

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI  
RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

## APPLICAZIONI ALIMENTARI E BENEFICI DELLA SPIRULINA NELLA DIETA MODERNA

Relatore  
Prof. Simone Vincenzi

Laureanda/o  
Elia Lorenzoni  
Matricola n.  
1201708

ANNO ACCADEMICO 2020-2021



## INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>INTRODUZIONE</b> .....	7
<b>CAPITOLO 1: COLTIVAZIONE, SISTEMI DI CRESCITA</b>	
1.1 SISTEMA A STAGNO APERTO.....	11
1.2 FOTOBIOREATTORI.....	12
1.3 SISTEMA IBRIDO.....	13
1.4 PARAMETRI DI CRESCITA.....	15
- 1.4.1 FATTORI CLIMATICI.....	15
- 1.4.2 MEZZI DI CRESCITA.....	16
<b>CAPITOLO 2: COMPOSIZIONE MACROMOLECOLARE DELLA SPIRULINA</b>	
2.1 FICOCIANINA.....	22
- 2.1.1 ISOLAMENTO.....	23
- 2.1.2 PROPRIETÀ FISICO CHIMICHE DI C-PC.....	24
- 2.1.3 STRUTTURA E COMPOSIZIONE AMINOACIDICA.....	25
- 2.1.4 STABILITÀ DI C-PC.....	25
<b>CAPITOLO 3: APPLICAZIONI ALIMENTARI</b>	
3.1 PRODOTTI ALIMENTARI CONTENENTI SPIRULINA.....	28
3.2 SPIRULINA E L'INDUSTRIA DEGLI ALIMENTI FUNZIONALI.....	31
<b>CAPITOLO 4: APPLICAZIONI SALUTISTICHE DELLA SPIRULINA NELLA SINDROME METABOLICA</b>	
4.1 IPERTENSIONE.....	33
4.2 DIABETE.....	35

4.3 OBESITÀ .....	36
<b>CONCLUSIONI</b> .....	39
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	41

## **RIASSUNTO**

La spirulina è una microalga ricca di proteine con un'elevata percentuale di aa essenziali, e risulta essere una fonte ottima di vitamine. La sua coltivazione può essere effettuata in sistemi aperti o chiusi, attraverso l'utilizzo di diversi tipi di fotobioreattori. Viene incorporata in molte formulazioni alimentari, la maggior parte di queste le utilizza come strategia di marketing o come colorante. Tuttavia, la spirulina (e i suoi composti derivati) mostrano il potenziale per essere utilizzati come ingredienti nello sviluppo di nuovi alimenti funzionali. Diversi studi infatti hanno dimostrato il potenziale della spirulina per essere utilizzata nella prevenzione o trattamento dei disturbi legati alla sindrome metabolica. Il presente elaborato ha lo scopo di rivedere le attuali applicazioni e il potenziale di questa microalga nelle industrie alimentari degli alimenti funzionali. È stata rivolta in particolare l'attenzione alla ficocianina estratta da questa microalga, che dimostra avere importantissime applicazioni in ambito alimentare e medico.

## **ABSTRACT**

Spirulina is a protein-rich microalgae with a high percentage of essential aa, and is an excellent source of vitamins. Its cultivation can be carried out in open or closed systems, through the use of different types of photobioreactors. It is incorporated into many food formulations, most of which use them as a marketing strategy or as a colorant. However, spirulina (and its derived compounds) show the potential to be used as ingredient in the development of new functional foods. In fact, several studies have shown the potential of spirulina to be used in the prevention or treatment of disorders related to the metabolic syndrome. This paper aims to review the current applications and potential of this microalgae in the functional food industries. Particular attention was paid to the phycocyanin extracted from this microalgae, which proves to have very important applications in the food and medical fields.



## INTRODUZIONE

I cianobatteri, noti anche come alghe blu-verdi, sono un phylum di microrganismi appartenenti ai batteri, che sono in grado di eseguire la fotosintesi. Per questo motivo, sono generalmente inclusi nel gruppo delle microalghe, sebbene essi siano procarioti e il termine alghe dovrebbe essere limitato agli eucarioti. Questi microrganismi sono generalmente poco conosciuti, ma gli esseri umani devono la vita ai milioni di anni di attività fotosintetica dei cianobatteri: sono stati il primo gruppo di microrganismi che si è evoluto per fissare l'anidride carbonica atmosferica in carbonio organico. Milioni di anni dopo, gli esseri umani continuano a sfruttare la loro capacità di fissare l'anidride carbonica e produrre materia organica coltivandoli in massa per una vasta gamma di applicazioni industriali (Lafarga, 2020).

Spirulina è il nome commerciale usato per descrivere principalmente due specie di cianobatteri: *Arthrospira platensis* e *Arthrospira maxima*. La spirulina è la microalga più coltivata al mondo: oltre il 30% della produzione mondiale di biomassa microalgale proviene dalla spirulina (Costa et al., 2019). La spirulina è nota principalmente per il suo alto contenuto proteico, che si aggira intorno al 60% su base secca (Costa, 2015) e può raggiungere fino al 70% su base secca quando viene coltivata in condizioni non limitate dall'azoto (Danesi et al. 2002). Tuttavia, questa preziosa risorsa è anche una ricca fonte di altri composti ad alto valore aggiunto come clorofille, carotenoidi e ficobiliproteine. Tutti questi sono composti coloranti e hanno potenziali applicazioni nell'industria alimentare come pigmenti. Nonostante non siano stabili come le loro controparti sintetiche, i pigmenti derivati dalla spirulina hanno il vantaggio aggiuntivo di esercitare potenziali benefici per la salute dopo l'ingestione poiché, ad esempio, i carotenoidi costituiscono la provitamina A e il loro consumo è stato associato a un sistema immunitario potenziato e a un rischio ridotto di sviluppare malattie croniche degenerative, malattie cardiovascolari e alcuni tipi di cancro (Lafarga, 2019).

La spirulina è una delle principali tendenze dell'industria alimentare (Lafarga, 2020).

L'essere umano non è estraneo al suo consumo poiché già nel XVI secolo essa veniva raccolta dal Lago Texcoco e consumata nei mercati di Tenochtitlan (oggi Città del

Messico). Solo nel 1967 la spirulina è stata riconosciuta come fonte di cibo per il futuro dall'Associazione Internazionale di Microbiologia Applicata (Costa et al., 2019). Oggigiorno, le microalghe vengono incorporate in molte formulazioni alimentari, portando a un aumento significativo del numero di prodotti alimentari che le contengono (Lafarga, 2020). La maggior parte della biomassa di spirulina prodotta oggi viene consumata come integratore alimentare e promossa come "superfood" e viene venduta sotto forma di polvere secca, scaglie o capsule. Essa, è ampiamente utilizzata in diversi paesi, ed è considerata GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro), senza effetti tossicologici nonché approvata dalla FDA (Food and Drug Administration) e ANVISA (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria). Come mostrato da diversi esperimenti *in vitro* e *in vivo* (Patel et al. 2006), la spirulina è un'ottima fonte per il consumo e l'assorbimento di molecole come ficocianina, pigmenti  $\beta$ -carotene e xantofilla,  $\alpha$ -tocoferolo e composti fenolici che sono responsabili della attività antiossidante di queste microalghe. Inoltre, la maggior parte delle ricerche è concentrata sugli effetti salutari della spirulina come integratore alimentare per l'uomo e sulle applicazioni terapeutiche: effetto anticancro, effetto ipolipemizzante, e effetto protettivo contro diabete e obesità (Lafarga, 2019). Questi vantaggi fanno della spirulina una buona materia prima per gli alimenti funzionali.

La spirulina non ha cellulosa nelle sue pareti cellulari, che sono invece composte da mucopolisaccaridi molli. Questo la rende facilmente digeribile e assimilabile (fino a 85% 95%). Tale caratteristica è particolarmente importante per le persone che soffrono di disturbi intestinali o malassorbimento.

La spirulina può essere utilizzata a qualsiasi età (dall'infanzia all'età adulta), ma il suo valore è particolarmente evidente nel bambino in crescita, durante lo svezzamento e durante il periodo prescolare (da 1 a 6 anni) (Dillon et al. 2014). La spirulina inoltre offre notevoli benefici per la salute dei bambini denutriti. Essendo ricca di beta-carotene, aiuta a risolvere problemi agli occhi causati dalla carenza di vitamina A e fornendo allo stesso tempo il fabbisogno alimentare giornaliero. Il complesso di proteine e vitamine del gruppo B costituisce un importante elemento nutritivo nel miglioramento della dieta del bambino. È l'unico cibo che rappresenta una fonte alternativa al latte materno contenente quantità sostanziali di acidi grassi essenziali,

aminoacidi essenziali e GLA (Acido gamma linoleico) aiutando quindi a regolare l'intero sistema ormonale (Ramesh et al. 2013).

La concentrata composizione nutrizionale della spirulina la rende un integratore alimentare ideale per persone di tutte le età e stili di vita. La spirulina è composta per circa il 60% di proteine altamente digeribili: contiene più beta-carotene di qualsiasi altro alimento naturale ed è il miglior cibo come fonte di acido gamma linolenico (GLA). Inoltre, è ricca di vitamine, minerali, oligoelementi, clorofilla ed enzimi ed è abbondante in altri preziosi nutrienti.

La spirulina è utilizzata in alimenti, medicinali, e cosmetica, e come additivo per patatine, succhi di frutta, salse, miscele di spezie, verdure, zuppe, e altri prodotti.



## **CAPITOLO 1**

### **COLTIVAZIONE, SISTEMA DI CRESCITA**

La coltivazione delle alghe può essere effettuata in sistemi aperti come stagni, laghi o lagune o in un sistema chiuso (Singh et al. 2012). Attualmente, si stanno studiando due importanti tecnologie per la coltivazione della spirulina: fotobioreattori chiusi (PBR) e stagni aperti. Entrambi gli approcci sono utilizzati commercialmente per produrre prodotti di alto valore.

