

Utilização do resíduo de malte da indústria cervejeira como meio alternativo para o cultivo da *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima*

Use of malt residue from the brewing industry as an alternative medium for growing *Spirulina platensis* and *Spirulina máxima*

Uso de residuos de malta de la industria cervecer como medio alternativo para el cultivo de *Spirulina platensis* y *Spirulina máxima*

Recebido: 20/11/2022 | Revisado: 04/12/2022 | Aceitado: 05/12/2022 | Publicado: 14/12/2022

Roberta Conceição Ribeiro Varandas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5494-5080>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: robertacoriva@hotmail.com

Andressa Coimbra Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6240-0809>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: andressa.coimbrap@hotmail.com

Vilma Barbosa da Silva Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9973-4060>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: vilmaengenheira2@gmail.com

Patrícia de Moura Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2848-3847>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: patricia_moura_almeida@hotmail.com

Nyelson da Silva Nonato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2208-2265>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: nyelsonnonato@gmail.com

Maria Helena Juvito da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3355-2373>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: helenajuvito@gmail.com

Luís Celso Cardoso de Pina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7123-1197>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: luiscelso91@hotmail.com

Viviane Pereira Tibúrcio Hamdan

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3440-0339>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: vivianetiburcio@yahoo.com.br

Cristiane Francisca da Costa Sassi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4980-1779>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: cfcosta_ccosta@yahoo.com

Marta Maria da Conceição

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2654-2276>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: martamaria8@yahoo.com

Resumo

Espécies pertencentes ao gênero *Spirulina* estão entre os microrganismos fotossintéticos de maior importância comercial. Este trabalho teve como objetivo avaliar o cultivo da *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima* com substituição parcial de meio sintético por meio de cultura de baixo custo RM (resíduo de malte de cevada) bem como extrair compostos bioativos aplicáveis a indústria de alimentos. Foram avaliados os parâmetros de crescimento, composição da biomassa, concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos graxos, extração de ficocianina, polissacarídeos e monossacarídeos. Os cultivos utilizando RM na concentração de 50% obtiveram crescimento equivalente ao controle. O teor de clorofila foi superior para as duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio controle. Os teores de ficocianina foram superiores para *Spirulina platensis*. Os maiores teores proteicos foram encontrados para *Spirulina platensis* (55,9g 100g⁻¹) seguida da *Spirulina maxima* (53,3g 100g⁻¹) cultivadas em

RM. Os ácidos polinsaturados linoleico e alfa-linolênico apresentaram percentuais mais elevados nas cepas cultivadas em RM. O teor de PUFA foi maior nos cultivos em meio RM, variando de 57 a 59%. A extração de polissacarídeos com água quente/ultrassom apresentou maiores valores nas duas espécies cultivadas em meio RM variando de 8,3 a 11,2%. O teor de exopolissacarídeos destacou-se no cultivo com meio RM (191 a 193mg·L⁻¹) para ambas as espécies. Os resultados obtidos evidenciam que a utilização de resíduo de malte como substituto parcial ao meio controle é adequada como meio alternativo para o cultivo das *Spirulinas platensis* e *maxima*. Além disso, destaca-se o potencial de seus compostos bioativos para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: Microrganismos; Fotossintéticos; Resíduo; Cultivo.

Abstract

Species belonging to the genus *Spirulina* are among the most commercially important photosynthetic microorganisms. This work aimed to evaluate the cultivation of *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima* with partial replacement of synthetic medium by RM (barley malt residue) as well as to extract bioactive compounds applicable to the food industry. Growth parameters, biomass composition, concentrations of proteins, carbohydrates, lipids, fatty acids, phycocyanin extraction, polysaccharides and monosaccharides were evaluated. The cultures using RM at a concentration of 50% obtained growth equivalent to the control. The chlorophyll content was higher for the two *Spirulina* species grown in the control medium. Phycocyanin levels were higher for *Spirulina platensis*. The highest protein contents were found for *Spirulina platensis* (55.9g 100g⁻¹) followed by *Spirulina maxima* (53.3g 100g⁻¹) cultivated in RM. The polyunsaturated linoleic and alpha-linolenic acids showed higher percentages in the strains cultivated in MR. The PUFA content was higher in cultures in RM medium, ranging from 57 to 59%. The extraction of polysaccharides with hot water/ultrasound showed higher values in the two species grown in RM medium, ranging from 8.3 to 11.2%. The content of exopolysaccharides was highlighted in the culture with RM medium (191 to 193mg·L⁻¹) for both species. The results show that the use of malt residue as a partial substitute for the control medium is suitable as an alternative medium for the cultivation of *Spirulinas platensis* and *maxima*. In addition, the potential of its bioactive compounds for the food industry is highlighted.

Keywords: Photosynthetic; Microorganisms; Residue; Cultivation.

Resumen

Las especies pertenecientes al género *Spirulina* se encuentran entre los microorganismos fotosintéticos de mayor importancia comercial. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el cultivo de *Spirulina platensis* y *Spirulina maxima* con reemplazo parcial de medio sintético por medio de cultivo RM (barley malt residuo) de bajo costo, así como extraer compuestos bioactivos aplicables a la industria alimentaria. Se evaluaron parámetros de crecimiento, composición de la biomasa, concentraciones de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, extracción de ficocianinas, polisacáridos y monosacáridos. Los cultivos que utilizaron RM a una concentración del 50% obtuvieron un crecimiento equivalente al control. El contenido de clorofila fue mayor para las dos especies de *Spirulina* cultivadas en el medio de control. Los niveles de ficocianina fueron más altos para *Spirulina platensis*. Los mayores contenidos de proteína se encontraron para *Spirulina platensis* (55,9g 100g⁻¹) seguida de *Spirulina maxima* (53,3g 100g⁻¹) cultivada en RM. Los ácidos poliinsaturados linoleico y alfa-linolénico presentaron mayores porcentajes en las cepas cultivadas en MR. El contenido de PUFA fue mayor en los cultivos en medio RM, variando del 57 al 59%. La extracción de polisacáridos con agua caliente/ultrasonido mostró valores superiores en las dos especies cultivadas en medio RM, variando de 8,3 a 11,2%. Se destacó el contenido de exopolisacáridos en el cultivo con medio RM (191 a 193mg·L⁻¹) para ambas especies. Los resultados muestran que el uso de residuos de malta como sustituto parcial del medio control es adecuado como medio alternativo para el cultivo de *Spirulinas platensis* y *maxima*. Además, se destaca el potencial de sus compuestos bioactivos para la industria alimentaria.

Palabras clave: Microorganismos; Fotosintéticos; Residuo; Cultivo.

1. Introdução

Na indústria de alimentos, há uma demanda crescente por vários componentes de ação natural, como pigmentos, proteínas e vitaminas, a fim de substituir as contrapartes sintéticas e aumentar o valor nutricional dos produtos alimentícios (Shabana *et al.*, 2017).

Além de exigir produtos com alto valor nutricional e benefícios à saúde, os consumidores estão buscando cada vez mais ingredientes e/ou produtos mais naturais (Vigani *et al.*, 2015). As microalgas são excelentes fontes naturais de compostos bioativos altamente valiosos e se tornaram as mais promissoras e inovadoras fontes de novos alimentos e produtos funcionais no século XXI (Matos *et al.*, 2017). O mercado global de produtos derivados de microalgas, usados especialmente para nutracêuticos, suplementos alimentares e de ração, registram uma taxa de crescimento anual de 5,8% no período 2017-2026, onde espera-se atingir mais de 53 bilhões de dólares (Credence Research, 2018).

