentos, fármacos e inclusive cosméticos. A fim de compreender melhor as potenciais aplicações deste material, é importante conhecer em detalhe a sua composição. *Ankistrodesmus braunii* UTEX 245 (Chlorophyceae) tem sido citada como capaz de produzir grandes quantidade de lípidos. Relatos na literatura com a microalga *A. braunii* estão atualmente limitados a poucas informações de cultivos em fotobioreatores (PBR) utilizando meios de cultura complexos (Bresaola, 2016).

A fotossíntese e o metabolismo de fixação de carbono podem produzir, principalmente, carboidratos (Ho, Chen & Chang, 2012) entre outros compostos. Os carboidratos podem ser acumulados como material de reserva (*i.e.*, amido) nos plastídios ou podem fazer parte das paredes celulares (*i.e.*, celulose, pectina e polissacarídeos sulfatados). No entanto, a composição e o metabolismo dos carboidratos das microalgas variam entre as espécies (Rismani-Yazdi, Haznedaroglu, Bibby & Peccia, 2011; Chen et al., 2013). As paredes celulares das Chlorophyta são principalmente compostas por celulose e hemicelulose. Os polímeros de glucose produzidos via celulose/amido são os principais componentes dos produtos de armazenamento de diversas espécies de microalgas (Metting, 1996).

O cultivo de microrganismos fotossintéticos pode ser realizado em tanques abertos ou em fotobioreatores, como os reatores tubulares verticais ou horizontais (Barbosa & Hadiyanto, 2004; Mirón, Camacho, Gómez, Grima & Yusu, 2000), reatores de placa plana (Morita, Watanabe & Saiki, 2000) ou fotobioreatores de membrana (Kumar, Yuan, Sahu, Ergas & Van Langenhove, 2010). Os tipos mais populares de fotobioreatores são os fotobioreatores tubulares, como os de tipo *air-lift*, devido a sua boa capacidade de transferência de gases e eficiência na utilização de luz. Essas propriedades permitem atingir elevadas concentrações de biomassa com elevada eficácia na colheita (Carvalho, Francisco, Almeida, Sato & Converti, 2004).

Considerando a produção de microalgas, o nitrogênio é o nutriente essencial no crescimento em todos os sistemas de cultivo. Diferentes fontes de nitrogênio podem ser usadas pelas microalgas, como os nitratos, nitritos, amônia e ureia (Carvalho, Matsudo, Bezerra, Ferreira-Camargo & Sato, 2014). Há muitos exemplos na literatura que apresentam a importância da depleção de nitrogênio na produção de biomassa com elevados níveis

scribed as very suitable for bioethanol production (Chen et al., 2013), microalgae biomass rich in carbohydrates could also be incorporated in cosmetics formulations, since it is known that such molecules are hygroscopic, and thus, can contribute to increase skin hydration.

This work evaluates the total carbohydrates levels in microalgae biomass of *A. braunii* cultivated in tubular photobioreactors, in order to assess their potential to be incorporated in cosmetics formulations.

Materials and Methods

1- *A. braunii* cultivation

Ankistrodesmus braunii UTEX 245 from the University of Texas Culture Collection (UTEX) was maintained at 25 ± 1 °C in agar. A small quantity of such microalga was used to inoculate a 10 mL glass tube with 5 mL Bold 3N (8.82 mM sodium nitrate) medium (UTEX, 2016). This tube was maintained during 25 days in a rotatory shaker at 25 ± 1 °C under continuous light intensity of $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fluorescent lamps provided artificial light, measured with a luminance meter, model LI-250A (LI-COR, Lincoln, NE, USA). After this time period, 500 mL Erlenmeyer flasks containing approximately 200 mL Bold modified medium (10.0 mM sodium nitrate) were inoculated with *A. braunii* at the same conditions in a batch mode. Biomass concentration was monitored by optical density until it was stable (6th cultivation day). This biomass was used to inoculate the 3.5 L tubular photobioreactor (TPBR).