#### **1.1. SISTEMA A STAGNO APERTO**

La coltivazione delle alghe in stagni aperti è stata ampiamente studiata (Vardaka et al. 2016). Gli stagni aperti possono essere classificati in acque naturali come laghi, lagune, stagni e stagni artificiali o contenitori. I sistemi più comunemente usati sono grandi stagni poco profondi, stagni circolari, vasche e stagni a canaletta. I sistemi aperti sono più facili nella costruzione e nel funzionamento, si traducono in bassi costi di produzione e di esercizio. Il principale inconveniente negli stagni aperti include lo scarso utilizzo della luce da parte delle cellule, le perdite per evaporazione e la necessità di grandi spazi. Inoltre, a causa dell'aerazione inefficiente nei sistemi di coltivazione aperti, i tassi di trasferimento di massa sono molto bassi con conseguente diminuzione di produttività della biomassa. La crescita dipende anche dalla posizione, dalla stagione, dalla temperatura, dal livello di pH, dai nutrienti e dall'apporto di anidride carbonica (Cuaresma, 2011). L'altro grande svantaggio del sistema di stagni aperti è la contaminazione da parte della fauna e di altri eterotrofi a rapida crescita.

Questo problema può essere corretto coltivando alghe nelle serre, che le proteggono dalle particelle estranee nell'aria. Una serra di alghe progettata in modo ottimale con i sistemi di ambiente controllato può aumentare la produttività di 10 volte rispetto alla crescita all'aperto. La costruzione della serra include la progettazione e l'ottimizzazione per una migliore resa della biomassa. Le strutture per le alghe ad ambiente controllato stanno guadagnando slancio grazie a rese migliori e a una minore contaminazione. I sistemi per controllare l'umidità interna, la temperatura e l'anidride carbonica avvengono attraverso l'uso di ventilatori, prese d'aria, raffreddamento evaporativo e zonizzazione climatica.

pH, sostanze nutritive e batteri sono regolati nel sistema idrico attraverso la fertirrigazione, l'ossigenazione e anche la sterilizzazione. L'integrazione delle condizioni climatiche, dell'acqua e del sistema nutritivo con la simulazione ci consente di fornire esattamente ciò di cui ha bisogno l'impianto, con conseguenti rese ottimizzate. Il design delle serre a tetto aperto offre una protezione completa contro condizioni meteorologiche indesiderate, mentre lo sfiato verticale favorisce un movimento ottimale della luce e dell'aria.

## **1.2. FOTOBIOREATTORI**

Un fotobioreattore è un recipiente di coltura chiuso, illuminato e progettato per la produzione controllata di biomassa. Il fotobioreattore si riferisce a sistemi chiusi senza scambio diretto di gas e contaminanti con l'ambiente fornendo un'elevata produttività delle alghe. Essi, inoltre, facilitano un miglior controllo degli ambienti di coltura come la fornitura di anidride carbonica, l'approvvigionamento idrico, la temperatura ottimale, un'intensità della luce efficiente, la densità della coltura, i livelli di pH, lo scambio di gas e l'aerazione della coltura. I sistemi di coltura delle alghe possono essere illuminati da luce artificiale o naturale o da entrambi. I sistemi di coltura delle alghe illuminati includono piastre piatte, ponte aereo tubolare orizzontale/serpentino e fotobioreattori tubolari inclinati (Soni, 2017). Generalmente, i fotobioreattori su scala di laboratorio sono illuminati in modo artificiale internamente o esternamente utilizzando lampade fluorescenti. Inoltre, è necessario un sistema adeguato di miscelazione che permetta di omogenizzare sia i nutrienti che i gas assorbiti/rilasciati. Alcuni di questi fotobioreattori includono la colonna a bolle (detta anche airlift) dove delle bolle di CO<sub>2</sub> vengono generate dal basso del bioreattore a colonna, fotobioreattori con agitazione, tubolari elicoidali e conici (Soni, 2017). Per la progettazione e la costruzione di sistemi estesi su larga scala (principalmente fotobioreattori tubolari), sono necessari elevati sforzi tecnici per garantire un efficace mantenimento delle condizioni ambientali ottimali. Sono state affrontate

infatti diverse sfide nella progettazione di fotobioreattori a temperatura controllata, come fotobioreattori a doppia parete con illuminazione interna sia con circuito di riscaldamento che di raffreddamento (Chetsumon et al. 1998). Questi, nonostante i loro costi, presentano diversi vantaggi importanti rispetto ai sistemi aperti.

- Riducono al minimo la contaminazione e consentono la coltivazione igienica delle monoculture.
- Offrono un migliore controllo su condizioni come pH, temperatura, intensità della luce, concentrazione di anidride carbonica
- Riducono la perdita di anidride carbonica.
- Impediscono l'evaporazione dell'acqua.
- Consentono concentrazioni cellulari più elevate.
- Migliorano la produzione di biofarmaci complessi.

### **1.3. SISTEMA IBRIDO**

Il tipo ibrido di fotobioreattore viene ampiamente utilizzato per sfruttare i vantaggi dei due diversi tipi di reattore e superare lo svantaggio di altri. Un circuito esterno agisce come l'unità di raccolta della luce e fornisce un elevato rapporto tra superficie e volume controllando la temperatura della coltura. Il sistema airlift funge da sistema di degasaggio dove possono essere integrate anche alcune sonde per regolare le altre variabili di coltura, consentendo una maggiore produttività e riducendo il consumo di energia (Cuaresma, 2011). I sistemi ibridi possiedono alcune caratteristiche sia degli stagni aperti, che dei fotobioreattori (Hoekema et al., 2002). In primo luogo, lo stagno aperto può essere coperto, riducendo: possibilità di contaminazione, perdite per evaporazione e desorbimento di CO<sub>2</sub>. Un'altra tipologia può essere rappresentata da un disegno tubolare parzialmente riempito, allargato e gonfiato per approssimare uno stagno aperto. Quest'ultimo progetto è principalmente finalizzato alla riduzione dei costi.

La tabella 1 riassume i vantaggi e i limiti degli stagni aperti, dei fotobioreattori e del sistema ibrido

<b>Factor</b>	<b>Open systems (raceway ponds)</b>	<b>Closed systems (photobioreactors)</b>	<b>Hybrid system (Open Pond + PBR)</b>
Space required	High	Low	High
Area/volume ratio	Low (5–10 m <sup>-3</sup> )	High (20–200 m <sup>-3</sup> )	Variable
Evaporation	High	No evaporation	Minimized
Water loss	Very high	Low	Less
CO <sub>2</sub> -loss	High	Low	Minimizes
Temperature	Highly variable	Required cooling	Controlled
Weather dependence	High	Low	Low
Process control	Difficult	Easy	Difficult
Cleaning	Easy	Required	Difficult
Biomass quality	Variable	Reproducible	Better
Population density	Medium	High	Medium
Harvesting efficiency	Medium	High	High
Harvesting cost	High	Lower	High
Light utilization efficiency	Poor	Good	Better
Most costly parameters	Mixing	Oxygen and temperature control	Temp control
Contamination control	Difficult	Easy	Easy
Capital investments	Low	High	Low
Productivity	Low	3–5 times more productive	5-7 times more productive
Hydrodynamic stress on spirulina	Very low	Low–high	Low

Tabella 1

Confronto tra la produzione di spirulina in sistema aperto, chiuso e ibrido (Roberto, 2015)

## **1.4 PARAMETRI DI CRESCITA**

I requisiti di crescita della spirulina sono simili a quelli delle piante terrestri, ma utilizzano queste risorse in modo molto più efficiente per aumentare la produttività della biomassa con un minor uso di acqua (Sudhakar, 2014).

### **1.4.1. FATTORI CLIMATICI**

La temperatura è un importante fattore climatico che influenza il tasso di crescita della spirulina. Al di sotto dei 17 °C la crescita è praticamente nulla, ma la Spirulina non muore. La temperatura ottimale per la crescita è 35 °C, e sopra i 38 °C viene inibita. La fluttuazione della temperatura atmosferica, infatti, è il principale fattore che influenza i tassi di produzione di biomassa nella coltivazione all'aperto della spirulina. Nella stagione delle piogge la coltura può essere contaminata dalle gocce di pioggia con conseguente minor massa secca, mentre un ambiente caldo umido provocherebbe una contaminazione batterica. I principali contaminanti della cultura di spirulina sono protozoi come l'ameba e il paramecio che alla fine rovinano le culture.

È stato dimostrato come la luce sia un fattore importantissimo, anche se quella solare diretta non è consigliata. Infatti, risulta più efficiente avere solo il 30% di questa luce, tranne per il fatto che potrebbe essere necessaria una quantità maggiore per riscaldare rapidamente la coltura al mattino (Sudhakar, 2014). Essa risulta determinante per la crescita, ma è sconsigliata anche l'illuminazione 24 ore al giorno. Durante i periodi bui, infatti all'interno della spirulina avvengono reazioni chimiche, come sintesi di proteine e respirazione motivo per cui, durante la notte, la crescita è minima o quasi nulla.

È stato visto inoltre che l'effetto del pH sulla crescita delle alghe, sulla produzione di pigmenti e sul contenuto proteico delle specie di spirulina ha un effetto diretto sul sistema redox. Inoltre, fattori come la disponibilità di nutrienti e la tossicità dei metalli pesanti hanno un grande impatto sul metabolismo delle alghe (Newsted, 2004).

### 1.4.2. MEZZI DI CRESCITA

Vengono utilizzati diversi mezzi di crescita in base alla fonte d' acqua per avviare nuove colture di spirulina. L'acqua utilizzata però deve essere pulita o filtrata per evitare la crescita di altre alghe. Essa contiene spesso una quantità rilevante di calcio, che se presente in concentrazioni elevate, può portare alla formazione di fanghi.

Nell'urea utilizzata come fonte di azoto, invece, possono essere presenti alcuni ioni come solfato, cloruro, nitrato e sodio che sono fonti migliori per fornire azoto in quanto più facilmente assimilabili, ma altamente tossiche ad elevate concentrazioni. La spirulina può crescere anche con soli nitrati o sola urea, anche se risulta vantaggioso usarli entrambi contemporaneamente, mentre fosfato, magnesio e calcio non possono essere aumentati troppo. La concentrazione di potassio può essere aumentata di conseguenza, purché non diventi più di cinque volte la concentrazione di sodio. Se venissero utilizzati prodotti chimici fertilizzanti per la riduzione dei costi, dovrebbero essere di tipo solubile o cristallizzato e non di tipo granulato a lento rilascio. Esistono perciò diverse preparazioni di terreni a seconda delle condizioni di crescita locali. Il più comunemente usato è Zarrouks media (Soni, 2007).

Le composizioni chimiche dei più comuni mezzi di crescita sono confrontate nella Tabella 2.