O gênero *Spirulina* (*Arthrospira*) representa entre as microalgas de maior importância comercial. É responsável por mais de 30% da biomassa produzida globalmente devido à alta concentração proteica (até 60%) e ao conteúdo de pigmentos (carotenoides, ficocianinas, clorofila), ácidos graxos insaturados (ácido linoleico e ácido gama-linolênico GLA), polissacarídeos e antioxidantes. Além disso, sua morfologia celular facilita recuperação de biomassa, o que contribui para a redução de custos do processo (Abd El Baky *et al.*, 2015; Patil *et al.* 2015; Ye *et al.*, 2018). Baseada na sua composição química a *Spirulina* tem sido chamada de super alimento (Mishra *et al.*, 2014). Sendo considerada uma microalga de fácil digestibilidade (Triveti *et al.*, 2015).

Diferentes espécies do gênero *Spirulina* são consumidas em todo o mundo, sendo a *Spirulina* máxima e *Spirulina* platensis as mais utilizadas em virtude dos seus benefícios à saúde (Ghaeni; Roomiani, 2016). São amplamente comercializadas como nutracêuticos em diversos países como Austrália, China, Coreia do Sul, Malásia, Cingapura, Taiwan, EUA, Holanda, Espanha, Portugal, França, Dinamarca, Japão e ainda alguns países da África (Raja *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2018).

Devido à sua ampla utilização na nutrição humana e animal (Asghari *et al.*, 2016), a Food and Drug Administration (FDA) concedeu Certificação GRAS (Generally Recognized as Safe) para *Spirulina* e teve seu consumo autorizado como alimento desde 2003 (Kumar *et al.*, 2018; Enzing *et al.*, 2014). Desde então, a biomassa ou os compostos bioativos da *Spirulina* vem sendo incorporados na elaboração de diversos alimentos como em massas (Fradinho *et al.*, 2020), pães (Khemiri *et al.*, 2020), iogurtes (Patel *et al.*, 2019), barras nutricionais (Kumar *et al.*, 2018) e ainda bebidas isotônicas, cereais, sopas instantâneas, pudim, mistura para bolo em pó (Vaz, 2016). Ressalta-se também sua aplicação como um suplemento dietético (Ye *et al.*, 2018), além da extração de compostos bioativos que podem ser utilizados em diferentes formas, como líquidos, concentrados, extratos, pó ou flocos (Raja *et al.*, 2018), e dessa forma, incrementar nutricionalmente e/ou tecnologicamente o produto final gerando o agregado.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o cultivo da *Spirulina platensis* e da *Spirulina* máxima com substituição parcial de meio sintético por meio de cultura de baixo custo (resíduo de malte), bem como extrair compostos bioativos com possíveis aplicações a indústria de alimentos.

2. Metodologia

2.1 Cultivo de espécies em condições controladas

A *Spirulina platensis* e a *Spirulina* máxima foram obtidas da Coleção de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB). As cepas foram cultivadas em meio alternativo preparado a partir do extrato de biocomposto do resíduo de malte de cevada (RM). O resíduo de malte foi fornecido por uma cervejaria artesanal (Turmalina), localizada no município de Cabedelo – PB. No LARBIM/UFPB foi realizado a compostagem do malte de cevada e posteriormente a preparação do extrato. A cada litro de água destilada foi utilizado 10 mL de extrato com adição de nitrato e fosfato.

As microalgas selecionadas foram cultivadas inicialmente em balões de vidro de 250 mL com 150 mL de meio de cultura preparado com resíduo de malte (RM) nas concentrações de 100%, 50% e 25%. Como controle © utilizou-se o meio Zarrouk no qual também foi usado como diluente nas duas últimas concentrações de RM. Os cultivos foram realizados em triplicatas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia ($150 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 horas. A concentração de partida para o cultivo das microalgas selecionadas foi de 2×10^4 células mL^{-1} .

Após a seleção da concentração do meio de cultivo mais adequado. O cultivo foi realizado em bancada em balões de 6L contendo 5L de meio. O crescimento das culturas foi acompanhado através da fluorescência “in vivo” (Turner Design

Fluorometer). Os seguintes parâmetros de crescimento foram determinados: velocidade de crescimento (k), expressa como o número de divisões celulares por dia (Stein 1973), duração do cultivo (em dias), rendimento final de biomassa e a produtividade de biomassa (PB) por dia.

2.2 Análises da biomassa

Foram feitas determinações (em triplicata) de: proteínas, seguindo Lowry *et al.* (1951); carboidratos, seguindo Kochert (1978); lipídios totais, seguindo Bligh e Dyer (1959); Umidade e cinzas de acordo com AOAC (2016); O perfil de ácidos graxos das espécies foram determinados usando cromatografia a gás, descrita por Menezes *et al.* (2013) e os ésteres metílicos foram expressos em percentuais (%). Clorofila a, b e carotenoides totais seguindo o método de Sumanta *et al.* (2014); Hlaing *et al.* (2019). A extração da ficocianina foi determinada por Ilter *et al.* (2018), com modificações. E a pureza da ficocianina foi realizada através da metodologia de Chentir *et al.* (2018), com modificações. A extração de polissacarídeo foi realizada através de quatro metodologias diferentes descritas por Yu *et al.* (2019). A extração da proteína residual do polissacarídeo foi realizado pelo método SEVAGE (Wu *et al.*, 2017). Os exopolissacarídeos foram extraídos por de De Jesus Raposo *et al.* (2015).

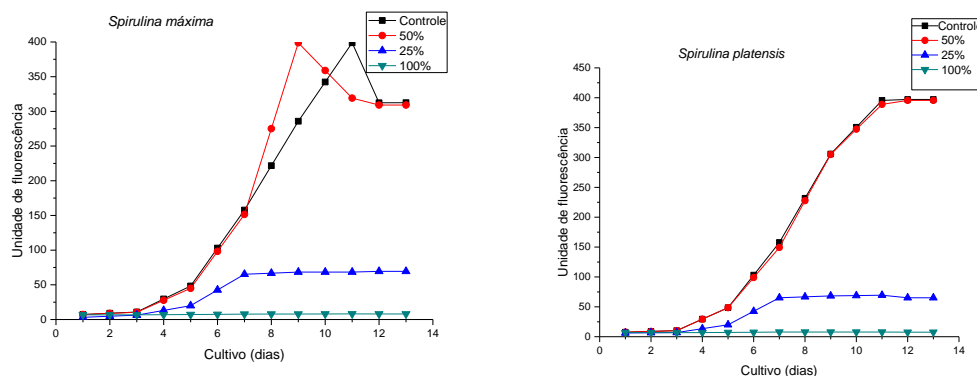
2.3 Análises estatísticas

Os dados da composição química das microalgas foram analisados primeiramente com relação à homocedasticidade das variâncias pelo teste de Levene. Os resultados foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA), seguida de comparações múltiplas do teste HSD Tukey ($p < 0,05$) (Statsoft, 2001).

3. Resultados e Discussão

Os cultivos tiveram duração de 13 dias e mostraram diferenças nas respostas de crescimento entre as espécies. Os maiores crescimentos foram registrados na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* na concentração de 50% de RM com valores equivalentes ao controle (Figura 1).

Figura 1 - Curvas de crescimento obtidas para os cultivos das microalgas estudadas. Valores médios das medidas da fluorescência in vivo de cada amostra.



Fonte: Autores.

Os valores de rendimento de biomassa (Tabela 1) mostraram diferença significativa entre os ensaios variando de 511 a 503 mg.L⁻¹ (*S. platensis* e *S. maxima*, respectivamente). Evidenciando que esse meio alternativo apresenta potencialidade para o cultivo de algumas espécies de microalgas como a *Spirulina sp.* já que obteve uma quantidade considerável de biomassa seca.

Tabela 1 - Parâmetros de crescimento e produtividade das microalgas estudadas nos meios controle e RM.