The TPBR was developed at the Microalgal Biotechnology Laboratory of the Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology of São Paulo University. The working volume of the system was 3.5 L, approximately 66 % of which was illuminated. An airlift mechanism was used to ensure culture circulation, which was performed by an air pump (Seven Star, Guangdong, China), and the culture flow was set at $40 \pm 1 \text{ L h}^{-1}$. The culture pH was controlled at 7.0 ± 0.2 by daily addition of pure CO₂ from cylinder. Continuous light intensity was regulated at $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ by fluorescent lamps and a luminance meter. The temperature of culture was fixed at 25 ± 1 °C. When the

de carboidratos. Particularmente, *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) cultivada em meio com baixa quantidade de nitrogênio pode atingir 55 % carboidratos (Illman, Scragg & Shales, 2000). Porém, não há relatos na literatura para o cultivo de *A. braunii*.

Apesar de os carboidratos de microalgas se encontrarem descritos como muito apropriados na produção de bioetanol (Chen et al., 2013), a biomassa de microalgas, rica em carboidratos, poderia também ser incorporada em formulações cosméticas, uma vez que é conhecido que tais moléculas são higroscópicas, e deste modo, podem contribuir para aumentar a hidratação da pele.

Este trabalho avalia as quantidades totais de carboidratos na biomassa da microalga *A. braunii* cultivada em fotobioreatores tubulares, para avaliar o seu potencial para ser incorporada em formulações cosméticas.

Materiais e Métodos

1- Cultivo de *A. braunii*

Ankistrodesmus braunii UTEX 245 proveniente da Coleção de Cultura da Universidade do Texas (UTEX) foi mantido a 25 ± 1 °C em ágar. Uma pequena quantidade da microalga foi inoculada em tubo de 10 mL contendo 5 mL de meio Bold 3N contendo 8.82 mM nitrato de sódio (UTEX, 2016). O tubo foi mantido durante 25 dias em agitador rotatório a 25 ± 1 °C sob intensidade de luz contínua de $60 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lâmpadas fluorescentes proveram da luz artificial que foi quantificada com medidor de radiação, modelo LI-250A (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Depois desse tempo, alguns Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio Bold modificado (10.0 mM sodium nitrate) foram inoculados com *A. braunii* nas mesmas condições em cultivo intensivo. A concentração da biomassa foi determinada por densidade óptica até a estabilização da concentração da biomassa (sexto dia de cultivo). A biomassa foi usada para inocular o fotobioreator tubular (FBRT) de 3,5 L. O FBRT foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo. O volume de trabalho foi de 3,5 L com 66 % de iluminação. O mecanismo *air-lift* foi usado para garantir a circulação do cultivo usando uma bomba de ar (Seven Star, Guangdong, China), e o fluxo do cultivo foi de $40 \pm 1 \text{ L h}^{-1}$. O pH do meio foi mantido em $7,0 \pm 0,2$ pela adição diária de CO₂ puro de cilindro. A intensidade de luz contínua foi controlada a $60 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com lâmpadas fluorescentes e com medidor de intensidade luminosa. A temperatura do cultivo foi fixada em $25 \pm$

biomass concentration achieved the maximum values, it was harvested from the culture medium by centrifugation and then lyophilized. Biomass productivity (P_x , mg L⁻¹ d⁻¹) was calculated as the ratio between the total amount of biomass produced per unit volume and the cultivation time (T_c , d) using the following equation:

$$P_x = \frac{(X_m - X_o)}{T_c} \quad (1)$$

In which, X_m is the maximum biomass concentration of each culture and X_o is the starting biomass concentration (300 mg L⁻¹).

2- Carbohydrates in the *A. braunii* biomass

A simple and robust colorimetric carbohydrate detection method was used to determine the carbohydrate levels of the *A. braunii* biomass (10 %, m/v). This assay is based on the phenol-sulfuric acid method described by Nielsen (2010). Spectrophotometric determination of the carbohydrates at 490 nm was thus made using a Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis spectrophotometer along with a Stuart Scientific Autovortex SA6. All assays were performed in triplicate and monitored at 25 ° C. The pro analysis standards used were D-glucose from Himedia Laboratories, D-galactose from VWR Chemicals and a mixture containing D-glucose and D-galactose (1:1), in a concentration range between 10-50 µg mL⁻¹. The sulfuric acid 95.0-97.0% used was acquired from Sigma-Aldrich and the phenol from VWR Chemicals.