<b>Ingredient</b>	<b>Zarrouk's Media (gms/l)</b>	<b>Rao's Media (gms/l)</b>	<b>CFTRI Media (gms/l)</b>	<b>OFERR Media (gms/l)</b>	<b>George's Media (gms/l)</b>	<b>Conventional growth Media (gms/l)</b>	<b>Reduced Cost Media (gms/l)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	16.80	15	4.5	8.0	–	16	16.8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50	0.50	0.5	-	0.02	–	0.235
NaNO <sub>3</sub>	2.50	2.50	1.5	-	–	–	–
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00	0.60	1.0	0.5	–	0.5	0.353
NaCl	1.00	0.20	1.0	5.0	–	1.00	0.471
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20	0.04	1.2	0.16	0.02	0.1	–
EDTA	0.08	-	-	-	–	–	0.353
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.04	0.008	0.04	-	–	0.1	0.176
FeSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01	-	0.01	0.05	–	–	0.265
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86	-	-	0.052 ml	–	–	2.86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.180	-	-	-	–	–	1.81

<b>Ingredient</b>	<b>Zarrouk's Media (gms/l)</b>	<b>Rao's Media (gms/l)</b>	<b>CFTRI Media (gms/l)</b>	<b>OFERR Media (gms/l)</b>	<b>George's Media (gms/l)</b>	<b>Conventional growth Media (gms/l)</b>	<b>Reduced Cost Media (gms/l)</b>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222	-	-	-	-	-	0.222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>3</sub> ·	0.015	-	-	-	-	-	0.0177
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.074	-	-	-	-	-	0.079
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	22.9	-	-	-	-	-	-
NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	47.8	-	-	-	-	-	-
NaWO <sub>2</sub>	17.9	-	-	-	-	-	-
Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.4	-	-	-	-	-	-
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.4	-	-	-	-	-	-
Ferric citrate	-	-	-	-	0.035	-	-
Peptone	-	-	-	-	1.00	-	-
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	2.00	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	0.1	-
Chelated Iron	-	-	-	-	-	2 squeezes (1/4 teaspoon)	-
Lime	-	-	-	-	-	0.1	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	0.118
CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	-	0.2	-	-	0.088
Fe EDTA	-	0.20	-	-	-	-	-
A <sub>5</sub> solution	-	1 ml	-	-	-	-	-

Tabella 2. Composizione chimica di diversi mezzi di crescita (Madkour et al., 2012).



## CAPITOLO 2

### 2 COMPOSIZIONE MACROMOLECOLARE SPIRULINA

I principali prodotti fotosintetici delle microalghe sono proteine, carboidrati e lipidi. Mentre le proteine sono associate a funzioni di biosintesi e divisione cellulare, carboidrati e lipidi servono principalmente come serbatoi intracellulari di carbonio ed energia (Lafarga, 2019). Sebbene ci siano migliaia di ceppi di microalghe disponibili nelle collezioni di colture in tutto il mondo, solo alcuni di essi sono stati studiati in dettaglio (Garrido-Cardenas, 2018). All'interno di quelli che sono stati studiati, ci sono differenze significative nei principali pool macromolecolari (proteine, carboidrati e lipidi) tra i diversi phyla di microalghe (Fig. 1). Pertanto, calcolare una composizione macromolecolare media per le microalghe non è facile. In un lavoro molto pionieristico di Parsons, Stephens e Strickland (1961) su undici specie di microalghe, gli autori hanno stabilito che le proteine sono il 17-57% (39% in media), i carboidrati sono il 4-37% (23% in media) e i lipidi sono il 2-18% (8% in media) del peso secco. Inoltre, in una pubblicazione più recente di Finkel et al. (2016), gli autori hanno condotto un'analisi bayesiana gerarchica dei dati raccolti da 130 pubblicazioni scientifiche presenti in letteratura e hanno riportato la composizione macromolecolare mediana di microalghe a crescita esponenziale ottenendo 32,2% di proteine, 17,3% di lipidi, 15,0% di carboidrati e 17,3 % di ceneri su peso secco (Fig. 1).

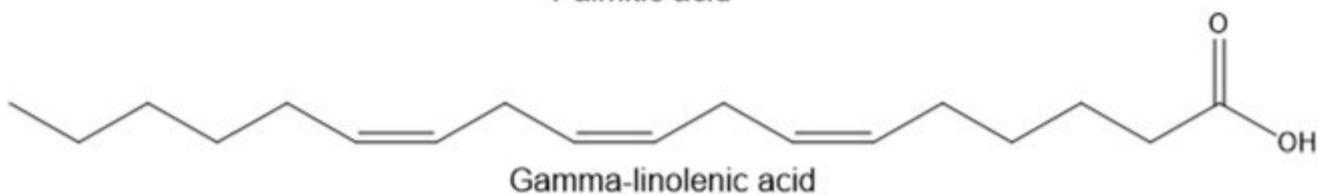
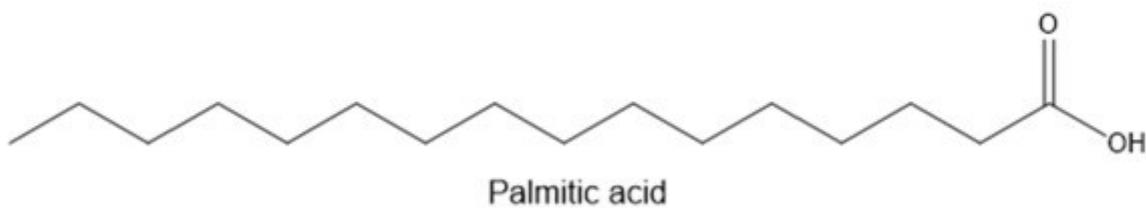
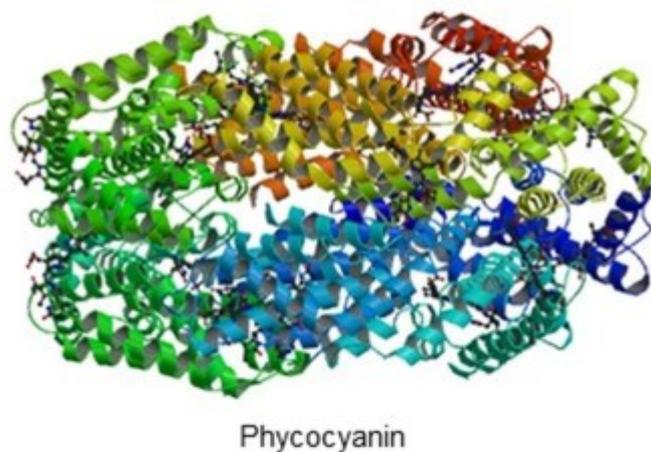
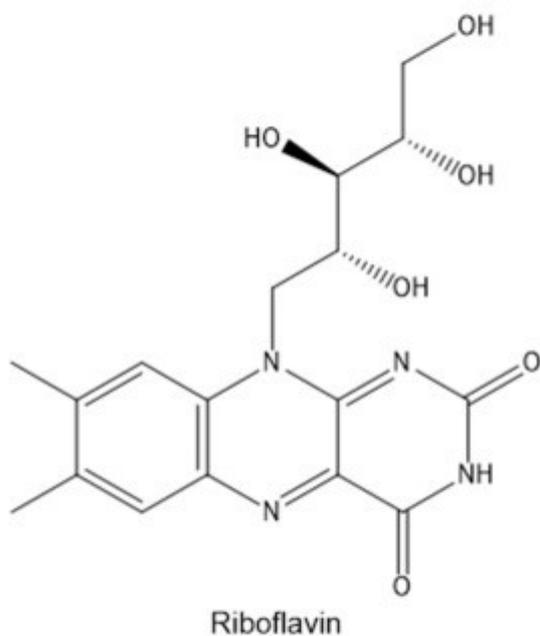
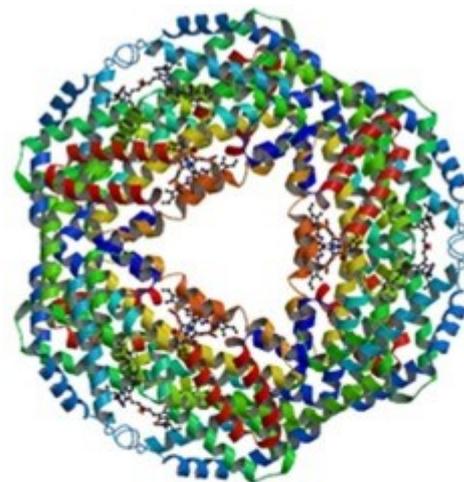
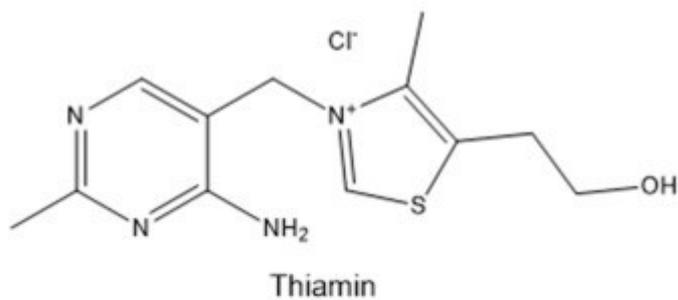


Fig. 1. Preziose molecole presenti nella spirulina. Le principali ficobiliproteine presenti nella spirulina includono ficocianina e alloficocianina in un rapporto di 10:1 (Patil et al. 2008). Insieme all'acido palmitico e linolenico, esistono altri preziosi lipidi presenti nella

spirulina che includono EPA e DHA la tiamina e la riboflavina sono note rispettivamente come vitamina B1 e vitamina B2.