Cultivos	Biomassa mg.L ⁻¹	PB (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	K (média e desvio padrão)	Duração da fase Log (dias)
<i>S. platensis</i> - C	510 ^a ± 1	39,2	0,69	7
<i>S.platensis</i> -RM	511 ^a ±1	39,3	0,71	7
<i>S. máxima</i> – C	504 ^b ±1	38,7	0,54	6
<i>S.máxima</i> - RM	503 ^b ±1	38,6	0,49	6

Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (p >0,05). Fonte: Autores.

As duas espécies testadas mostraram variações na cinética de crescimento, os melhores desempenhos foram para os cultivos da *Spirulina platensis* cultivadas em meio alternativo com valores que não diferiram significativamente para biomassa (511 mg.L⁻¹) em relação ao controle. As duas espécies ainda apresentaram altos valores de k (0,49-0,69). Vale salientar que o crescimento e a produção de biomassa de *Spirulina sp.* dependem da disponibilidade de nutrientes, pH, luz e temperatura. A composição do meio e seus custos são fatores desafiadores para o cultivo em larga escala viável de microalgas (Soni *et al.*,2019).

Nos dois experimentos com a utilização do meio alternativo não houve diferença significativa em relação ao controle, corroborando com vários estudos utilizando meios alternativos para ao cultivo da *Spirulina sp.* e obtendo crescimento satisfatório. Como dos Santos *et al.* (2016), mostraram respostas de crescimento efetivos com o uso da vinhaça, assim como, Salla *et al.* (2016), com proteína do soro de leite e ainda Michael *et al.* (2019), formularam um meio econômico com utilização de fertilizantes comerciais em substituição parcial do meio Zarrouk. *et al.*, (2020), utilizaram água mineral natural Vinh Hao para diminuir o custo do meio Zarrouk em cultivos com *Spirulina platensis*.

3.1 Análises químicas da biomassa

A Tabela 2 demonstra os teores de Carotenoides, Clorofila a, b e total na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* utilizando meio controle e meio com RM. O teor de clorofila foi superior para as duas espécies de *Spirulina* (8,5-8,7 mg g⁻¹) quando foram cultivadas no meio controle. Valores similares aos encontrados por outros estudos quando cultivaram a *Spirulina sp.* no meio Zarrouk (Nouri *et al.*, 2018; Çelekli *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Clorofila a, b e total e Carotenóides na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* no meio controle e no meio com RM.

Cultivos	Clorofila a (mg g ⁻¹)	Clorofila b (mg g ⁻¹)	Clorofila total (mg g ⁻¹)	Carotenoides (mg g ⁻¹)
<i>S. platensis</i> - Controle	5,2 ^a ±0,2	3,5 ^a ±0,1	8,7 ^a ±0,1	3,2 ^a ±0,1
<i>S. platensis</i> - RM	2 ^c ±0,1	2 ^b ±0	4 ^b ±0,2	2,5 ^b ±0,1
<i>S. máxima</i> - Controle	4,8 ^b ±0,05	3,7 ^a ±0,1	8,5 ^a ±0,3	3,2 ^a ±0,1
<i>S. máxima</i> - RM	2,1 ^c ±0,1	1,8 ^b ±0,2	3,9 ^b ±0,2	2,1 ^b ±0,1

Nas colunas, letras iguais não tem diferença significativa (p>0,05) Teste de Tukey. Fonte: Autores.

A clorofila é um dos pigmentos dominantes na *Spirulina sp.* que desempenham um papel importante papel na captura da luz como elemento crucial para a fotossíntese Esse pigmento pode ser utilizado pela indústria de alimentos como corante verde natural para substituir a coloração artificial (Munawaroh *et al.*, 2019).

O teor de carotenoides (Tabela 2) foi superior quando as duas espécies estudadas foram cultivadas em meio controle (3,2 mg g⁻¹). Corroborando com Marzorati *et al.* (2020), que obtiveram 3,4 mg g⁻¹ de carotenoides da *Spirulina platensis* cultivada no meio Zarrouk.

Estudos demonstraram que a suplementação da *Spirulina sp.* na dieta de codornas e frangos levaram ao aumento dos níveis de carotenoides e consequentemente o aumento da coloração da gema que é um fator primordial para o consumidor e também para indústria de alimentos que preferem gemas com a coloração mais escuras (Roza *et al.*, 2018; Zahroojian *et al.*, 2013). Já Alavi e Golmakani (2017), adicionaram biomassa da *Spirulina sp.* em óleo de oliva e constataram que a presença de carotenóides e do conteúdo de clorofila retardaram a oxidação do azeite.

Tabela 3 - Rendimento das Ficobiliproteínas na *Spirulina platensis* e na *Spirulina máxima* no controle e no meio com RM.

	Ultrassom				Turrac			
	D9C	D9RM	D8C	D8RM	D9C	D9RM	D8C	D8RM
CPC	71,2 ^{Abc} ±1,2	69 ^{ABcd} ±1	67 ^{Bd} ±1	2,1 ^{Ce} ±0,1	73,8 ^{Aa} ±1,5	72,4 ^{Aa} ±0,5	71,6 ^{Aab} ±0,5	3,7 ^{Ce} ±0,2
APC	11,5 ^{Ab} ±0,5	9,4 ^{Bc} ±0,5	9,7 ^{Bc} ±0,6	0,3 ^{Cd} ±0,1	13,3 ^{Aa} ±0,5	12,7 ^{Aab} ±0,6	12 ^{Aab} ±1	0,8 ^{Bd} ±0,1
PE	3,2 ^{Abc} ±0,3	3,3 ^{Ab} ±0,2	2,6 ^{Bcd} ±0,1	0,2 ^{Ce} ±0,1	4,3 ^{Aa} ±0,1	3,8 ^{Aab} ±0,2	2,4 ^{Bd} ±0,4	0,4 ^{Ce} ±0,1
PBP	85,9 ^{Ac} ±0,7	82 ^{Bb} ±0,7	79,3 ^{Ce} ±0,3	2,6 ^{Dg} ±0,7	91,2 ^{Aa} ±0,3	88,9 ^{Bb} ±0,9	86,3 ^{Cc} ±0,5	4,9 ^{Df} ±0,6

Nas linhas letras maiúsculas comparação entre as espécies e um método de extração. Nas linhas letras minúsculas comparação entre as espécies e os dois métodos de extração APC- Aloficocianina, CPC- Concentração de ficocianina, PE-ficoeritrina; PBP- Ficobiliproteína. Fonte: Autores.

As ficobiliproteínas (PBP) são compostas por C-ficocianina (CPC), aloficocianina (APC) e fitoeritrina (PE). A Tabela 3 demonstra a extração de ficobiliproteínas em termos de rendimento e índice de pureza sob diferentes condições de extração. Entre as ficobiliproteínas, a C-ficocianina (CPC) foi o componente majoritário em todos os experimentos. Os resultados mostraram que a concentração de CPC, APC, PE e PBP estavam na faixa de 2,1 a 72,4; 0,3 a 13,3; 0,2 a 4,3; 2,6 a 91,2 (mg/) respectivamente.

