

Optimización de métodos de extracción de R-Ficoeritrina a partir de *Porphyridium cruentum*

E. Garza-Valverde¹, S.A. Cortez-Guardiola¹, M.F. Guzmán-Rodríguez¹, J.A. Vidales-Contreras¹ y C. García-Gómez*¹.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Av. Francisco Villa S/N, Col. Ex Hacienda el Canadá, C.P. 66050, General Escobedo, Nuevo León, México. *celestino.garciagm@uanl.edu.mx

RESUMEN

Las microalgas son productos naturales, valiosos y con potencial para cubrir las necesidades de alimentación. La R-Ficoeritrina (R-PE) es un pigmento obtenido de la microalga *P. cruentum* que ha ganado interés como colorante rosa en alimentos. Por lo tanto, esta investigación se enfocó en optimizar los métodos de extracción. Se utilizó Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) con un diseño compuesto central y tres puntos centrales para evaluar la influencia del tiempo de homogenización, concentración y volumen del buffer en la obtención de R-PE y un índice de pureza (PI) alto. Los métodos evaluados fueron maceración, maceración con baño ultrasónico y maceración combinada con sonda ultrasónica. Las condiciones óptimas para maceración fueron 10 min de homogenización y 3 mL de buffer 0.1 M, para maceración con baño ultrasónico son 5 min de homogenización con 3 mL de buffer 0.1 M y para maceración con sonda ultrasónica fueron 7.9 min de homogenización con 5.7 mL de buffer 0.8 M. Los resultados mostraron el potencial de los métodos de extracción de R-PE para ser usada como colorante natural.

Palabras clave: Microalga, optimización, pureza.

ABSTRACT

Microalgae are natural, valuable products with the potential to cover food needs. R-Phycoerythrin (R-PE) is a pigment obtained from the microalgae *P. cruentum* that has gained interest as a pink colorant in foods. Therefore, this research focused on optimizing extraction methods. Response Surface Methodology (RSM) was obtained with a central composite design and three central points to evaluate the influence of homogenization time, concentration and buffer volume in obtaining R-PE and a high purity index (PI). The methods evaluated were maceration, maceration with ultrasonic bath and combined maceration with an ultrasonic probe. The optimal conditions for maceration were 10 min of homogenization and 3 mL of 0.1 M buffer, for maceration with ultrasonic bath they were 5 min of homogenization with 3 mL of 0.1 M buffer and for maceration with ultrasonic probe they were 7.9 min of homogenization with 5.7 mL of 0.8 M buffer. The results showed the potential of R-PE extraction methods to be used as a natural dye.

Keywords: Microalgae, optimization, purity.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son productos naturales y valiosos por su contenido de compuestos bioactivos y nutrientes. Son ricas en proteínas, aminoácidos, vitaminas, varios minerales, polisacáridos, esteroides y ácidos grasos (Durmaz *et al.*, 2020). Recientemente, la preocupación por problemas de salud y seguridad en el consumo de alimentos procesados ha aumentado, por lo que las microalgas han sido tendencia en aditivos naturales y se espera que también lo hagan como nutraceuticos. Debido a esto, muchas empresas han iniciado en la comercialización de alimentos funcionales que contienen biomasa de microalgas (Levasseur *et al.*, 2020). El alto contenido de proteína de varias especies de microalgas ha sido una de las principales razones para considerarlas como una fuente de alimento (Paggi, 2019).

La ficoeritrina (PE) es una proteína que se encuentra abundantemente en *Porphyra* sp. y representa del 1.3 a 1.5% de la biomasa seca. Esta molécula es soluble en agua y también fluorescente, además de pertenecer a la familia de las ficobiliproteínas (PBPs). La PE posee una buena estabilidad en un rango de pH de 3 a 10, pero un tratamiento térmico encima de 40°C reduce notablemente la intensidad del color (Simovic *et al.*, 2022). La PE se encuentra en algunas cianobacterias unicelulares que viven en ciertas condiciones de luz, casi siempre son algas rojas. Estas algas muestran una fuerte absorción en la región verde del espectro visible de 480 nm a 570 nm y una emisión de fluorescencia densa a 575 nm aproximadamente. Estas proteínas se pueden clasificar según los espectros de absorción, en tres subgrupos: B-PE (B-ficoeritrina) con un pico máximo de absorción a 545 nm y un hombro a 495 nm, R-PE (R-ficoeritrina) con picos máximos de absorción a 565, 545 y 495 nm, mientras que C-PE (C-ficoeritrina) tiene picos máximos de absorción a 563 o 543 y 492 nm (Li *et al.*, 2020). Otra clasificación es según la fuente de la PE en B, R y C; “B” es para Bangiales, “R” para Rhodophyta y “C” para Cianobacteria (Mittal *et al.*, 2017).