Carbohydrates productivity (P_{CHO} , mg L⁻¹ d⁻¹) in the culture was calculated with Equation 2.

$$P_{CHO} = \frac{(X_m * CHO)}{(100 * T_c)} \quad (2)$$

Where X_m is the maximum biomass concentration (mg L⁻¹), CHO is the carbohydrate concentration (%) and T_c is the cultivation time (d).

Results and Discussion

1- *A. braunii* cultivation

Taking into account the cultivation of photosynthetic microorganisms, there are numerous studies of the utilization of different nitrogen sources in *Arthrospira*

1 °C. Quando os cultivos atingiram valores máximos de concentração de biomassa, a biomassa foi coletada do meio de cultivo com centrifugação e depois liofilizada. A produtividade da biomassa (P_x) foi calculada como a relação entre a quantidade total de biomassa produzida por unidade de volume e o tempo de cultivo (T_c) usando a seguinte equação:

$$P_x = \frac{(X_m - X_o)}{T_c} \quad (1)$$

Na qual, os valores de X_m são os valores máximos de concentração de biomassa de cada cultivo e X_o é o valor inicial de concentração de biomassa (300 mg L⁻¹).

2 - Carboidratos em biomassa de *A. braunii*

Para a detecção de carboidratos utilizou-se um método colorimétrico simples e robusto que permite determinar virtualmente todos os carboidratos da biomassa de *A. braunii* (10 %, m/v)). Este ensaio baseia-se no método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Nielson (2009). Deste modo, para a determinação espectrofotométrica dos glicídios, a 490 nm, recorreu-se a um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis, para além do vórtex Stuart Scientific Autovortex SA6. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e monitorizados a 25 °C. Os padrões, de grau analítico, utilizados foram D-glucose da Himedia Laboratories, D-galactose da VWR Chemicals e uma mistura contendo D-glucose e D-galactose (1:1), numa gama de concentrações entre 10-50 µg mL⁻¹. O ácido sulfúrico 95,0-97,0 %) utilizado foi adquirido na Sigma-Aldrich e o fenol na VWR Chemicals.

A produtividade de carboidratos (P_{CHO} , mg L⁻¹ d⁻¹) no cultivo foi calculada com a equação 2.

$$P_{CHO} = \frac{(X_m * CHO)}{(100 * T_c)} \quad (2)$$

Onde, X_m representa os valores máximos de concentração de biomassa (mg L⁻¹); CHO , a concentração de carboidratos (%) e T_c é o tempo de cultivo (d).

Resultados e Discussão

1 - Cultivo de *A. braunii*

Considerando o cultivo de microrganismos fotossintéticos, existem muitos estudos do uso de diferentes fontes de nitrogénio no cultivo de *Arthrospira platensis*.

ra platensis cultivation. The best results for biomass production have been attributed to the use of nitrates, thus confirming the wide utilization of cultivation medium containing KNO_3 (Rodrigues, Ferreira, Converti, Sato & Carvalho, 2010) and NaNO_3 (Schlösser, 1982; Morocho-Jácome, Sato, Guimarães, Knysak, Carvalho, 2015) as nitrogen sources in batch culture, with a typical initial nitrate concentration between 1.6–1.8 g L^{-1} . However, a previous study for *A. braunii* cultivation used 2–20 mM NaNO_3 (Bresaola, 2016). In this study, we used the culture medium recommended by the strain provider (UTEX) but with an increment in the amount of NaNO_3 (from 8.82 to 10.0 mM), to guarantee no nitrogen deficiency in this cultivation that allowed a highest biomass productivity (Bresaola, 2016).

The results described at Table 1 show the maximum biomass concentration (X_m) and the biomass productivity (P_x) reached at 6th day cultivation.

Os melhores resultados na produção de biomassa foram atribuídos ao uso de nitratos, confirmando à sua ampla utilização nos meios de cultivo contendo KNO_3 (Rodrigues, Ferreira, Converti, Sato & Carvalho, 2010) and NaNO_3 (Schlösser, 1982; Morocho-Jácome, Sato, Guimarães, Knysak, Carvalho, 2015) como fontes de nitrogénio em cultivos em batelada, com as concentrações iniciais típicas entre 1,6–1,8 g L^{-1} . No entanto, o estudo prévio no cultivo de *A. braunii* usou 2–20 mM NaNO_3 (Bresaola, 2016). Neste estudo, foi usado o meio de cultivo recomendado pelo provedor da cepa de microalgae (UTEX) mas com um incremento na quantidade de NaNO_3 (de 8.82 até 10.0 mM), para evitar deficiência de nitrogénio no cultivo que permitiu a máxima produtividade de biomassa (Bresaola, 2016).