Os teores de ficocianina foram mais elevados independente do método de extração para *Spirulina platensis* no meio controle (73,8 mg g⁻¹) e no meio RM (72,4 mg g⁻¹) não possuindo diferença significativa entre os dois. Valores similares foram encontrados por Ilter *et al.* (2018), com 74,7 mg g⁻¹ e por Prates *et al.* (2018) com 83,7 mg g⁻¹ de ficocianina da *Spirulina platensis* em meio Zarrouk. Vale salientar que vários estudos têm utilizado eficientemente meios alternativos para produção de ficocianina como resíduos de alimentos de restaurantes ou padarias (Sloth *et al.*, 2017), água residual do cultivo de camarão (Sandeep *et al.*, 2015), extratos de broto de feijão (Dianursanti *et al.*, 2018) extratos de conchas de ostras e solo (Jung *et al.*, 2014). Evidenciando a eficiência dos meios alternativos já que o crescimento e a produção de ficocianina de *Spirulina platensis* são altamente dependentes da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura (Amanatin *et al.*, 2013). Comprovando a eficácia da utilização do resíduo de malte como meio alternativo já que os resultados do presente estudo obtiveram altos teores de ficocianina quando cultivaram as espécies de *Spirulina sp.*

A extração de ficocianina têm sido o foco por muitos anos, resultando em diversas estratégias que levam a resultados diferentes (Cevallos & Ortega, 2016; Song *et al.*, 2013; Tavanandi *et al.*, 2018; Chia *et al.*, 2019). No presente estudo pôde-se constatar que o rendimento através da extração do Turrac foi superior para maioria dos experimentos para extração de ficocianina, podendo afirmar que é um método eficiente de ruptura celular de *Spirulina sp.* para obtenção da ficocianina.

No tocante ao índice de pureza, observou-se que em todos os experimentos o resultado ficou acima de 0,7 após ser realizada a purificação. Resultado este adequado ao uso em alimentos (Antelo *et al.*, 2015, Güroy *et al.*, 2017). Geralmente um alto teor de pureza requer técnicas de purificação com alto custo como sulfato de amônio (Izadi e Fazilati 2018), sistemas aquosos bifásicos (Ruiz *et al.* 2018), porém essas técnicas podem levar também a uma perda significativa da substância. Enfatizando assim a eficiência do uso da membrana de diálise utilizada no presente estudo como metodologia de purificação. Brião *et al.* (2020), também demonstraram que quando utilizaram uma etapa de diafiltração obtiveram uma pureza maior de grau alimentício para a ficocianina extraída da *Spirulina platensis*.

Apesar da diálise não ser frequentemente adotada na literatura, no entanto, apresenta muitas vantagens em comparação com outros métodos de purificação em termos de economia de custos, fator primordial para indústria (Janoschka *et al.*, 2015).

O índice de pureza é altamente influenciado por vários fatores, como proporção de biomassa / líquido, métodos de secagem de biomassa, métodos de extração, temperatura de extração, pH, tipo e concentração da extração (Chentir *et al.*, 2018). Diferentes autores avaliaram a purificação da ficocianina da *Spirulina sp.* cultivada em meios alternativos como Leema *et al.* (2010), obteve 0,78 quando cultivaram a *Spirulina platensis* em água do mar. Chentir *et al.* (2018), cultivaram a *Spirulina platensis* em meio Zarrouk e obtiveram 0,77.

Considerando que a extração de ficocianina é um tecnologia simples e de baixo custo, é de particular interesse investigar sua usabilidade em um contexto industrial e aplicado para usá-lo como alimento funcional ou aditivos alimentares (Chen *et al.*, 2017). As ficobiliproteínas podem ser usadas na produção de fermentados laticínios, sorvetes, refrigerantes, decoração de bolos doces, leite shakes, et (Sonani *et al.*, 2016). Extratos de ficocianina de *Spirulina platensis* foram introduzidos no cozimento de biscoitos para aumentar o teor de fibras e proteínas (Singh *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Composição química da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* nos meios de cultivo Controle e RM.

Cultivo	Carboidratos (g 100 g ⁻¹)	Proteína (g 100 g ⁻¹)	Lipídios (g 100 g ⁻¹)
<i>S.platensis</i> – Controle	15 ^b ± 0,2	50,1 ^c ±0,1	12 ^c ± 0,1
<i>S.platensis</i> - RM	16,9 ^a ± 0,1	55,9 ^a ±0,9	13,9 ^a ± 0,8
<i>S.máxima</i> - Controle	12,8 ^c ±0,2	49,8 ^c ±0,7	13,9 ^a ±0,7
<i>S.máxima</i> – RM	17,2 ^a ± 0,7	53,3 ^b ±0,3	12,3 ^{b,c} ±0,5

Fonte: Autores.

Os teores de proteínas, carboidratos e lipídios das microalgas estudadas estão expressos na Tabela 4. Os teores de proteína determinados nas microalgas estudadas foram consideravelmente altos nas duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio alternativo com *Spirulina platensis* (55,9 g 100 g⁻¹) seguida da *Spirulina máxima* (53,3 g 100 g⁻¹) os valores encontrados no meio controle apesar de mais baixos se encontram dentro da média esperada pelo gênero que é de 50 a 70% de proteína dessa microalga (Manirafasha *et al.*, 2016). Michael *et al.* (2019), obtiveram 65% de proteína cultivando em meio Zarrouk, já em um meio otimizado com menos reagentes registraram 52% de proteína.

A fração proteica na *Spirulina sp.* é reconhecida por sua excelente composição em termos de aminoácidos essenciais (García *et al.*, 2012) Além disso, quando comparado com fontes tradicionais de proteínas, como carne ou soja, a biomassa de microalgas tem as vantagens de um rápido crescimento celular, custos de cultura reduzidos e falta de concorrência com outros tipos de produção de alimentos. Dessa forma, o uso de *Spirulina sp.* como fonte de proteína para a dieta humana é uma alternativa sustentável que pode ser usada para satisfazer a crescente demanda mundial. As proteínas da *Spirulina sp.* ainda podem ser aplicadas na formulação de alimentos produtos sob a forma de emulsões, espumas ou ainda gel (Zhang *et al.*, 2018; Benelhadj *et al.*, 2016).

Vale salientar ainda que a OMS o designou a *Spirulina sp.* como "Alimento do Futuro" por causa de seu alto teor de proteínas e rápido crescimento. Além disso, também é chamado de "super alimento" ou "alimento maravilhoso" e vários estudos científicos publicados revelam como ele estimula o sistema imunológico e melhora a saúde. É aprovado na Rússia como 'Alimento medicinal para o tratamento de efeitos induzidos por radiação, enquanto a NASA o considerava um "melhor alimento" para viagens espaciais, pois sua pequena quantidade contém uma variedade de nutrientes (Sinha *et al.*, 2018).

O teor de carboidratos de todos os cultivos se manteve dentro da média esperada para a *Spirulina sp.* As duas espécies de *Spirulina sp.* demonstraram um aumento da produção de carboidrato quando cultivada em meio com RM em relação ao meio controle. Quando cultivada em meio controle as espécies de *Spirulina* tiveram o teor de carboidrato de 13-14 g 100 g⁻¹. Salla *et al.* (2016), utilizaram o mesmo meio controle e cultivaram a *Spirulina sp.* e obtiveram 14,94% de carboidrato.

Outros estudos com utilização de meios alternativos como água salobra (Duarte *et al.*, 2020) obtiveram aumento no teor de carboidrato quando comparada com o controle. Demonstrando que o resíduo de malte pode ser utilizado como meio alternativo para a *Spirulina sp.* podendo utilizar sua biomassa para extração de compostos bioativos como polissacarídeos, exopolissacarídeos e outros, ou ainda suplementação humana e animal.

Os carboidratos produzidos pelas microalgas servem como um componente estrutural nas paredes celulares e como um componente de armazenamento dentro da célula (Markou *et al.*, 2012).