El pigmento R-PE, posee propiedades fluorescentes y antioxidantes. Este también ha ganado interés como colorante rosa natural en alimentos, cosméticos y medicamentos. Solamente pocos estudios han usado R-PE directamente en aplicaciones en alimentos (García *et al.*, 2021). Debido al potencial de la R-PE para la fortificación y coloración de los alimentos, así como la necesidad de reemplazar a los colorantes sintéticos, se ha comenzado a utilizar como colorante alimentario en Asia (Simovic *et al.*, 2022). Entre las aplicaciones de PBPs en alimentos se encuentran postres de gelatina, puddings, masa madre, bebidas lácteas y refrescos, pero también se necesita soportar su uso con pruebas de toxicidad. En Europa no existe una autorización para usar PE como colorante o aditivo alimentario. Por lo que se necesita que, en un futuro, exista una mayor investigación enfocada en la interacción de PBPs con alimentos, estabilizadores y su biodisponibilidad (Pereira *et al.*, 2020).

Actualmente, la tendencia es impulsar la búsqueda de alternativas naturales para alejarse de los aditivos artificiales y así reemplazar los compuestos sintéticos. Desafortunadamente, los colorantes naturales son químicamente más inestables. Estos muestran una gran sensibilidad al calor, pH, luz, oxígeno y condiciones de procesamiento (Pereira *et al.*, 2020). Las microalgas revelan su potencial de forma visible para cubrir las necesidades de alimentación de forma sostenible. La riqueza de sus compuestos puede favorecer al desarrollo de una industria alimentaria fundada en microalgas con la finalidad de producir y usarlas para crear productos alimenticios funcionales e innovadores y así obtener beneficios viables para la salud (Caporgno & Mathys, 2018). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar y optimizar diferentes métodos de extracción para la obtención de R-PE a partir de la microalga *Porphyridium cruentum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La microalga *P. cruentum* se obtuvo del Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Aguas, Suelos y Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León y se preservó a 26°C para la

experimentación. Esta se cultivó en Medio F2 modificado nutriente (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975) el cual consistió en (g L^{-1}): NaNO_3 (75), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.842), Na_2EDTA (0.436), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.315), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.022), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.01), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.18). Se mantuvo el cultivo líquido estéril a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo aireación continua y con un fotoperiodo de 12 h con 1000 Klux.

Métodos de extracción

Para la obtención de R-PE se analizaron tres métodos de extracción: maceración, maceración con sonda ultrasónica y maceración con baño ultrasónico (Pereira *et al.*, 2020). Para todos los experimentos se utilizaron 0.1 g de biomasa liofilizada de *P. cruentum*, la cual se lavó con 10 mL de agua destilada y se homogenizó. Se centrifugó (Civeq 80-2, Velaquin) durante 10 min a 4000 rpm a 25°C y el pellet se suspendió en diferentes concentraciones de buffer NaH_2PO_4 (0.1, 0.5 y 1 M, pH 6.8) con diferentes volúmenes (3, 5 y 7 mL), posteriormente se homogenizó con la ayuda de un agitador magnético durante diferentes periodos de tiempo (5, 10 y 15 min). Para el tratamiento 1 que fue maceración, la suspensión se molió con un mortero y un pistilo por 10 min (Fig. 1a). En el tratamiento 2 que combinó la maceración con el baño ultrasónico, la suspensión previamente macerada se sometió a un baño ultrasónico frío (PS-08A, Generic) durante 30 min (Fig. 1b). Para el tratamiento 3 con sonda ultrasónica, la suspensión previamente macerada se colocó en un baño frío y se sonicó con una sonda ultrasónica (8M2004, Generic) durante 4 min (Fig. 1c). Posteriormente las muestras se centrifugaron 10 min a temperatura ambiente a 4000 rpm (Civeq 80-2, Velaquin) y se descartó el pellet. El sobrenadante se analizó en un espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific) a 564, 592, 455 y 280 nm.



Figura 1. a) Maceración b) Baño ultrasónico c) Sonda ultrasónica.