Nello studio sopra menzionato di Finkel et al. (2016), gli autori hanno riferito che rispetto ai phyla microalgali eucariotici, i cianobatteri hanno valori di proteine e carboidrati più alti (43,1 e 21,8%, rispettivamente) e lipidi e ceneri inferiori (11,7 e 8,1%, rispettivamente) in percentuale su peso secco. A titolo di esempio, la composizione di una polvere di spirulina commerciale può essere osservata nella Tabella 1. Questi valori devono essere presi con cautela poiché la composizione della biomassa microalgale può essere fortemente influenzata non solo dai phyla ma anche dalle condizioni ambientali e di coltivazione (temperatura, irradianza, ciclo luce-buio, salinità, composizione del terreno di coltura, ecc.) e di conseguenza può essere modulata (Lafarga, 2019b). In effetti, un gran numero di studi riportati fino ad oggi ha dimostrato che la coltura di microalghe in condizioni di carenza/limitazione di nutrienti provoca importanti alterazioni della composizione della biomassa. Probabilmente la strategia di manipolazione più comune è correlata alla limitazione dei nutrienti azotati. La carenza di azoto porta ad un aumento dell'accumulo di lipidi a causa di alterazioni nelle vie metaboliche delle microalghe (Li et al. 2008). Questa strategia è stata studiata principalmente per la produzione di microalghe ad alto contenuto lipidico per il suo potenziale utilizzo nella produzione di biodiesel. Inoltre, Li et. al (2008) hanno descritto che anche la limitazione del fosforo nelle colture di *A. platensis* porta ad un aumento del contenuto di carboidrati e lipidi. Non solo il contenuto lipidico, ma anche la composizione in acidi grassi della spirulina è influenzata dalle condizioni ambientali o di crescita. Alcuni dei lipidi più comuni presenti nella spirulina includono l'acido  $\gamma$ -linolenico (18:3, n-6) della famiglia degli omega-6 e l'acido palmitico (16:0).

Il primo ha attirato l'attenzione in tutto il mondo a causa del suo potenziale medicinale per prevenire malattie cardiovascolari, ipercolesterolemia e altri disturbi (Barron et al. 2008). A seconda del ceppo coltivato, il contenuto di acido linoleico e  $\gamma$ -linolenico varia rispettivamente tra il 13,1-31,5 e il 12,9-39,4% degli acidi grassi totali (Mühling et al., 2005). Altri preziosi lipidi presenti nella spirulina, anche se a concentrazioni inferiori, includono gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, n-3) e acido docosaesaenoico (DHA, 22:6, n-3) (Mühling et al., 2005). Questi sono

componenti essenziali di una dieta sana ed equilibrata e apportano benefici per la salute, per lo sviluppo del sistema neurale e nel mitigare una serie di patologie.

Tabella 3. Profilo nutrizionale della polvere di spirulina.

Composizione Per 100 g		Composizione Per 100 g	
Macronutrienti		Vitamine	
Calorie, kcal	290	Vitamina B2, mg	3,7
Acqua, g	4,7	Vitamina B3, mg	128
Lipidi totali, g	7,7	Vitamina B6, mg	0.4
Proteine totali, g	57,5	Vitamina E, mg	5,0
Carboidrati, g	23,9		
Fibre, g	6.23.		

## 2.1 FICOCIANINA

La ficocianina (PC) è una proteina che raccoglie la luce ed è legata a pigmenti conferendo alle alghe una tinta caratteristica. Le PC isolate dalle alghe blu-verdi e dalle alghe rosse sono classificate rispettivamente come C-ficocianina (C-PC) e R-ficocianina (R-PC).

Il C-PC ottenuto da *A. platensis* è stato ampiamente utilizzato come additivo alimentare e colorante cosmetico in Giappone (Eriksen, 2008). Ma non solo, C-PC è stato utilizzato anche come medicina (Zhang, 2012), alimento (Abd El Baky, 2015), colorante (Bastein, 2011) e colorante fluorescente (Hussain, 2015); alcuni dei principali studi sull'applicazione di C-PC sono illustrati nella Figura 2. Tra queste applicazioni, l'uso di C-PC in medicina e biologia ha attirato una crescente attenzione. In primo luogo, gli studi hanno dimostrato che esso agisce come antiossidante (Hussain, 2015), antinfiammatorio (Murty, 1991) e antitumorale (Saini, 2015). Inoltre, può essere trasformato in un reagente fluorescente, in una sonda fluorescente e in un tracciante fluorescente, che sono utilizzati in diagnosi medica e immunologica, in ingegneria biologica e in altri campi di ricerca

grazie a questa sua proprietà (Ma, 2010). C-PC è anche un fotosensibilizzante non tossico che può essere usato nella terapia fotodinamica (PDT) dei tumori.

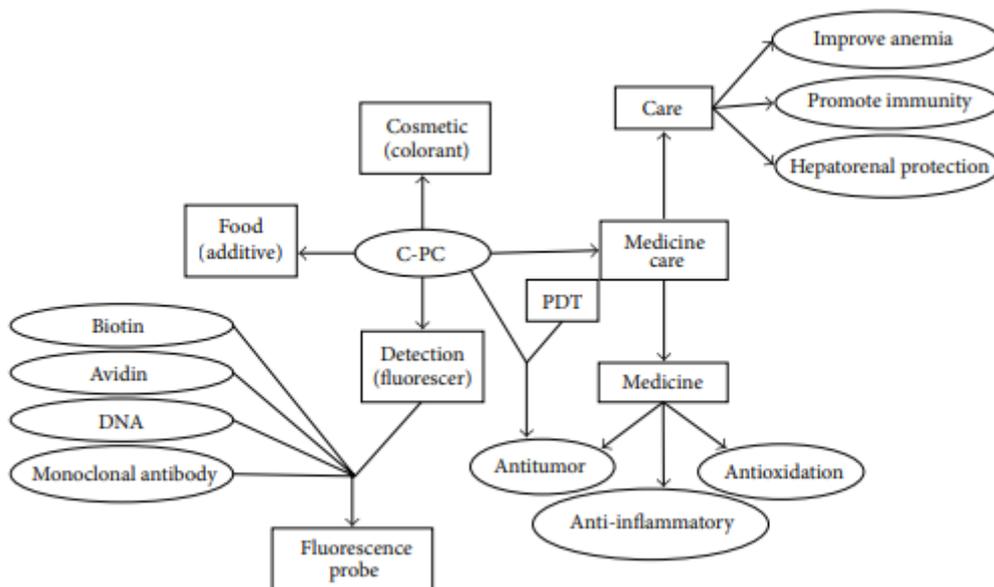


Figura 2: Applicazione di C-PC.

Considerando la buona prospettiva di sviluppo e l'alto contenuto di C-PC (fino al 10-20%) in *A. platensis*, in questo capitolo verranno approfonditi gli studi sull'isolamento, le proprietà fisico-chimiche e la stabilità per marcare l'importanza di questo pigmento come additivo alimentare, fornendo una base per lo sviluppo di functional food.

### 2.1.1 Isolamento.

Il C-PC è solubile in acqua e insolubile in alcool ed esteri. Per questo i metodi di estrazione più comuni sono quelli in acqua. Alcuni approcci popolari includono:

(a) congelamento e scongelamento ripetuto (Zhang, 2012), la polvere di *A. platensis* è dissolta in acqua in una certa proporzione, rapidamente congelata a -20 °C, e poi scongelata a 5 °C tre volte; in questo modo il tasso di rottura delle cellule può arrivare fino al 90%. Questo metodo è semplice, ma richiede tempo e spreco di polvere qualora venga elaborato un gran numero di campioni.

(b) osmosi diretta (Herra, 1989), la polvere di *A. platensis* viene immersa in acqua distillata, o in una soluzione a bassa concentrazione di sale per una notte, causando la

rottura della parete cellulare di *A. platensis*; questo metodo è semplice ma richiede molto tempo.

(c) metodo ultrasonico (Hu, 2002), la soluzione di *A. platensis* è trattata con ultrasuoni per accelerare la rottura della parete cellulare attraverso l'osmosi diretta. Questo metodo accorcia efficacemente il tempo di trattamento.

(d) uso di reagenti chimici (Lin, 1997), alcuni di essi, come l'agente tensioattivo anionico, sono utilizzati per distruggere la membrana cellulare e la proteina viene dissolta. Qui la parete cellulare rimane intatta e la purezza del C-PC è notevolmente migliore.

È stata recentemente sviluppata l'estrazione acquosa a due fasi, un sistema costituito da una miscela di due liquidi acquosi concentrati, dove al di sopra del loro punto critico formeranno due fasi distinte. La sua applicazione nella separazione di proteine, polisaccaridi, acidi nucleici, e altre molecole sta diventando sempre più comune.

Chethana e colleghi (2015) ha ottenuto un tasso di estrazione del 79% utilizzando un'estrazione acquosa a due fasi in un unico passaggio; questo approccio accorcia il tempo e il costo di lavorazione consentendo di raggiungere un'attività biologica stabile e può essere esteso fino a scala industriale; Questo metodo, quindi, offre grandi prospettive di applicazione nell'estrazione di questo pigmento

### 2.1.2 Proprietà fisico-chimiche del C-PC

La proprietà spettrale di C-PC risulta di notevole importanza in quanto viene usata come base per la sua identificazione. La tabella 1 mostra le principali proprietà ottiche (Glazer, 1984).

Yu e colleghi (1999) hanno determinato inoltre il picco massimo di assorbimento e il picco di emissione della fluorescenza a 625 e 648 nm, rispettivamente, che sono vicini ai dati elencati nella tabella 3. Yin (et al. 1984) invece ha ottenuto gli spettri infrarossi di C-PC e ha rilevato i picchi di assorbimento a 1650, 1550, 1100, 1050, 3200 e 650 cm<sup>-1</sup>, che forniscono ulteriori basi per l'identificazione del C-PC.

Pigment	Absorbance maximum (nm)	Fluorescence emission (nm)	Molecular weight (kDa)	Absorptivity (L/g·cm)	Fluorescence absorbance (related to R-PE)
C-PC	615	647	220	7.0	0.15

Tabella 3: Proprietà spettrali di C-PC

### **2.1.3 Struttura e composizione amminoacidica.**

Lo studio della composizione amminoacidica di C-PC può aprire la strada per ulteriori approfondimenti sulla struttura interna e sui gruppi attivi, nonché fornire una base teorica per altre proprietà salutistiche e mediche di questo composto. Yin e colleghi (1984), hanno determinato la composizione amminoacidica di C-PC ottenuto da *A. platensis*, e i loro risultati su diversi ceppi portano a confermare che è fondamentalmente la stessa. C-PC inoltre include 2 sub unità,  $\alpha$  e  $\beta$ , che sono composte rispettivamente da 162 e 172 aminoacidi. Risulta inoltre una fonte di amino acidi essenziali, quali leucina valina e metionina.

### **2.1.4. Stabilità di C-PC.**

Li e colleghi (1999) hanno riferito che C-PC risulta stabile sotto i 40°C mentre, a temperature superiori, il pigmento inizia a decomporsi e la densità ottica diminuisce gradualmente. Sopra i 50°C invece si riduce del 75%.