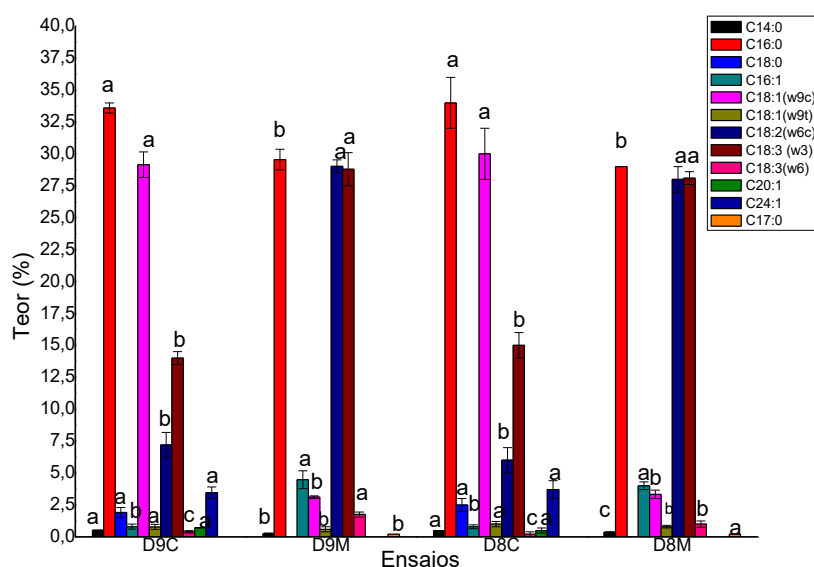
O teor de lipídios das espécies de *Spirulina* variou de 12 a 13,9 g 100 g⁻¹ em meio RM e o controle. Resultado superior ao encontrado por Pohndorf *et al.* (2016), que cultivaram a *Spirulina sp.* e obtiveram 5,8% de lipídio.

O óleo de microalgas ainda pode ser uma alternativa viável ao óleo de peixe já que o vegano não consome esse produto e o cheiro desagradável produzido a partir de óleo de peixe não é adequado para ser usado como

ingrediente alimentar (Tang *et al.*, 2020). E o mercado estimado de óleos a partir de microalgas pode chegar a US \$ 898,7 milhões em 2025 (Hu, 2019).

A *Spirulina platensis* apresentou um total de 60 mg/g de ésteres totais no meio controle e no meio RM 62mg/g. Já a *Spirulina máxima* apresentou 55mg/g no controle e no meio RM 52 mg/g de ésteres totais. Ocorre uma diversificação dos ácidos graxos no que se refere às variações do comprimento das cadeias, geralmente entre quatorze e vinte e quatro carbonos, e ainda nos teores de insaturações (Figura 2).

Figura 2 - Perfil de ácidos graxos da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* cultivada no meio controle e no meio RM.



Colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$). Fonte: Autores.

Entre os ácidos graxos, o ácido palmítico (C16:0) predominou em todos os ensaios, com concentrações variando de 29 a 34%. Sendo o maior percentual encontrado na *Spirulina máxima* cultivada no meio controle. Resultados similares foram encontrados por Tai *et al.* (2016), 37,5% e por Hadyanto *et al.* (2018), 34,6 % cultivando a *Spirulina sp.*

Entre os ácidos graxos monoinsaturados, os teores dos ácidos oleico (C18:1 w9- c) também esteve presente em todas as espécies e condições de cultivo, porém foram superiores nas espécies quando cultivadas em meio Controle com concentrações variando de 29 a 30%.

No que concerne aos ácidos polinsaturados, o ácido linoleico (C18:2w6-c) e ácido alfa-linolênico (c18:3 w3), os resultados nas condições de cultivo com RM mostraram sempre os maiores teores, indicando melhor efetividade com esse meio alternativo na produção destes dois tipos de ácidos graxos. Vale ressaltar que o ácido alfa-linolênico é um dos ácidos graxos essenciais usados no tratamento de distúrbios do sistema nervoso, artrite reumatóide, (Navarini *et al.*, 2017). e diabetes (Nunez *et al.*, 2019).

O teor de PUFA foi maior para as duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio RM variando de 57 a 59%. Hultberg *et al.* (2017), obtiveram concentrações maiores de ácidos graxos insaturados na biomassa produzida com o meio à base de efluentes para *Spirulina sp.* Matos (2017); Paliwal *et al.* (2017), afirmam que a quantidade dos PUFAs varia com a espécie e condições de cultivo e ainda que está intimamente relacionada à composição química do meio de cultivo.

Vale salientar que as biomassas da *Spirulina máxima* e da *Spirulina platensis* investigadas no presente estudo podem ser utilizadas na suplementação alimentar por possuir ácidos graxos de alto valor, principalmente as espécies quando foram cultivadas no meio RM. Estudos sugeriram a adição da *Spirulina sp.* em massas

(Mostolizadeh et al., 2017), na suplementação alimentar de trutas (Roohani *et al.*, 2019), de codornas (Boiago *et al.*, 2019), e frangos (Bonos *et al.*, 2016), podendo ser uma estratégia eficiente para introduzir os compostos bioativos e assim produzir produtos funcionais já que a demanda do consumidor por alimentos saudáveis cresce cada vez mais e consequentemente a da indústria de alimentos.

O conteúdo de polissacarídeos da *Spirulina platensis* e *máxima* cultivada no meio controle e no meio RM (tabela 5) variaram de 2,1 a 11,2 % nos diferentes tipos de extração. Variações na composição de polissacarídeos são influenciadas por condições de cultivo, localizações geográficas, época e técnicas de colheita e metodologias de extração. A estrutura química dos polissacarídeos determina suas atividades físicas, químicas, bioquímicas e biológicas (de Jesus Raposo *et al.*, 2015). O potencial biotecnológico dos polissacarídeos tem atraindo cada vez mais atenção principalmente da indústria alimentícia. Contudo, faz-se necessárias pesquisas a respeito da extração desse composto (Kadam *et al.*, 2013).

Tabela 5 - Teor de Polissacarídeos obtido através de diferentes métodos extrações nas biomassas no da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* cultivada no meio controle e RM.

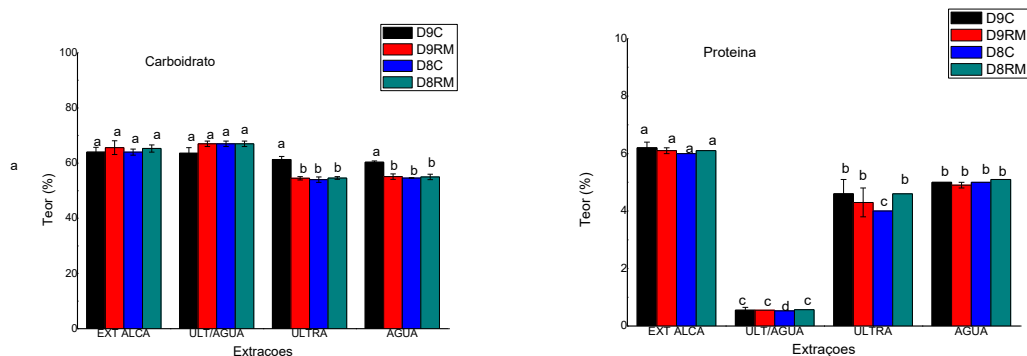
Cultivos	Extrações (%)			
	Ext alcalina	Água quente	Ultrassom	Água quente/ultrassom
Spirulina platensis- C	8,2 ^{C,a} ±0,2	2,6 ^{B,c} ±0,1	6 ^{B,b} ±0,2	8,6 ^{C,a} ±0
Spirulina platensis- RM	10,2 ^{A,a} ±0,2	2,9 ^{AB,c} ±0,2	7 ^{A,b} ±0	10,2 ^{B,a} ±0,3
Spirulina máxima- C	8,7 ^{B,a} ±0,1	2,1 ^{C,d} ±0,2	5,3 ^{C,c} ±0,1	8,3 ^{C,b} ±0,1
Spirulina máxima- RM	10,1 ^{A,b} ±0,2	3,2 ^{A,d} ±0,2	6,5 ^{AB,c} ±0,3	11,2 ^{A,a} ±0,2

Letras maiúsculas- diferença entre as colunas. Letras minúsculas- diferença entre as linhas. Colunas e linhas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (p < 0,05). Fonte: Autoria própria.