Cuantificación de ficobiliproteínas

La cuantificación de la R-PE extraída se hizo con la Ec. (1) (Pereira *et al.*, 2020):

$$R - PE = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) * 0.2] * 0.12 \quad (1)$$

Donde A_{564} es la absorbancia máxima de R-PE. A_{592} y A_{455} son las absorbancias mínimas para la corrección de línea base, 0.12 es el coeficiente de absorción para R-PE y 0.2 es la constante de corrección. El rendimiento de R-PE se expresó en mg R-PE/g de biomasa. La pureza de los extractos se determinó mediante el índice de pureza (purity index, PI) con la Ec. (2). Donde A_{564} es la absorbancia máxima de R-PE y A_{280} es la absorbancia de proteínas totales (Pereira *et al.*, 2020).

$$PI = A_{564}/A_{280} \quad (2)$$

Diseño experimental

Se utilizó Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) con un diseño compuesto central y tres puntos centrales. Diferentes condiciones de tiempo de homogenización, concentración y volumen de buffer fueron evaluadas. Los rangos de las variables independientes entre los límites superior e inferior se establecieron de acuerdo a la Tabla 1. Mediante el software Design Expert (Versión 12) se investigaron los efectos de los parámetros, así como la predicción de las condiciones óptimas. Resultaron 17 corridas experimentales (Tabla 2).

Tabla 1. Rango de niveles de variables.

VARIABLES INDEPENDIENTES	Factor	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
Tiempo de homogenización	A	5	10	15
Concentración buffer	B	0.1	0.5	1
Volumen buffer	C	3	5	7

Tabla 2. Corridas experimentales.

Run	A	B	C
1	15	1	7
2	10	0.5	3
3	10	0.5	5
4	10	0.5	5
5	15	0.1	3
6	10	0.1	5
7	10	0.5	5
8	5	1	7
9	15	0.5	5
10	5	1	3
11	5	0.1	7
12	15	0.1	7
13	10	0.5	7
14	5	0.1	3
15	15	1	3
16	10	1	5
17	5	0.5	5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelo matemático para las respuestas basado en los resultados de ANOVA

Para las variables respuesta analizadas se utilizaron las ecuaciones polinomiales de segundo orden mostradas, según los resultados de ANOVA. Para el tratamiento con maceración las Ec. (3) y (4) corresponden a R-PE y PI respectivamente. Las Ec. (5) y (6) presentan el tratamiento con maceración y baño ultrasónico, R-PE y PI. Para el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica, las Ec. (7) y (8) corresponden a R-PE y PI.

$$R - PE_M = +0.223067 + 0.001504(A) - 0.181295(B) - 0.051083(C) + 0.00226(A)(B) + 0.000473(A)(C) + 0.022629(B)(C) - 0.000138(A^2) + 0.043217(B^2) + 0.002712(C^2) - 0.000666(A)(B)(C) \quad (3)$$

$$PI_M = +0.834922 + 0.025673(A) - 0.534188(B) - 0.200066(C) + 0.006284(A)(B) + 0.001429(A)(C) + 0.086424(B)(C) - 0.001411(A^2) + 0.052029(B^2) + 0.012478(C^2) - 0.002036(A)(B)(C) \quad (4)$$

$$R - PE_{M+B} = +0.225493 - 0.003535(A) - 0.166264(B) - 0.042258(C) + 0.002536(A)(B) + 0.000216(A)(C) + 0.017579(B)(C) + 0.000125(A^2) + 0.040599(B^2) + 0.002265(C^2) - 0.000459(A)(B)(C) \quad (5)$$

$$PI_{M+B} = +0.820108 + 0.012034(A) - 0.334381(B) - 0.169899(C) + 0.000194(A)(B) - 0.001099(A)(C) + 0.031307(B)(C) - 0.000541(A^2) + 0.040362(B^2) + 0.013475(C^2) - 0.001085(A)(B)(C) \quad (6)$$

$$R - PE_{M+S} = +0.170090 - 0.008748(A) - 0.184203(B) - 0.014912(C) + 0.007213(A)(B) + 0.001023(A)(C) + 0.026074(B)(C) + 0.000178(A^2) + 0.040229(B^2) - 0.001227(C^2) - 0.001382(A)(B)(C) \quad (7)$$

$$PI_{M+S} = +0.260159 + 0.008317(A) - 0.172152(B) + 0.054068(C) + 0.018901(A)(B) - 0.001660(A)(C) - 0.026801(B)(C) - 0.000572(A^2) + 0.181331(B^2) - 0.005896(C^2) + 0.000425(A)(B)(C) \quad (8)$$

Los resultados experimentales obtenidos de las 17 corridas y los predichos para R-PE y PI para los tres tratamientos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento de R-PE y PI para maceración.