Os resultados descritos na Tabela 1 apresentam os valores de concentração máxima de biomassa (X_m) e da produtividade de biomassa (P_x) atingidos no sexto dia de cultivo.

Table 1 / Tabela 1 - *Ankistrodesmus braunii* growth in Bold medium modified with 10 mM NaNO_3 using tubular photobioreactors (PBR) in batch cultivations. The error corresponds to the SD (n=2)/ Crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em meio Bold modificado com 10 mM NaNO_3 usando fotobioreatores tubulares em cultivos em batelada. O erro corresponde ao desvio padrão (n=2).

NaNO_3 (mM)	X_m (mg L^{-1})	P_x ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
10	1249 ± 72	165 ± 13

Table 2 / Tabela 2 - Equations for calibration curves for total carbohydrates in microalgae biomass expressed as glucose, galactose and glucose+galactose (1:1). Results in percentage and productivity are means of triplicate measurements with SD/ Equações para as curvas de calibração de carboidratos totais nas biomassas de microalgas expressos como glucose, galactose e glucose+galactose (1:1). Os resultados em percentagens e produtividade são a média da triplicata com o desvio padrão.

Variable/ Variável	Equation/ Equação	R^2	Carbohydrates/ Carboidratos (%)	Productivity / Produtividade ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
Glucose	$y = 0.1270x + 0.044$	0.9959	1.23 ± 0.02^A	2.57 ± 0.04^D
Galactose	$y = 0.0083x + 0.0067$	0.9983	1.98 ± 0.03^B	4.12 ± 0.06^E
Glucose+ Galactose	$y = 0.0106x + 0.008$	0.9967	1.55 ± 0.02^C	3.22 ± 0.05^F

2 - Carbohydrates in the *A. braunii* biomass

Table 2 shows the results for carbohydrates amounts in *A. braunii* biomass as well as carbohydrates productivity expressed as glucose, galactose and glucose+galactose (1:1). Since the batch culture was not carried out under nitrogen deficient conditions, the carbohydrate productivity in this process could present low values.

In microalgae, nitrogen depletion during cultivation can transform proteins or peptides into lipids or carbohydrates as energy reserve components. Under stress environments (e.g., nitrogen or light depletion), there is competition between lipids and carbohydrates synthesis because the metabolic pathways of synthesis and degradation of compounds considered rich in energy are closely linked (Ho, Chen & Chang, 2012).

Since, there are no reports about carbohydrates amounts in *A. braunii* cultivation in the literature, we could suggest no nitrogen depletion during cultivation to produce the maximum biomass productivity in a batch process using the conditions applied in this work.

Conclusions

The microalgae *A. braunii* was successfully cultivated in tubular photobioreactors. Carbohydrates productivity of *A. braunii* expressed in terms of glucose, galactose and glucose+galactose (1:1) had statistically different values. Due to the robustness of the method used to measure carbohydrates levels, it is suggested the use of this methodology for the quantitative determination of carbohydrates in other species of microalgae. Finally, we are evaluating the incorporation of carbohydrates from *A. braunii* biomass produced in tubular photobioreactors in cosmetic formulations.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to São Paulo Research Foundation (FAPESP, Processes 2015/11194-6 and 2016/22000-0) for the financial support.

Conflict of interests

The author declares that there is no personal or financial relationship that can be understood as presenting a potential conflict of interest.

2 - Carboidratos na biomassa de *A. braunii*

A Tabela 2 apresenta as quantidade de carboidratos na biomassa de *A. braunii* bem como a produtividade de carboidratos expressa como glicose, galactose e glicose+galactose (1:1). Devido ao facto de o cultivo em batelada não ter sido realizado em deficiência de nitrogénio, a produtividade de carboidratos neste processo poderia ter apresentado valores baixos.