Tecnologias de extração estão atraindo interesse das indústrias por causa de suas vantagens (maior rendimento, menor tempo de tratamento e menor custo) em comparação a técnicas convencionais de extração por solvente (Khanra et al., 2018). Das extrações realizadas no presente trabalho evidencia-se que a extração com água quente/ultrassom foi a que apresentou maiores valores nas duas espécies de *Spirulina* cultivadas em meio RM variando de 8,3 a 11,2 %. Esses dados indicam que o cultivo da *Spirulina sp.* em meio RM mostrou-se promissor. Já que a *Spirulina sp.* é uma das cepas mais estudadas para extração de polissacarídeo (Phélippé *et al.*, 2019). Levando a necessidade de cada vez mais pesquisas voltadas para a utilização de meios alternativos para assim diminuir os custos com o cultivo que ainda são um dos principais entraves para o cultivo em larga escala desses microrganismos.

As atividades do polissacarídeo de *Spirulina sp.* variam com a forma e estrutura existentes e, portanto, seu método de extração desempenha papel significativo suas atividades (Dananjaya *et al.*, 2020). A extração desse composto se faz cada vez mais importante já que possuem ação antitumoral, antioxidante, radioprotetor, regulador imunológico, antimicrobiano, e atividades anti-inflamatórias (Kurd & Samavati, 2015).

Figura 3 - Composição química dos polissacarídeos em diferentes métodos de extrações.



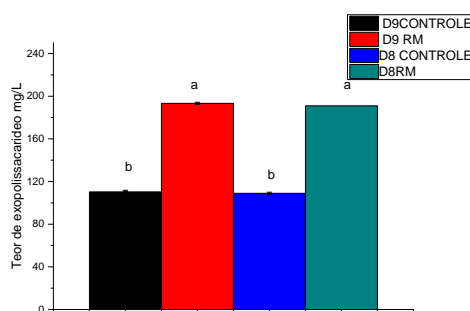
Fonte: Autores.

Os valores de carboidratos obtidos nos polissacarídeos extraídos a partir de diferentes métodos (Figura 3) variando de 55 a 63%. Constatando com Rajasekar *et al.* (2019), que registraram 38,7 % de carboidratos do polissacarídeo extraído da *Spirulina platensis*.

As amostras analisadas mostraram que o menor teor de proteínas foi obtido na extração água/ultrassom e isso se deu devido a metodologia utilizar o método SEVAGE que retira a proteína remanescente do polissacarídeo. Diferente de Rajasekar *et al.* (2019), que obtiveram 21,3 % de proteína de *Spirulina platensis* e não utilizaram método algum para retirar a proteína.

A diversidade evolutiva das microalgas envolve uma enorme complexidade em termos de presença, composição, e organização molecular de biopolímeros estruturais diante disso, os polissacarídeos obtidos a partir de microalgas possuem potencial para serem usados como espessantes na indústria de alimentos. Para ter sucesso ao introduzir esses polissacarídeos como novos hidrocolóides alimentares, a caracterização e funcionalidade devem ser direcionadas para polissacarídeos obtidos a partir da individualidade da cepa. Conhecimentos fundamentais sobre a composição de polissacarídeo pode ajudar a prever a funcionalidade de extratos específicos de polissacarídeos (Bernaerts *et al.*, 2019).

Figura 4 - Teor de Exopolissacarídeos nas biomassas da *Spirulina platensis* e da *Spirulina máxima* cultivada no meio controle e RM.



Fonte: Autores.

As microalgas são produtoras significativas de exopolissacarídeos que variam de $0,5g \cdot L^{-1}$ a $20g \cdot L^{-1}$ (Markou; Nerantzis, 2013). Os resultados desses compostos registrados nessa pesquisa foram maiores no cultivo com meio RM (191 a $193 mg \cdot L^{-1}$) para as duas espécies de *Spirulina* (Figura 4). Evidenciando a possibilidade das espécies desse gênero serem utilizadas para

produção de exopolissacarídeos a partir do cultivo em meio com RM. Estes achados demonstraram que EPS produzidos são influenciadas por muitos fatores, como espécie, linhagem, nutriente, condição de cultivo (Zhang *et al.*, 2016).

A utilização do sobrenadante após a colheita de *Spirulina sp.* é uma alternativa interessante para obter bioprodutos de alto valor como os EPS reaproveitando o que seria descartado (de Jesus Raposo *et al.*, 2015).

A coleta de cepas adequadas com alto rendimento e procedimentos de extração menos complexos podem aumentar o mercado comercial de EPS no futuro próximo. Nos alimentos, o EPS funciona com sucesso como viscosificante agentes, estabilizadores, emulsificantes, gelificantes e agentes de ligação à água (Singh *et al.*, 2019).

4. Conclusão

Parâmetros de crescimento e composição nutricional das biomassas da *Spirulina máxima* e *Spirulina platensis* obiveram resultados iguais ou superiores ao meio de cultura sintético. Os maiores teores proteicos foram encontrados para *Spirulina platensis* seguida da *Spirulina máxima* cultivadas em meio com resíduo de malte. No que concerne aos ácidos polinsaturados, o ácido linoleico (C18:2w6-c) e ácido alfa-linolênico (c18:3 w3), os resultados nas condições de cultivo com RM mostraram maiores resultados quando comparados com o controle. O teor de PUFA foi maior para as duas espécies de *Spirulina* cultivadas no meio RM. Os rendimentos de polissacarídeos e exopolissacarídeos foram superiores para as duas espécies de *Spirulina* quando cultivada no meio RM. Diante dos resultados obtidos, podemos observar que o cultivo da *Spirulina máxima* e da *Spirulina platensis* com meio alternativo utilizando o resíduo de malte decorrente do processo cervejeiro tem potencial para obtenção de compostos de interesse. Podendo ser utilizadas em diversas aplicações voltadas para indústria de alimentos. Que vão desde a introdução da biomassa para enriquecimento proteico em um novo alimento até a utilização de polissacarídeo e exopolissacarídeos como hidrocolóide na indústria alimentícia.

Referências

- Abd El Baky, H. H., El Baroty, G. S., & Ibrahim, E. A. (2015). Functional characters evaluation of biscuits sublimated with pure phycocyanin isolated from *Spirulina* and *Spirulina* biomass. *Nutricion Hospitalaria*, 32(1), 231-241. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.8804>
- Alavi, N., & Golmakani, M.-T. (2017). Antioxidant properties of whole-cell *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) powder expressed in olive oil under accelerated storage conditions. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 2971-2978. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1190-7>
- Amanatin, D. R., Rofidah, E., Rosady, N., & Duratun, S. (2013, December). Produksi protein sel tunggal (pst) *Spirulina sp.* sebagai super food dalam upaya penanggulangan gizi buruk dan kerawanan pangan di Indonesia. In *Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian 2013*. Indonesian Ministry of Research, Technology and Higher Education.
- Antelo, F. S., Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2015). Purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201502621>
- AOAC International (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 935.46. (21th ed.).
- Asgashi, A. Fazilati, M., Latifi, A. M., Salavati, H., & Choopani, A. (2016). *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3, (1).
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H., & Ghorbel, D. (2016). Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate. *Food Chemistry*, 194, 1056-1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.133>.
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey A. M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnol Adv*, 37 (8).
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Boiogo, M. M., Dilkin, J. D., Kolm, M. A., Barreta, M., Souza, C. F., Baldissera, M. D., & Da Silva, A. S. (2019). *Spirulina platensis* in Japanese quail feeding alters fatty acid profiles and improves egg quality: Benefits to consumers. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12860>
- Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Nikolakakis, I., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2016). *Spirulina* as a functional ingredient in broiler chicken diets. *South African Journal of Animal Science*, 46(1), 94-102. <https://doi.org/10.4314/sajas.v46i1.12>