Run	R-PE (mg/g)		PI		R-PE (mg/g)		PI		R-PE (mg/g)		PI	
	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b	Exp. ^a	Pred. ^b
1	0.019	0.175	0.237	0.654	0.021	0.164	0.260	0.645	0.019	0.118	0.307	0.258
2	0.046	0.132	0.330	0.492	0.045	0.157	0.332	0.641	0.027	0.108	0.238	0.252
3	0.039	0.095	0.282	0.355	0.040	0.169	0.288	0.675	0.044	0.114	0.432	0.256
4	0.016	0.063	0.206	0.242	0.015	0.184	0.227	0.715	0.020	0.122	0.365	0.264
5	0.101	0.036	0.461	0.155	0.100	0.152	0.437	0.651	0.070	0.094	0.342	0.247
6	0.045	0.015	0.283	0.092	0.044	0.178	0.274	0.714	0.030	0.115	0.216	0.259
7	0.045	0.000	0.327	0.055	0.038	0.173	0.282	0.706	0.042	0.114	0.426	0.258
8	0.024	-0.011	0.263	0.043	0.023	0.183	0.250	0.728	0.023	0.119	0.235	0.262
9	0.030	-0.016	0.291	0.055	0.033	0.179	0.250	0.717	0.032	0.119	0.252	0.262
10	0.040	-0.015	0.251	0.092	0.043	0.183	0.281	0.724	0.043	0.114	0.424	0.259
11	0.015	-0.009	0.202	0.155	0.028	0.188	0.294	0.729	0.000	0.112	0.302	0.258
12	0.032	0.002	0.247	0.242	0.032	0.178	0.234	0.701	0.018	0.121	0.178	0.263
13	0.032	0.019	0.314	0.354	0.030	0.165	0.301	0.664	0.017	0.112	0.251	0.255
14	0.101	0.041	0.465	0.491	0.103	0.141	0.457	0.601	0.088	0.091	0.402	0.245
15	0.043	0.069	0.249	0.654	0.050	0.163	0.291	0.640	0.052	0.114	0.545	0.255
16	0.028	0.102	0.282	0.841	0.029	0.152	0.268	0.604	0.040	0.117	0.395	0.255

17 0.019 0.141 0.182 1.053 0.030 0.157 0.248 0.604 0.031 0.120 0.256 0.257

^aValores experimentales de respuesta.

^bValores predichos de respuesta (RSM).

Tratamiento con maceración

Los resultados reales y predichos del rendimiento de R-PE y PI con el tratamiento de maceración se muestran en la Tabla 3. Se realizó un análisis de la aproximación adecuada de los modelos sugeridos utilizando un gráfico de residuos para R-PE y PI (Fig. 2a y 3a). La correlación lineal entre los residuos estudiados se graficó contra la probabilidad normal y demostró un buen ajuste entre los datos pronosticados y los datos reales del tratamiento con maceración, donde se observa que los datos se distribuyen sobre una línea. Por lo tanto, este modelo matemático puede usarse para predecir la obtención de R-PE y PI con maceración. En la Fig. 2b se muestra el efecto del tiempo de homogenización y la concentración del buffer en el tratamiento con maceración, donde se aprecia que la disminución en la concentración del buffer hasta 0.1 M incrementó la obtención de R-PE, mientras que, para el tiempo de homogenización, con poca variación, los valores más altos fueron superiores a 10 min. En los valores de PI con maceración (Fig. 3b) se vio una tendencia similar al aumentar con la disminución de la concentración del buffer y mantenerse el tiempo de homogenización más de los 10 min.