Lo studio ha anche rivelato che il colore e la densità ottica sono costanti tra pH 4.0 e pH 8.5, mentre il colore della soluzione di C-PC comincia a sbiadire quando il pH è superiore a 8,5 o inferiore a 4. Tutti i risultati, quindi, mostrano che C-PC è sensibile alla temperatura e al pH ma non alla luce. Questa constatazione è essenziale per controllare le condizioni di estrazione, ma anche quelle di lavorazione di un eventuale alimento addizionato di C-PC



## CAPITOLO 3

### 3 APPLICAZIONI ALIMENTARI

Diversi lavori riportano che l'utilizzo di microalghe nell'industria alimentare ha dovuto affrontare alcune sfide, tra cui un intenso colore (generalmente verde) e sapore. Per superare questi problemi, sono state studiate strategie come l'incapsulamento. Recentemente, da Lafarga et al. (2019) ha valutato il potenziale della spirulina incapsulata con maltodestrina o maltodestrina reticolata con acido citrico per un utilizzo come ingrediente nello yogurt. I risultati hanno mostrato che questo trattamento non solo ha determinato una maggiore stabilità termica, attività antiossidante e antinfiammatoria ma anche un aspetto più omogeneo del prodotto. Chacón-Lee e colleghi (2010) hanno suggerito che una soluzione a queste sfide potrebbe risiedere nel mascherare il sapore usando la tradizione asiatica e spezie indiane. Ciò promuoverebbe il consumo di microalghe da parte di consumatori occidentali che generalmente non sono abituati al consumo di alghe.

La spirulina è stata effettivamente incorporata in un gran numero di cibi indiani da Iyer et al. (2008). Gli autori di quello studio conclusero che la biomassa della spirulina può essere efficacemente incorporata in molte ricette (oltre 30 prodotti diversi) ottenendo sia attributi sensoriali ben accettati dai consumatori, sia prodotti con una migliore qualità nutrizionale (un basso indice glicemico e lipemico), rispetto agli stessi alimenti formulati senza spirulina. Al giorno d'oggi, i consumatori richiedono prodotti innovativi e sofisticati e la spirulina si è posizionata saldamente nel mercato alimentare (Lafarga, 2019). Il suo colore verde, che in certe formulazioni può risultare un ostacolo, potrebbe essere un'opportunità per innovare e soddisfare le esigenze di altri consumatori: molte grandi aziende alimentari sono diventate "verdi" nell'ultimo decennio commercializzando cibi e bevande di questo colore. Inoltre, diversi studi suggeriscono che l'aroma e il sapore "marino" di alcune microalghe, principalmente specie marine, potrebbe essere un'opportunità per sviluppare preparazioni culinarie innovative a base di pesce (Fradique et al., 2013). Infatti, in Spagna l'azienda Fitoplancton Marino S.L. (Cadice, Spagna) sta commercializzando la biomassa liofilizzata di *Tetraselmis chuii* sotto il nome Plancton Marino Veta la Palma® per accentuare il sapore marino dei cibi.

### 3.1 PRODOTTI ALIMENTARI CONTENENTI SPIRULINA

Esistono numerosi documenti sull'utilizzo storico della spirulina nella dieta umana. Per esempio, è stata usata per secoli in Ciad, conosciuto nella lingua locale come dihé, nell'alimentazione quotidiana (Lafarga, 2020). Diversi studi hanno valutato l'effetto dell'incorporazione delle microalghe nelle ricette alimentari tradizionali. Le microalghe più comunemente usate includono la *clorella* (Gouveia, 2018), *Nanochloropsis* (Durmaz et al. 2020), *Tetraselmis* (Batista et al. 2019), *Porfiridio* (Durmaz et al. 2020), *Isochrysis* (Babuskin et al. 2015) e *Haematococcus* (Hossain et al. 2017).

Le matrici alimentari più comunemente studiate includono prodotti a base di cereali come pasta, pane o biscotti. Recentemente Niccolai et al. (2019) ha valutato il potenziale della spirulina per essere utilizzato come ingrediente nello sviluppo di crostini a lievitazione naturale (pane abbrustolito) con concentrazioni che variano tra il 2 e il 6%. Gli autori hanno riferito che sebbene gli impasti abbiano raggiunto un volume inferiore rispetto al normale, i prodotti contenenti microalghe hanno mostrato un significativo aumento del contenuto di proteine e polifenoli e una maggiore capacità antiossidante. Uribe Wandurraga et al. (2019) ha invece prodotto e analizzato dei grissini arricchiti di minerali riscontrando che quando la spirulina è incorporata ad una concentrazione di 1,5%, il prodotto può essere classificato come “alimento ad alto contenuto di ferro e selenio”.

Inoltre, Batista et al. (2017) hanno valutato l'effetto dell'incorporazione di *A. platensis* in biscotti a concentrazioni di microalghe comprese tra 2 e 6%, riportando che oltre a ottenere un aspetto attraente e innovativo, il prodotto è stato anche ben accetto dai consumatori dopo un'analisi sensoriale; inoltre è stato confermato anche in questo caso un contenuto maggiore di polifenoli e una migliore capacità antiossidante, senza interferenze sulla digeribilità dei prodotti. Risultati simili sono stati ottenuti da De Marco, et al. (2014) che, dopo aver incorporato spirulina nella pasta, ad una concentrazione del 5-20%, hanno trovato un indice glicemico invariato, ma un maggior contenuto fenolico e proteico rispetto alla pasta senza aggiunte. Fradique et al. (2010) ha sviluppato invece pasta arricchita con spirulina a concentrazioni di 0,5-2,0% notando non solo una maggiore accettazione sensoriale rispetto al prodotto di controllo, ma anche nessun effetto sulle proprietà tecnofunzionali dei prodotti. Il potenziale della spirulina per essere utilizzato nella pasta senza glutine è stato studiato da Fradinho et al. (2020). In quello studio, gli autori hanno riportato un aumento del contenuto di composti fenolici, clorofille e

carotenoidi, nonché nessuna modifica strutturale dopo l'incorporazione della biomassa microalgale nelle ricette.

Le concentrazioni di microalghe valutate variavano tra l'1 e il 15%, anche se dopo un'analisi sensoriale sono state preferite quelle contenenti spirulina a una concentrazione del 2%. Qui, gli autori hanno osservato che il metodo di essiccazione utilizzato per la disidratazione della biomassa ha avuto un effetto rilevante sul valore nutritivo complessivo dei prodotti.

Gli studi futuri dovrebbero quindi considerare l'effetto della lavorazione della biomassa sulla qualità dei prodotti finiti come, ad esempio, Bernaerts et al. (2020) che ha recentemente osservato come una fase di distruzione cellulare può migliorare la biodisponibilità dei carotenoidi dopo la digestione. Sono stati trovati risultati simili da Cavonius, e colleghi (2016) concludendo che la lavorazione della biomassa è importante per produrre un prodotto alimentare che abbia proprietà nutritive benefiche.

Altre categorie di alimenti ai quali è stata aggiunta spirulina come ingrediente includono snack e prodotti lattiero-caseari. Ad esempio, Lucas et al. (2018) hanno prodotto snack estrusi contenenti spirulina ad una concentrazione del 2,6%, trovando un'elevata accettazione sensoriale e un maggior contenuto di proteine totali e digeribili. Inoltre, Barkallah et al. (2017) ha sviluppato uno yogurt contenente spirulina a concentrazioni comprese nell'intervallo 0,25-1,00%, che ha mostrato un contenuto più elevato di proteine e fibre insieme a una migliore capacità di ritenzione idrica e una minore sineresi del siero durante la conservazione. Incorporare le microalghe nello yogurt potrebbe avere un vantaggio aggiuntivo, infatti, Beheshtipour e colleghi (2012) hanno notato come lo yogurt contenente spirulina ad una concentrazione di 0,5-1,0% mostri un calo del pH più lento e un aumento della vitalità di *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* alla fine della fase di fermentazione e conservazione refrigerata. Sono stati trovati risultati simili anche da Varga e colleghi (2002) i quali, hanno riportato che *A. platensis* ha avuto un effetto benefico sulla sopravvivenza di *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* e bifidobatteri indipendentemente dalla temperatura di conservazione. Çelekli et al. (2019) invece hanno recentemente evidenziato il potenziale della spirulina per essere utilizzata come ingrediente nella produzione di ayran, una bevanda fredda turca contenente yogurt. In quello studio, gli autori riportano un aumento del contenuto proteico e una crescita dei probiotici dopo l'incorporazione di spirulina ad una concentrazione dell'1%. Risultati

simili sono stati riportati da Patel et al. (2019) mostrando anche un contenuto di carotenoidi e clorofilla più elevato nello yogurt studiato.

A causa dell'elevato contenuto proteico, la spirulina è stata valutata anche come potenziale sostituto della carne, che è una delle tendenze principali nell'industria alimentare. Marti-Quijal et al. (2019) hanno recentemente valutato il potenziale della spirulina sulle proprietà fisico-chimiche degli insaccati di suino, notando che sebbene il colore e la consistenza siano stati significativamente influenzati, sono stati aumentati il contenuto nutrizionale ed è migliorato il rapporto aa essenziali/aa non essenziali. In conclusione, lo studio suggerisce che sulla base di questi risultati la spirulina potrebbe essere tranquillamente usata come alternativa alle proteine della soia nell'arricchimento degli insaccati di suino. Risultati simili sono stati osservati da Marti-Quijal et al. (2019) che hanno realizzato analoghi della carne proteica a base di lupino contenenti spirulina a una concentrazione del 15, 30 o 50%, notando che questa alga aumenta il contenuto totale di fenoli e flavonoidi e la capacità antiossidante dei prodotti finiti.

La spirulina è stata utilizzata anche per arricchire alimenti a base vegetale, più comunemente in prodotti naturalmente verdi come zuppa di broccoli e frullati verdi (Lafarga, 2019). Lupatini Menegotto et al. (2019) hanno studiato anche composti derivati da microalghe come i concentrati proteici sottoforma di ingredienti alimentari suggerendo il loro potenziale utilizzo nello sviluppo di nuovi alimenti.