- Brião, V. B., Sbeghen, A. L., Colla, L. M., Castoldi, V., Seguenka, B., Schmidt, G. O., & Costa, J. A. V. (2020). Is downstream ultrafiltration enough for production of food-grade phycocyanin from *Arthrospira platensis*? *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 1129-1140. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02006-1>
- Çelekli, A., Topyürek, A., Markou, G., & Bozkurt, H. (2016). A Multivariate Approach to Evaluate Biomass Production, Biochemical Composition and Stress Compounds of *Spirulina platensis* Cultivated in Wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(4), 728-739. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2128-2>.
- Cevallos, C. G., & Ortega, M. H. (2016). Methods for Extraction, Isolation and Purification of C-phycocyanin: 50 years of Research in Review. *Int. J. Food Nutr. Sci.*, 3. <https://doi.org/10.15436/2377-0619.16.946>
- Chen, X., Wu, M., Yang, Q., & Wang, S. (2017). Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. *Lwt*, 77, 468-474. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.005>
- Chentir, I., Hamdi, M., Li, S., Doumandji, A., Markou, G., & Nasri, M. (2018). Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. *Algal Research*, 35, 395-406. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.005>
- Chia, S. R., Chew, K. W., Show, P. L., Xia, A., Ho, S. H., & Lim, J. W. (2019). *Spirulina platensis* based biorefinery for the production of value-added products for food and pharmaceutical applications. *Bioresource Technology*, 289, 121727. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121727>.
- Credence Research. Algae Products Market By Application (Nutraceuticals, Food & Feed Supplements, Pharmaceuticals, Paints & Coatings, Pollution Control, Others) - Growth, Future Prospects & Competitive Analysis, 2018 - 2026. 2018. Url (<https://www.credenceresearch.com/report/algae-products-market>).
- Dananjaya, S. H. S., Thao, N. T., Wijerathna, H. M. S. M., Lee, J., Edussuriya, M., Choi, D., & Kumar, R. S. (2020). In vitro and in vivo anticandidal efficacy of green synthesized gold nanoparticles using *Spirulina maxima* polysaccharide. *Process Biochemistry*, 92, 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.003>
- Dianursanti, Taurina, Z., & Indraputri, C. M. (2018, February). Optimization growth of *Spirulina platensis* in bean sprouts extract medium with urea fertilizer for phycocyanin production as antioxidant. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1933, No. 1, p. 030014). AIP Publishing LLC.
- Dos Santos, R. R., Araújo, O. Q. F., De Medeiros, J. L., & Chaloub, R. M. (2016). Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource Technology*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.077>
- Duarte, J. H., Cardoso, L. G., de Souza, C. O., Nunes, I. L., Druzian, J. I., de Moraes, M. G., & Costa, J. A. V. (2020). Brackish groundwater from Brazilian backlands in *Spirulina* cultures: potential of carbohydrate and polyunsaturated fatty acid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(3), 907-917. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03126-7>
- Enzing, C., Ploeg, M., & Sijtisma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *Jrc. Scientificand policy reports*.
- Fradinho, P., Niccolai, A., Soares, R., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., & Raymundo, A. (2020). Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. *Algal Research*, 45, 101743. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101743>
- García, J. R., Fernández, F. A., & Sevilla, J. F. (2012). Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 112, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.094>.
- Ghaeni, M., & Roomiani, L. (2016). Review for application and medicine effects of *Spirulina*, microalgae. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 3(2). <https://doi.org/10.18178/joaat.3.2.114-117>
- Güroy, B., Karadal, O., Mantoğlu, S., & Cebeci, O. I. (2017). Effects of different drying methods on C-phycocyanin content of *Spirulina platensis* powder. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(2), 129-132. <https://doi.org/10.12714/egejfas.2017.34.2.02>
- Hadiyanto, H., & Adetya, N. P. (2018). Response surface optimization of lipid and protein extractions from *Spirulina platensis* using ultrasound assisted osmotic shock method. *Food Science and Biotechnology*.10.1007/s10068-018-0389-y
- Hlaing, S. A. A., Sadiq, M. B., & Anal, A. K. (2019). Enhanced yield of *Scenedesmus obliquus* biomacromolecules through medium optimization and development of microalgae based functional chocolate. *Journal of Food Science and Technology*.10.1007/s13197-019-04144-3
- Hu, I. C. (2019). Production of potential coproducts from microalgae. In *Biofuels from algae* (pp. 345-358). Elsevier.
- Hultberg, M., Lind, O., Birgersson, G., & Asp, H. (2017). Use of the effluent from biogas production for cultivation of *Spirulina*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(4), 625-631. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1726-2>
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>
- Izadi, M., & Fazilati, M. (2018). Extraction and purification of phycocyanin from *spirulina platensis* and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity. *Asian Journal of Green Chemistry*, 2(4), 364-379. <https://doi.org/10.22034/ajgc.2018.63597>
- Janoschka, T., Martin, N., Martin, U., Friebe, C., Morgenstem, S., Hiller, H., & Schubert, U. S. (2015). An aqueous, polymer-based redox-flow battery using non-corrosive, safe, and low-cost materials. *Nature*, 527(7576), 78-81. <https://doi.org/10.1038/nature15746>
- Jung, J. Y., Kim, S., Lee, H., Kim, K., Kim, W., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Use of extracts from oyster shell and soil for cultivation of *Spirulina maxima*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(12), 2395-2400. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1216-3>.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4667-4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>.

- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and Bioprocess Processing*, 110, 60-84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>
- Khemiri, S., Khelifi, N., Nunes, M. C., Ferreira, A., Gouveia, L., Smaali, I., & Raymundo, A. (2020). Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. *Algal Research*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101998>
- Kochert, G. (1978). *Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method*. In: Hellembust, J. A., Graigie, J. S. (eds). *Handbook of Phycolgical Methods. Physiological and Biochemical methods*. Cambridge: Cambridge University, p.95-97.
- Kumar, B. R., Deviram, G., Mathimani, T., Duc, P. A., & Pugazhendhi, A. (2019). Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17.
- Kurd, F., & Samavati, V. (2015). Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.005>
- Leema, J. T. M., Kirubakaran, R., Vlnithkumar, N. V., Dheenan, P. S., & high, S. K. (2010). Hight value pigment production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, 101(23), 9221-7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.120>
- Lowry, O. H., et al. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2016). Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 282-296. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532-1542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>
- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631-645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- Marzorati, S., Schievano, A., Idà, A., & Verotta, L. (2020). Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*: supercritical CO₂ and water extraction methods for added value products cascade. *Green Chemistry*, 22(1), 187-196. <https://doi.org/10.1039/C9GC03292D>
- Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food & Function*, 8(8), 2672-2685. <https://doi.org/10.1039/c7fo00409e>
- Menezes, R. S., Leles, M. I. G., Soares, A. T., Franco, P. I. M., AntoniosI Filho, N. R., Sant'ANna, C. L., Vieira, A. A. H. (2013). Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova*, 13, (1), p. 10-15.
- Michael, A., Kyewalyanga, M. S., & Lugomela, C. V. (2019). Biomass and nutritive value of *Spirulina* (*Arthrospira fusiformis*) cultivated in a cost-effective médium. *Annals of Microbiology*, 69, 1387-1395. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01520-4>
- Mishra, P., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2014). *Spirulina* and its nutritional importance: A possible approach for development of functional food. *Biochemical. Pharmacology*, 3, e171. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000e171>
- Mostolizadeh, S., Moradi, Y., Mortazavi, M. S., Motallebi, A., & Ghaeni, M. (2017). Application effects of *Spirulina* powder on the fatty acid and amino acid composition of pasta. *Isff*, 26(4), 119-130.
- Munawaroh, H. S. H., Fathur, R. M., Gumilar, G., Aisyah, S., Yuliani, G., Mudzakir, A., & Wulandari, A. P. (2019). Characterization and physicochemical properties of chlorophyll extract from *Spirulina* sp. *Journal of Physics: Conference Series*, 1280, 022013. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1280/2/022013>
- Navarini, L., Afeltra, A., Gallo Afflitto, G., & Margiotta, D. P. E. (2017). Polyunsaturated fatty acids: any role in rheumatoid arthritis? *Lipids in Health and Disease*, 16(1).10.1186/s12944-017-0586-3
- Nouri, E., Abbasi, H., & Rahimi, E. (2018). Effects of processing on stability of water-and fat-soluble vitamins, pigments (C-phycoyanin, carotenoids, chlorophylls) and colour characteristics of *Spirulina platensis*. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 10(4), 335-349. <https://doi.org/10.3920/QAS2018.1304>
- Núñez, M. V. M., García-Martínez, B. I., Rosado-Pérez, J., Santiago-Osorio, E., Pedraza-Chaverri, J., & Hernández-Abad, V. J. (2019). The Effect of 600 mg Alpha-lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress, Inflammation, and RAGE in Older Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-12.10.1155/2019/3276958
- Paliwal, C., Mitra, M., BHAYAni, K., Bharadwaj, S.V.V., Ghosh, T., Dubey, S., Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>
- Patel, P., Jethani, H., Radha, C., VJjayendra, S. V. N., Mudliar, S. N., Sarada, R., & Chauhan, V. S. (2019). Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of *Spirulina* and its characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 56(8), 3721-3731. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03844-0>
- Patil, S., Al-Zarea, B. K., Maheshwari, S., & Sahu, R. (2015). Comparative evaluation of natural antioxidants spirulina and aloe vera for the treatment of oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(1), 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2014.12.005>
- Phéllippé, M., Gonçalves, O., Thouand, G., Cogne, G., & Laroche, C. (2019). Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 38, 101426. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101426>