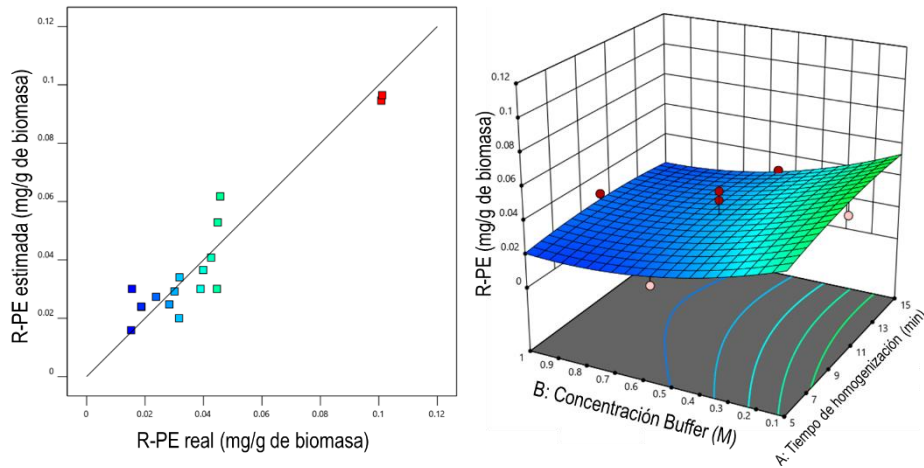


Figura 2. a) Valores pronosticados de R-PE versus la respuesta real. b) Efecto de A y B en R-PE.

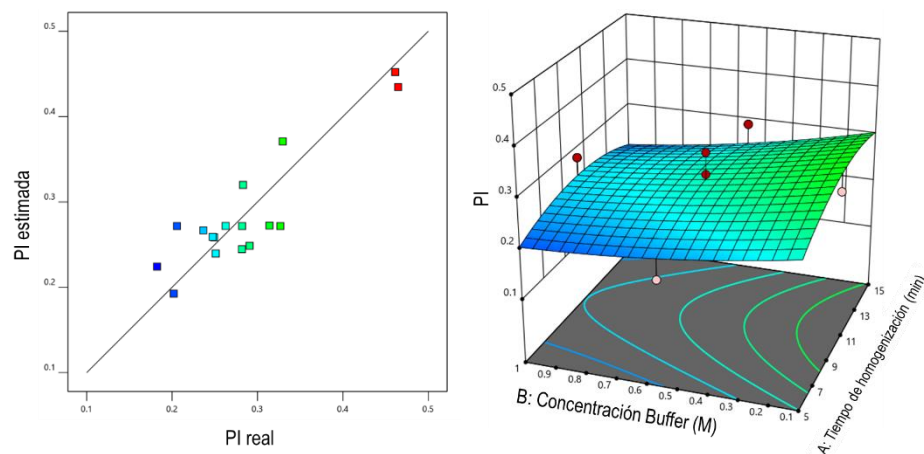


Figura 3. a) Valores pronosticados de PI versus la respuesta real. b) Efecto de A y B en PI.

Tratamiento con maceración y baño ultrasónico

Los resultados reales y predichos del rendimiento de R-PE y PI con el tratamiento de maceración y baño ultrasónico se muestran en la Tabla 3. Para el tratamiento de maceración y baño ultrasónico se realizó un gráfico de residuos donde se muestra un ajuste cercano a la línea de 45 grados. Esto indica un buen ajuste entre los datos pronosticados y los datos reales de R-PE y PI (Fig. 4a y 5a), por lo que este modelo matemático es útil para predecir la obtención de R-PE y PI con maceración y baño ultrasónico. En la Fig. 4b se muestra el efecto del tiempo de homogenización y la concentración del buffer en el tratamiento con maceración y baño ultrasónico, donde se aprecia que la disminución en la concentración del buffer hasta 0.1 M incrementó la obtención de R-PE, además el tiempo de homogenización mostró resultados favorables en 5 min, descendieron cerca de 10 min y se incrementaron en 15 min. En PI (Fig. 5b) los mejores resultados fueron con la concentración menor de buffer y menor tiempo de homogenización.

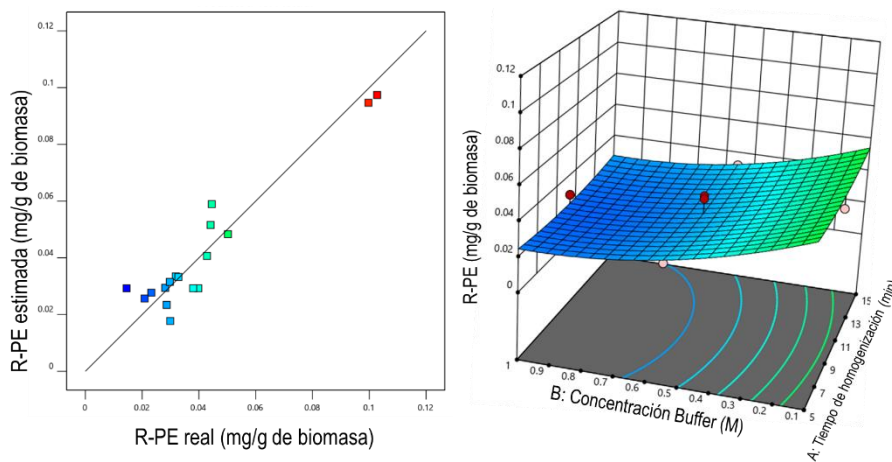


Figura 4. a) Valores pronosticados de R-PE versus la respuesta real. b) Efecto de A y B en R-PE.