Tutte queste potenzialità tecno-funzionali, nutrizionali e sensoriali, benefici o innovazioni ottenute dopo aver incorporato le microalghe negli alimenti hanno portato al lancio di una serie di nuovi prodotti alimentari arricchiti con spirulina sul mercato. Questi sono stati censiti da Lafarga (2019a), il quale riporta che le matrici alimentari più comuni sono bevande e prodotti da forno come cracker o biscotti. Gli esempi includono cracker ripieni di spirulina (biscotti Lee, Malesia) e frullato verde (Happy Planet Foods, Canada). Nel complesso, la quantità degli alimenti aggiunti con questo composto dipende dalla matrice alimentare utilizzata come veicolo. È importante però evidenziare che le alte (oltre una certa soglia, che dipende in gran parte dalla matrice alimentare) concentrazioni di biomassa possono portare a limitazioni tecnologiche come una riduzione del volume o dell'accettazione da parte del consumatore (Lafarga, 2020).

### **3.2 SPIRULINA E L'INDUSTRIA DEGLI ALIMENTI FUNZIONALI**

Gli alimenti funzionali sono una categoria alimentare relativamente nuova che prevede benefici per la salute dopo aver consumato il prodotto, e che vanno oltre la nutrizione di base. Il concetto di alimenti funzionali è iniziato in Giappone nel 1984 con il lancio di progetti di ricerca su larga scala finanziati dal governo (Lafarga, 2019). Da allora, il mercato degli alimenti funzionali è in crescita costante ed è probabile che continuerà a crescere in futuro. Lo sviluppo e la commercializzazione di alimenti funzionali possono essere, tuttavia, impegnativi rispetto ad altri alimenti che convenzionalmente hanno un'immagine "sana". La spirulina ha il potenziale per essere utilizzata nello sviluppo di alimenti funzionali a causa del un gran numero di benefici per la salute associati al suo consumo. Diversi studi supportano che la spirulina e i suoi composti derivati hanno applicazioni terapeutiche nelle malattie non trasmissibili come diabete mellito, iperlipidemia, stress ossidativo indotto malattie, infiammazioni, allergie, ipertensione e alcuni tipi di cancro (Gershwin et al. 2008). Tuttavia, quando i produttori svilupperanno questi prodotti contenenti spirulina, saranno necessarie prove scientifiche per valutare i benefici per la salute della spirulina. Gli alimenti funzionali sono regolamentati in Giappone e negli Stati Uniti rispettivamente dal Ministero della Salute e del Benessere giapponese e dalla FDA (Food and Drug Administration). Nell'UE, gli alimenti funzionali sono controllati dall'EFSA, che richiede una convalida scientifica dei benefici sulla salute derivanti dal consumo di ingredienti bioattivi prima che possa essere presentata per la sua approvazione.



## **CAPITOLO 4**

### **APPLICAZIONI SALUTISTICHE**

#### **4 APPLICAZIONI SALUTISTICHE DELLA SPIRULINA E SINDROME METABOLICA**

Come evidenziato in precedenza, diverse pubblicazioni scientifiche sulla spirulina hanno riscontrato esiti positivi su malattie quali ipertensione, diabete di tipo 2, alcuni tipi di cancro, obesità, iperglicemia o ipercolesterolemia (Gershwin et al. 2008). Il consumo di spirulina mostra anche un potenziale per la prevenzione della morbilità da infezioni respiratorie e acquisizione di traguardi motori tra i bambini dello Zambia.

In questo capitolo ci concentriamo su gli aspetti positivi di quest'alga sulla sindrome metabolica, e sui disturbi medici che aumentano il rischio di sofferenza da malattie cardiovascolari, ovvero diabete, obesità, ipertensione, disordini lipidici e alterazioni del potenziale trombotico legate a insulino-resistenza e iperinsulinemia (Gershwin et al. 2008).

##### **4.1 IPERTENSIONE**

La sindrome metabolica è un raggruppamento di anomalie come obesità, iperglicemia, dislipidemia e ipertensione arteriosa. L'ipertensione, nota anche come pressione alta, è considerata uno dei più rilevanti fattori di rischio cardiovascolare ed è una delle principali cause di morte prematura in tutto il mondo – secondo il World Health Organization, infatti, oltre un miliardo di persone soffre di questa condizione, 1 uomo su 4 e 1 donna su 5. La spirulina e i composti da essa derivati hanno dimostrato un grande potenziale per essere utilizzati nel trattamento della prevenzione dell'ipertensione e di altri disturbi legati alla salute cardiovascolare. La maggior parte gli studi sinora effettuati sono stati condotti però su animali.

Recentemente, Arthur-Ataam et al. (2019) ha riferito che il consumo di spirulina attenua la pressione arteriosa dei ratti spontaneamente ipertesi e migliora la reattività vascolare,

entrambi effetti associati ad una riduzione dello spessore e della rigidità arteriosa. Inoltre, Miczke et al. (2016) ha condotto uno studio randomizzato in doppio cieco e controllato con placebo su pazienti con ipertensione riportando una significativa riduzione della pressione arteriosa nel gruppo di pazienti che hanno ricevuto 2 g di spirulina al giorno per tre mesi. L'attività antipertensiva della spirulina è stata parzialmente attribuita al suo alto contenuto proteico e al potenziale rilascio di peptidi bioattivi, e/o all'attività inibitoria della renina. I peptidi bioattivi sono brevi sequenze di generalmente 2-30 amminoacidi, che sono inattivi all'interno della sequenza della proteina madre ma hanno effetti positivi sulla salute una volta rilasciati (Lafarga, 2019). Sono stati ottenuti infatti dalla spirulina diversi ACE (Angiotensin Converting Enzyme) inibitori. Ad esempio, Anekthanakul et al. (2019) hanno usato un metodo *in vitro* per identificare un peptide inibitorio ACE-I dalla spirulina (con sequenza IRDLDY) che ha mostrato valore IC<sub>50</sub> (concentrazione necessaria per inibire della metà l'attività di un enzima) di 1,75 mM. Altri peptidi (IQP e VEP) con proprietà ACE-I *in vitro* hanno dimostrato inoltre di abbassare anche la pressione sanguigna dopo somministrazione orale in soggetti spontaneamente ipertesi (Lu et al., 2011).

Successivamente Carrizzo et al. (2019) hanno notato come *A. platensis* inducesse un vaso rilassamento endoteliale diretto mediato dall'ossido nitrico nei vasi sanguigni nei topi e hanno attribuito questo effetto a un peptide generato dopo digestione gastrointestinale simulata e sequenziato come GIVAGDVTPI. Anche questo peptide, infatti, quando somministrato da solo, mostra effetti antipertensivi dopo somministrazione orale nei topi. Nel complesso, i peptidi bioattivi derivati dalla spirulina offrono un buon potenziale per essere utilizzati nello sviluppo di nuovi alimenti funzionali nell'UE, considerando il fatto che diversi functional food contenenti peptidi sono attualmente commercializzati in Giappone. Ad esempio, il latte acido Calpis (Calpis Food Industry Co. Ltd., Giappone) viene venduto in Giappone come bevanda funzionale sulla base della presenza di peptidi antipertensivi IPP e VPP. Tuttavia, nonostante il gran numero di evidenze scientifiche che suggeriscono i loro effetti di abbassamento della pressione sanguigna *in vivo*, una revisione effettuata dall'EFSA ha concluso che non è stato possibile definire una relazione di causa ed effetto tra consumo di IPP e VPP e mantenimento della normale pressione sanguigna (Lafarga, 2020). Quindi per approvare un'indicazione sulla salute da parte di

questi peptidi nell'UE saranno necessari maggiori sforzi per ottenere evidenze scientifiche riconoscibili dall'EFSA.

## **4.2 DIABETE**

Il diabete è una malattia metabolica cronica caratterizzata da elevati livelli di glucosio nel sangue e che porta gravi danni al cuore, ai vasi sanguigni, agli occhi e ai reni. Secondo il World Health Organization, circa 422 milioni di persone in tutto il mondo soffrono di diabete causando 1,6 milioni di decessi all'anno.

Hamedifard et al. (2019) ha recentemente eseguito una revisione sistematica e una metanalisi per valutare l'effetto della spirulina sul controllo glicemico in pazienti con sindrome metabolica concludendo che l'integrazione delle diete con spirulina può ridurre le concentrazioni di glucosio e insulina nel plasma in modo rilevante. Il potenziale antidiabetico di questa alga è dovuto dalla sua capacità di ridurre l'aumento dei livelli di glucosio nel sangue grazie al suo contenuto di PUFA (Poly-Unsaturated Fatty Acids) e alla generazione di peptidi inibitori grazie all'attività della dipeptidil peptidasi-IV (DPP-IV; EC 3.4.14.5). Ad esempio, Wan et al. (2019) ha riportato un miglioramento della tolleranza al glucosio e un'alterata composizione del microbiota intestinale dopo una dieta di 8 settimane ricca di grassi e di saccarosio integrati con estratti da spirulina. Gli autori di quello studio hanno attribuito gli effetti osservati all'alto contenuto di PUFA presenti negli estratti. Inoltre, Hu e colleghi (2019) sono riusciti a identificare tre peptidi dalle proteine estratte dalla spirulina, e, e uno di questi, il peptide LRSELAAWSR mostrava livelli di DPP-IV elevati con attività inibitoria dell' $\alpha$ -glucosidasi a valori di IC50 di 167,3 g/mL. L'attività DPP-IV è rilevante nella prevenzione o nel trattamento del diabete in quanto degrada e inattiva il peptide-1 simile al glucagone e il peptide inibitorio gastrico, due ormoni che contribuiscono all'aumento dell'insulina indotta dalla secrezione del glucosio (Lafarga, 2020). Inoltre, Oriquat et al. (2019) hanno notato che il miglioramento della biogenesi mitocondriale potrebbe essere il meccanismo attraverso il quale essa esercita il suo effetto antidiabetico. Infatti, su ratti diabetici nutriti per via orale con 200 mg/kg di metformina (un farmaco di prima linea per il trattamento di diabete di

tipo 2) o 250-750 mg/kg di spirulina per 30 giorni hanno osservato che la spirulina migliora con successo l'aumento indotto di glicemia a digiuno, insulina ed enzimi epatici. Simon e colleghi (2018) hanno riferito invece che la somministrazione orale di spirulina a ratti con diabete indotto da streptozotocina potrebbe normalizzare la glicemia e il profilo lipidico del siero, nonché aumentare lo stato antiossidante e minimizzare l'entità del danno tissutale.

### **4.3 OBESITÀ**

La prevalenza di sovrappeso e obesità è in rapido aumento in tutto il mondo: secondo la FAO, circa 3,4 milioni di adulti muoiono ogni anno per questa causa.