- Prates, D. F., Radmann, E. M., Hartwig, J. D., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2018). Spirulina cultivated under different light emitting diodes: enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource. Technology*, 256, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>
- Pohndorf, R. S., Camara, Á. S., Larrosa, A. P. Q., Pinheiro, C. P., Strieder, M. M., & Pinto, L. A. A. (2016). Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. *Biomass and Bioenergy*, 93, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.02>
- Raja, R., Coelho, A., Hemaiswarya, S., Kumar, P., Carvalho, I. S., & ALagarsamy, A. (2018). Applications of Microalgal Paste and Powder as food and feed: An update using Text Mining Tool. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.10.004>
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V., & Carvalho, I. S. (2016). Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 394-405. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.957640>
- Rajasekar, P., Palanisamy, S., Anjali, R., Vinosha, M., Elakkiya, M., Marudhupandi, T., & Prabhu, N. M. (2019). Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. *International journal of biological macromolecules*, 141, 809-821. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.024>
- de Jesus Raposo, M. F., De Morais, A. M. B., & De Morais, R. M. S. C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(5), 2967-3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
- Roohani, A. M., Abedian Kenari, A., Fallahi Kapoorchali, M., Borani, M. S., Zoriezahra, S. J., Smyley, A. H., & Rombenso, A. N. (2019). Effect of spirulina *Spirulina platensis* as a complementary ingredient to reduce dietary fish meal on the growth performance, whole-body composition, fatty acid and amino acid profiles, and pigmentation of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 25(3), 633-645. <https://doi.org/10.1111/anu.12885>
- Roza, L. F., Tavernari, F. C., Surek, D., Sordi, C., Silva, M. L. B., Albino, L. F. T., & Boiago, M. M. (2018) Apparent metabolisable energy and amino acid digestibility of microalgae *Spirulina platensis* as an ingredient in broiler chicken diets. *British Poultry Science*, 59(5), 562-567. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1496401>
- Ruiz, S. C. A., Emmerly, D. P., Wijffels, R. H., Eppink, M. H., & van den Berg, C. (2018). Selective and mild fractionation of microalgal proteins and pigments using aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(9), 2774-2783. <https://doi.org/10.1002/jctb.5711>
- Sandeep, K. P., Shukla, S. P., Vennila, A., Purushothaman, C. S., & Manjulekshmi, N. (2015) Cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in low cost seawater based medium for extraction of value added pigments. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44, (3).
- Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., Colla, L. M., & Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina platensis* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technology*, 209, p. 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.069>
- Shabana, E. F., Gabr, M. A., Moussa, H. R., El-Shaer, E. A., & Ismaiel, M. M. (2017). Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in response to gamma irradiation. *Food Chemistry*, 214, 550-555. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.109>
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499-508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Singh, S., Kant, C., Yadav, R. K., Reddy, Y. P., & ABraham, G. (2019). Cyanobacterial Exopolysaccharides: Composition, Biosynthesis, and Biotechnological Applications. *Cyanobacteria*, 347-358. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814667-5.00017-9>
- Sinha, S., Patro, N., & Patro, I. K. (2018). Maternal protein malnutrition: Current and future perspectives of spirulina supplementation in neuroprotection. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 966. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00966>
- Sloth, J. K., Wiebe, M. G., & Eriksen, N. T. (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.0>
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R., & Madamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 100. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.100>
- Song, W., Zhao, C., & Wang, S. (2013). A large-scale preparation method of high purity C-phycocyanin. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 293-297. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.216>
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina—From growth to nutritional product: A review. *Trends in food science & technology*, 69, 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports*, 5, 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.02.009>
- Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Chew, K. W., Tao, Y., Ho, S. H., & Show, P. L. 2020. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresour. Technol.*, 304. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.122997>
- Tavanandi, H. A., Devi, A. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). A newer approach for the primary extraction of allophycocyanin with high purity and yield from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Separation and Purification Technology*, 204, 162-174. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.057>
- Trinh D. V., & Nguyen P. T. H. (2020). Minimising the Cost of *Spirulina platensis* Culture Medium using Vinh Hao Natural Mineral Water, *Chemical Engineering Transactions*, 78, 19-24. <https://doi.org/10.3303/CET2078004>
- Trivet, J., Aila, M., Bangwal, D., & Kaul, S. (2015). Algae based biorefinery—How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 295-307. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052>

- Vaz, B. S., Moreira, J. B., de Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>
- Salla, A. C. V., Margarites, A. C.; Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. V. (2016). Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technology*, 209, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.069>
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci.* 4, 63–69
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C.(2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>
- Ye, C., Mu, D., Horowitz, N., Xue, Z., Chen, J., Xue, M., & Zhou, W. (2018).Life cycle assessment of industrial scale production of spirulina tablets. *Algal Research*, 34, 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.013>
- Wu, X., Cen, Q., Addy, M., Zheng, H., Luo, S., Liu, Y., Cheng, Y., Zhou, W., Chen, P., & Ruan, R. A. (2019). Novel algal biofilm photobioreactor for efficient hog manure wastewater utilization and treatment. *Bioresource Technol*, 292.
- Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., Liang, Y., & Zhao, S.(2016). Purification and identification of antioxidant peptides fromenzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. *J. Microbiol. Biotechnol*, 26, (7).
- Zahroojian, N., Moravej, H., & Shivazad, M. (2013). Effects of dietary marine algae (*Spirulina platensis*) on egg quality and production performance of laying hens. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, (7), 1353-1360.
- Zhang, X., Yuan, H., Jiang, Z., Lin, D., & Zhang, X. (2018). Impact of surface tension of wastewater on biofilm formation of microalgae *Chlorella sp.* *Bioresource Technology*, 266, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.082>