Nas microalgas, a depleção de nitrogénio durante o cultivo pode transformar as proteínas ou peptídeos em lípidos ou carboidratos como composto de reserva energética. Sob ambientes de stress (i.e., depleção de nitrogénio ou luz), existe uma competitividade entre a síntese de lípidos e de carboidratos, pois as vias metabólicas de síntese e degradação de compostos considerados energeticamente ricos são muito relacionadas (Ho, Chen & Chang, 2012).

Devido à inexistência de dados na literatura relativas às quantidades de carboidratos no cultivos de *A. braunii*, não recomendamos uma depleção na quantidade de nitrogénio durante o cultivo de modo a atingir a máxima produtividade de biomassa no processo em batelada sob as condições aplicadas neste trabalho.

Conclusões

A microalga *A. braunii* foi cultivada em fotobioreactor tubular. A produtividade dos carboidratos de *A. braunii* expressos em termos de glucose, galactose e glucose+galactose (1:1) teve valores estatisticamente diferentes. Devido à robustez do método utilizado para medir os níveis de carboidratos, sugerimos a utilização desta metodologia para a determinação quantitativa de carboidratos em outras espécies de microalgas. Por fim, estamos avaliando a incorporação dos carboidratos da biomassa de *A. braunii* produzida em fotobioreatores tubulares em formulações cosméticas.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos 2015/11194-6 e 2016/22000-0) pela ajuda financeira.

Conflito de interesses

O autor declara não existir qualquer relação pessoal ou financeira que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- (1) Bresaola MD. Avaliação do crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em reator tubular empregando diferentes concentrações de nitrato em diferentes condições de cultivo. Dissertação para obtenção do grau de MESTRE, 2016. Faculdade de Ciências Farmacêuticas–Universidade de São Paulo. 71p.
- (2) Ho SH, Chen CY, Chang JS. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour Technol* 2012; 113: 244–252.
- (3) Rismani-Yazdi H, Haznedaroglu BZ, Bibby K, Peccia J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC Genomics* 2011; 12: 148.
- (4) Chen CY, Zhao XQ, Yen HW, Ho SH, Cheng CL, Lee DJ, Bai FW, Chang JS. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem Eng J* 2013; 78: 1–10.
- (5) Metting FB. Biodiversity and application of microalgae, *Biotechnol Bioeng* 1996; 17: 477–489.
- (6) Barbosa MJ, Hadiyanto WRH. Overcoming shear stress of microalgae cultures in sparged photobioreactors. *Biotechnol Bioeng* 2004; 85: 78–85.
- (7) Mirón AS, Camacho, FG, Gómez, AC, Grima EM, Yusu C. Bubble column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE J* 2000; 46: 1872–1887.
- (8) Morita M, Watanabe Y, Saiki H. Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnol Bioeng* 2000; 69: 693–698.
- (9) Kumar A, Yuan X, Sahu AK, Ergas SJ, Van Langenhove H. Hollow fiber membrane photo-bioreactor for CO₂ sequestration from combustion gas coupled with wastewater treatment: a process engineering approach. *J Chem Technol Biotechnol*, 2010; 85, 387–394.
- (10) Carvalho JCM, Francisco, FR, Almeida KA, Sato S & Converti A. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. *J Phycol* 2004; 40: 589–597.
- (11) Carvalho JCM, Matsudo M, Bezerra RP, Ferreira-Camargo LS & Sato S. Microalgae Bioreactors. In: Bajpai R., Prokop A., Zappi M. (Eds.) *Algal Biorefineries* 2014. Springer, Dordrecht.
- (12) Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol* 2000; 27: 631–635.
- (13) UTEX. The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin [Online]. Available: <http://www.sbs.utexas.edu/utex/> [11 October 2016].
- (14) Nielsen S.S. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. In: Nielsen S.S. (Eds.) *Food Analysis Laboratory Manual*. Food Science Texts Series. Springer, Boston, USA. 2010.
- (15) Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresour Technol* 2010; 101: 4491–4498.
- (16) Schlösser UG. Sammlung von Algenkulturen. *Ber Dtsch Bot Ges* 1982; 181–276.
- (17) Morocho-Jácome AL, Sato S, Guimarães LLC, Knysak C, Carvalho JCM. Simultaneous use of sodium nitrate and urea as nitrogen sources improves biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in a tubular photobioreactor. *Eng Life Sci* 2016; 16: 338–347.