Il potenziale della spirulina è stato valutato anche per il trattamento dell'obesità. Ad esempio, Yousefi e colleghi (2018) hanno studiato l'effetto del consumo di compresse di *A. platensis* (4 × 500 mg al giorno) attraverso misure antropometriche in soggetti obesi e in sovrappeso segnalando come il peso corporeo, la circonferenza della vita, il grasso corporeo e l'IMC risultassero inferiori nel gruppo che consumava spirulina rispetto al placebo consigliando quindi il potenziale di questa alga come integrazione per perdere peso. Shariat et al. (2019) hanno indagato l'effetto di *A. platensis* sulla citochina-1 inibitoria dei macrofagi (MIC-1/GDF15), sulla superossido dismutasi (SOD), e sulla glutatione perossidasi (GPX), nei pazienti obesi. MIC-1/GDF15 è associato a malattie cardiovascolari, infiammazioni, regolamentazione del peso corporeo, cancro e i suoi livelli sierici, risultando un potente strumento per prevedere la mortalità da sindromi metaboliche. Cinquanta individui obesi di età compresa tra i 20 e i 50 anni hanno partecipato allo studio di Shariat et al. (2019). Questi sono stati suddivisi casualmente in due gruppi che hanno ricevuto *A. platensis* (500 mg due volte al giorno) o un placebo per 12 settimane. Gli autori hanno osservato concentrazioni significativamente ridotte di MIC/GDF15 e di appetito negli individui obesi che consumavano spirulina, mentre non è stato osservato alcun cambiamento nel gruppo trattato con placebo. Inoltre, il consumo di spirulina ha anche aumentato le concentrazioni ematiche di SOD un gruppo di enzimi che catalizza la rimozione dei radicali superossido e fornisce difesa cellulare contro le specie reattive dell'ossigeno.

Risultati simili sono stati ottenuti da Zeinalian et al. (2017)

che hanno riscontrato una riduzione dell'appetito, del peso corporeo e dell'indice di massa corporea (BMI) in 27 soggetti obesi di età compresa tra 20 e 50 anni, che hanno ricevuto 500 mg di spirulina due volte al giorno per 12 settimane.

In un altro studio invece, Hernández-Lepe et al. (2018) hanno testato l'effetto dell'integrazione di *A. maxima* e di un programma sistematico di esercizio fisico sulla composizione corporea e sulla forma fisica cardiorespiratoria di soggetti sovrappeso e obesi. Il consumo della sola spirulina (4,5 g al giorno durante sei settimane) o in combinazione con l'esercizio (due volte alla settimana durante sei settimane) ha portato non solo a una riduzione della percentuale di grasso corporeo, ma anche ad un aumento della perdita di peso e tempo per raggiungere la fatica. La spirulina è stata suggerita anche come potenziale ingrediente funzionale ipolipemizzante da Chen et al. (2019). In quello studio, gli autori hanno osservato come essa potesse ridurre il peso corporeo e lipidi sierici migliorando persino il ripristino del fegato nei ratti con dieta ricca di grassi. Nel complesso, tutti gli studi suggeriscono quindi che il consumo di spirulina può ridurre l'appetito e promuovere la perdita di peso. Inoltre, sembra che l'integrazione con spirulina migliori sinergicamente l'effetto dell'esercizio sistematico sul corpo e i parametri cardiorespiratori negli individui con sovrappeso o obesità.



## **CONCLUSIONI**

Dal presente elaborato è possibile concludere che la spirulina è un'ottima fonte nutrizionale ricca di proteine, aa essenziali, vitamine, PUFA e pigmenti bioattivi. La sua applicazione come ingrediente negli alimenti è stata valutata essere efficace per prevenire e curare diverse patologie, nonché come colorante alimentare. I pigmenti della spirulina, rispetto alle controparti sintetiche sembrano avere diverse proprietà benefiche per la salute e potrebbero essere utilizzati come ingredienti nello sviluppo di alimenti funzionali. Sono stati discussi i metodi di coltivazione ed è stato visto come i parametri di crescita possono influenzare la quantità di biomassa e la qualità finale di questa microalga

La spirulina ha inoltre dimostrato essere un'ottima fonte di peptidi bioattivi proponendosi quindi come un possibile antidepressivo, antidiabetico, antiobesità e antiossidante. Questi suoi possibili utilizzi prenderanno sempre più piede grazie alla crescente attenzione alla salute da parte del consumatore.



## BIBLIOGRAFIA

1. Abd El Baky H. H., El Baroty G. S, and Ibrahim E. A. (2015), “Functional characters evaluation of biscuits sublimated with pure phycocyanin isolated from *Spirulina* and *Spirulina* biomass,” *Nutricion Hospitalaria*, vol. 32, no. 1, pp. 231–241
2. Anekthanakul, K., Senachak, J., Hongsthong, A., Charoonratana, T., & Ruengjitchatchawalya, M. (2019). Natural ACE inhibitory peptides discovery from spirulina (*Arthrospira platensis*) strain C1. *Peptides*, 118, applications in biology, biotechnology, foods and medicine,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 80, no. 1, pp. 1–14,
3. Arthur-Ataam, J., Bideaux, P., Charrabi, A., Sicard, P., Fromy, B., Liu, K., ... Richard, S. (2019). Dietary supplementation with silicon-enriched *Spirulina* improves arterial remodeling and function in hypertensive rats. *Nutrients*, 11(11), 2574.
4. Babuskin, S., Radhakrishnan, K., Babu, P. A. S., Sukumar, M., Fayidh, M. A., Sabina, K., ... Sivaraajan, M. (2015). Effects of Rosemary extracts on oxidative stability of chikkis fortified with microalgae biomass. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3784–3793.
5. Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T., ... Abdelkafi, S. J. L. (2017). Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT Food Science and Technology*, 84, 323–330.
6. Barron, B. L., Torres-Valencia, J. M., Chamorro-Cevallos, G., & Zuñiga-Estrada, A. (2008). *Spirulina* as an antiviral agent. In M. E. Gershwin, & A. Belay (Eds.). *Spirulina in human nutrition and health* (pp. 227–242).
7. Bastien C., Cardin R., Veilleux E., Deblois C., Warren A., and ' I (2011). Laurion, “Performance evaluation of phycocyanin probes for the monitoring of cyanobacteria,” *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 13, no. 1, pp. 110–118
8. Batista, A. P., Niccolai, A., Bursic, I., Sousa, I., Raymundo, A., Rodolfi, L., ... Tredici, M. (2019). Microalgae as functional ingredients in savory food products: Application to wheat crackers. *Foods*, 8(12), 611.
9. Batista, A. P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., ... Raymundo, A. (2017). Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Research*, 26, 161–171.
10. Beheshtipour, H., Mortazavian, A. M., Haratian, P., & Darani, K. K. (2012). Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *European Food Reserach and Technology*, 235(4), 719–728.
11. Bernaerts, T. M., Verstreken, H., Dejonghe, C., Gheysen, L., Foubert, I., Grauwet, T., & Van Loey, A. M. (2020). Cell disruption of *Nannochloropsis* sp. improves in vitro bioaccessibility of carotenoids and  $\omega$ 3-LC-PUFA. *Journal of Functional Foods*, 65, 103770.
12. Carrizzo, A., Conte, G. M., Sommella, E., Damato, A., Ambrosio, M., Sala, M., ... Madonna, M. (2019). Novel potent decameric peptide of *Spirulina platensis*

- reduces blood pressure levels through a PI3K/AKT/eNOS-dependent mechanism. *Hypertension*, 73(2), 449–457.
13. Cavonius, L. R., Albers, E., & Undeland, I. J. F. (2016). In vitro bioaccessibility of proteins and lipids of pH-shift processed *Nannochloropsis oculata* microalga. *Food & Function*, 7(4), 2016–2024.
  14. Çelekli, A., Alslibi, Z. A., & üseyin Bozkurt, H. (2019). Influence of incorporated *Spirulina platensis* on the growth of microflora and physicochemical properties of ayran as a functional food. *Algal Research*, 44, 101710.
  15. Cerón-García, M., González-López, C., Camacho-Rodríguez, J., López-Rosales, L., García Camacho, F., & Molina-Grima, E. (2018). Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). *Food Chemistry*, 257, 316–324.
  16. Chacón-Lee, T., & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “healthy” foods—possibilities and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 655–675.
  17. Chen, H., Zeng, F., Li, S., Liu, Y., Gong, S., Lv, X., ... Liu, B. (2019). *Spirulina* active
  18. Chethana S., Nayak C. A., Madhusudhan M. C., and Raghavarao K. S. M. S. (2015), “Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycoyanin from *Spirulina platensis*,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 4, pp. 2415–2421
  19. Chetsumon, A., Umeda, F., Maeda, I., Yagi, K., Mizoguchi, T., & Miura, Y. (1998). Broad spectrum and mode of action of an antibiotic produced by *Scytonema* sp. TISTR 8208 in a seaweed-type bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*
  20. Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G., & Mitchell, B. G. (2019). Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. *Bioresource Technology*, 292, 121946. da Silva, S. C., Fernandes, I. P., Barros, L., Fernandes, Â., José Alves, M., Calhelha, R. C., ... Filomena Barreiro, M. (2019). Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. *Journal of Functional Foods*, 60, 103427.
  21. Cuaresma, M., Janseen, M., Vilchez, & Wijffels, R. H. (2011). Horizontal or Vertical photobioreactors How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bio resource Technology*, 102
  22. Danesi, E., Rangel-Yagui, C. D. O., De Carvalho, J., & Sato, S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23(4), 261–269.
  23. De Marco, E. R., Steffolani, M. E., Martínez, C. S., & León, A. E. (2014). Effects of spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 58(1), 102–108.
  24. Durmaz, Y., Kilicli, M., Toker, O. S., Konar, N., Palabiyik, I., & Tamtürk, F. (2020). Using spray-dried microalgae in ice cream formulation as a natural colorant: Effect on physicochemical and functional properties. *Algal Research*, 47, 101811.
  25. Edelmann, M., Aalto, S., Chamlagain, B., Kariluoto, S., & Piironen, V. (2019). Riboflavin, niacin, folate and vitamin B12 in commercial microalgae powders. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103226.

26. Eriksen N. T. (2008), "Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 80, no. 1, pp. 1–14,
27. Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1), 1-14.
28. Finkel, Z. V., Follows, M. J., Liefer, J. D., Brown, C. M., Benner, I., & Irwin, A. J. (2016). Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. *PLoS One*, 11(5), e0155977.
29. 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.
30. Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1656–1664.
31. Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2013). *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 312–319.
32. García-Segovia, P., Pagán-Moreno, M. J., Lara, I. F., & Martínez-Monzó, J. (2017). Effect of microalgae incorporation on physicochemical and textural properties in wheat bread formulation. *Food Science and Technology International*, 23(5), 437–447.
33. Garrido-Cardenas, J. A., Manzano-Agugliaro, F., Acien-Fernandez, F. G., & Molina-Grima, E. (2018). Microalgae research worldwide. *Algal Research*, 35, 50–60.
34. Gershwin, M. E., & Belay, A. (2008). *Spirulina in human nutrition and health*. Boca Raton, US: CRC Press.
35. Gheysen, L., Demets, R., Devaere, J., Bernaerts, T., Goos, P., Van Loey, A., ... Foubert, I. (2019a). Impact of microalgal species on the oxidative stability of n-3 LC-PUFA enriched tomato puree. *Algal Research*, 40, 101502.
36. Gheysen, L., Lagae, N., Devaere, J., Goiris, K., Goos, P., Bernaerts, T., ... Foubert, I. (2019b). Impact of *Nannochloropsis* sp. dosage form on the oxidative stability of n-3LC-PUFA enriched tomato purees. *Food Chemistry*, 279, 389–400.
37. Golmakani, M.-T., Soleimani-Zad, S., Alavi, N., Nazari, E., & Eskandari, M. H. (2019). Effect of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) powder on probiotic bacteriologically acidified feta-type cheese. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1085–1094.
38. Gouveia, L., Batista, A. P., Miranda, A., Empis, J., & Raymundo, A. (2007). *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 433–436.
39. Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- $\omega$ 3 from *Isochrysis galbana*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 891–896.
40. Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A. P., Sousa, I., & Empis, J. (2006). *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and

- antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 362.
41. Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., & Raymundo, A. (2018). Impact of *Chlorella vulgaris* on the rheology of wheat flour dough and bread texture. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 466–474.
  42. Großhagauer, S., Kraemer, K., & Somoza, V. (2020). The true value of spirulina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(14), 4109–4115.
  43. Herrera, Boussiba, Napoleone, and Hohlberg (1989), “Recovery of c-phycoyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 1, no. 4, pp. 325–331
  44. Hoekema, S., Bijmans, M., Janssen, M., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2002). A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas recirculation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple nonsulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27.
  45. Hossain, A., Brennan, M. A., Mason, S. L., Guo, X., Zeng, X. A., & Brennan, C. S. (2017). The effect of astaxanthin-rich microalgae “*Haematococcus pluvialis*” and wholemeal flours incorporation in improving the physical and functional properties of cookies. *Foods*, 6(8), 57.
  46. Hu Y. B., Hu H. J., Li Y. G., and Geng Y. H. (2002), “Study on mass production of phycobilins from PC rich strain of *Spirulina platensis*,” *Journal of Wuhan Botanical Research*, no. 4, pp. 299–302
  47. Hu, S., Fan, X., Qi, P., & Zhang, X. (2019). Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*. *Journal of Functional Foods*, 56, 333–341.
  48. Huang, H., Liao, D., Pu, R., & Cui, Y. (2018). Quantifying the effects of spirulina supplementation on plasma lipid and glucose concentrations, body weight, and blood pressure. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 11, 729–742.
  49. Hussein M. M. A., Ali H. A., and Ahmed M. M. (2015), “Ameliorative effects of phycocyanin against gibberellic acid induced hepatotoxicity,” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 119, no. 1, pp. 28–32
  50. Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D., & Adam, V. (2018). Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using high performance thin layer chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 108–118.
  51. Iyer, A. M., Dhruv, S. A., & Mani, I. U. (2008). *Spirulina* and its therapeutic implications as a food product. In M. E. Gershwin, & A. Belay (Eds.). *Spirulina in human nutrition and health* (pp. 51–69). Boca Raton, US: CRC Press.
  52. Lafarga, T., Mayre, E., Echeverria, G., Viñas, I., Villaró, S., Acién-Fernández, F. G., ... Aguiló-Aguayo, I. (2019). Potential of the microalgae *Nannochloropsis* and *Tetraselmis* for being used as innovative ingredients in baked goods. *LWT-Food Science and Technology*, 115, 108439.
  53. Li Q. H., Zhang Y. F., and Liu X. C. (1999), “Study on characteristic and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*,” *Journal of Yunnan University (Natural Sciences)*, no. 3, pp. 66–68
  54. Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629–636.

55. Ljubic, A., Safafar, H., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. (2018). Biomass composition of *Arthrospira platensis* during cultivation on industrial process water and harvesting. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 943–954.
56. Lucas, B. F., de Morais, M. G., Santos, T. D., & Costa, J. A. V. (2018). Spirulina for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. *LWT-Food Science and Technology*, 90, 270–276.
57. Lupatini Menegotto, A. L., Souza, L. E. S. D., Colla, L. M., Costa, J. A. V., Sehn, E., Bittencourt, P. R. S., ... Colla, E. (2019). Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. *LWT-Food Science and Technology*, 114, 108267.
58. Ma X., Liu L., Zhang R., Liu J. D, and Shen W.(2010), “Effect of expression on the expression of iNOS in pancreatic tissues of rats with type 2 diabetes mellitus,” *Contemporary Medicine*, vol. 16, no. 7, pp. 1–3
59. Madkour, FedekarFadel, Kamil, Abd El-Wahab, & Nasr, HodaShafik (2012) roduction and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*.
60. Marti-Quijal, F. J., Zamuz, S., Tomašević, I., Gómez, B., Rocchetti, G., Lucini, L., ... Lorenzo, J. M. (2019). Influence of different sources of vegetable, whey and microalgae proteins on the physicochemical properties and amino acid profile of fresh pork sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 110, 316–323.
61. Marti-Quijal, F. J., Zamuz, S., Tomašević, I., Rocchetti, G., Lucini, L., Marszałek, K., ... Lorenzo, J. M. (2019). A chemometric approach to evaluate the impact of pulses, *Chlorella* and *Spirulina* on proximate composition, amino acid, and physicochemical properties of turkey burgers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(7), 3672–3680.
62. Miczke, A., Szulinska, M., Hansdorfer-Korzon, R., Kregielska-Narozna, M., Suliburska, J., Walkowiak, J., & Bogdanski, P. (2016). Effects of spirulina consumption on body weight, blood pressure, and endothelial function in overweight hypertensive Caucasians: A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(1), 150–156.
63. Monteverde, D., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., & Sañudo-Wilhelmy, S. (2017). Life's utilization of B vitamins on early Earth. *Geobiology*, 15(1), 3–18.
64. Morist, A., Montesinos, J. L., Cusidó, J. A., & Gòdia, F. (2001). Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 37(5), 535–547.
65. N. T. Eriksen (2008), “Production of phycocyanin—a pigment with  
Newsted, J. L. (2004). Effect of light, temperature, and pH on the accumulation of phenol by *Selenastrum capricornutum*, a green alga. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59
66. Niccolai, A., Venturi, M., Galli, V., Pini, N., Rodolfi, L., Biondi, N., ... Granchi, L. (2019). Development of new microalgae-based sourdough “crostini”: Functional effects of *Arthrospira platensis* (spirulina) addition. *Scientific Reports*, 9(1), 19433.
67. Nunes, M. C., Graça, C., Vlaisavljević, S., Tenreiro, A., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020). Microalgal cell disruption: Effect on the bioactivity and rheology of wheat bread. *Algal Research*, 45, 101749.

68. Oriquat, G. A., Ali, M. A., Mahmoud, S. A., Eid, R. M., Hassan, R., & Kamel, M. A. (2019). Improving hepatic mitochondrial biogenesis as a postulated mechanism for the antidiabetic effect of *Spirulina platensis* in comparison with metformin. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 44(4), 357–364.
69. Parsons, T., Stephens, K., & Strickland, J. (1961). On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 18(6), 1001–1016.
70. Patel, P., Jethani, H., Radha, C., Vijayendra, S., 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.
71. Patil, G., Chethana, S., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 99(15), 7393–7396.
72. Rangel-Yagui, C. D. O., Danesi, E. D. G., de Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92(2), 133–141.
73. Roberto, Parra-Saldivar (2015). Photosynthetic bioenergy utilizing CO<sub>2</sub>: An approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *Journal of Cleaner Production*, 98.
74. Rodríguez-Sánchez, R., Ortiz-Butrón, R., Blas-Valdivia, V., Hernández-García, A., & CanoEuropa, E. (2012). Phycobiliproteins or C-phycocyanin of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* protect against HgCl<sub>2</sub>-caused oxidative stress and renal damage. *Food Chemistry*, 135(4), 2359–2365.
75. Shariat, A., Abbasalizad Farhangi, M., & Zeinalian, R. (2019). *Spirulina platensis* supplementation, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), oxidative stress markers and anthropometric features in obese individuals: A randomized controlled trial. *Journal of Herbal Medicine*, 17–18, 100264.
76. Simon, J. P., Baskaran, U. L., Shallauddin, K. B., Ramalingam, G., & Evan Prince, S. (2018). Evidence of antidiabetic activity of *Spirulina*.
77. Singh, R. N., & Sharma, Shaishav (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production e a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16.
78. 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.
79. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
80. substance mediated gut microbes improve lipid metabolism in high-fat diet fed rats. *Journal of Functional Foods*, 59, 215–222.
81. Sudhakar, K., Premalatha, M., & Rajesh, M. (2014). Large-scale open pond algae biomass yield analysis in India: A case study. *International Journal of Sustainable Energy*, 33
82. Sun Y. X., Zhang J., Yu G. C. (2005), “Experimental study on the therapeutic effect of C-phycocyanin against pulmonary fibrosis induced by paraquat in rats,” *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, vol. 30, no. 9, pp. 650–655.

83. Tang, G. (2010). Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5)
84. Vardaka, E., Kormas, K. A., Katsiapi, M., Genitsaris, S., & Moustaka-Gouni, M. (2016). Molecular diversity of bacteria in commercially available “Spirulina” food supplements.
85. Wang Y, Qian K.-X., and Dong Q. (1999), “The study for isolation and purification of phycocyanin with high purity and its spectra characteristics,” *Progress in Biochemistry and Biophysics*, vol. 26, no. 5, pp. 457–460