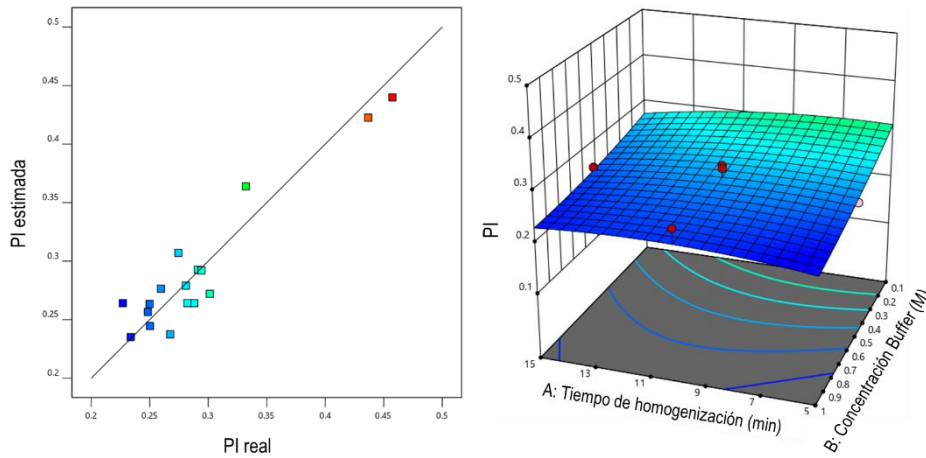


Figura 5. a) Valores pronosticados de PI versus la respuesta real. b) Efecto de A y B en PI.

Tratamiento con maceración y sonda ultrasónica

Los resultados de los tratamientos con maceración y sonda ultrasónica, se muestran en la Tabla 3. Por otro lado, se realizó un análisis de la aproximación adecuada de los modelos sugeridos utilizando un gráfico de residuos para R-PE y PI (Fig. 6a y 7a). La correlación lineal demostró un buen ajuste entre los datos pronosticados y los datos reales del tratamiento con maceración y sonda ultrasónica, ya que los datos se distribuyen sobre una línea de 45 grados. Por lo tanto, este modelo matemático puede usarse para predecir la obtención de R-PE y PI con maceración y sonda ultrasónica.

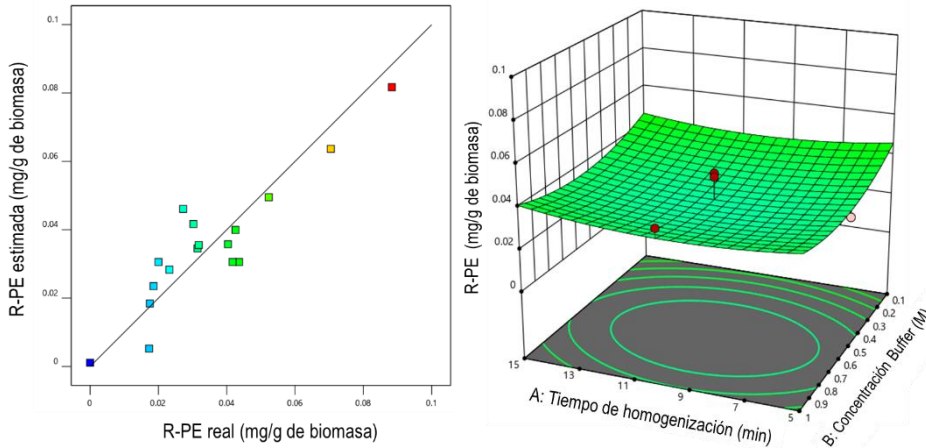


Figura 6. a) Valores pronosticados de R-PE versus la respuesta real. b) Efecto de A y B en R-PE.

En la Fig. 6b se muestra el efecto del tiempo de homogenización y la concentración del buffer en el tratamiento con maceración y sonda ultrasónica, donde se aprecia que los resultados más altos se ubican en los rangos altos y bajos de la concentración de buffer y tiempo de homogenización. En los valores de PI (Fig. 7b) los mejores resultados fueron con el menor tiempo de homogenización y con una concentración de buffer baja y alta, los menores resultados correspondieron a un buffer 0.5 M.

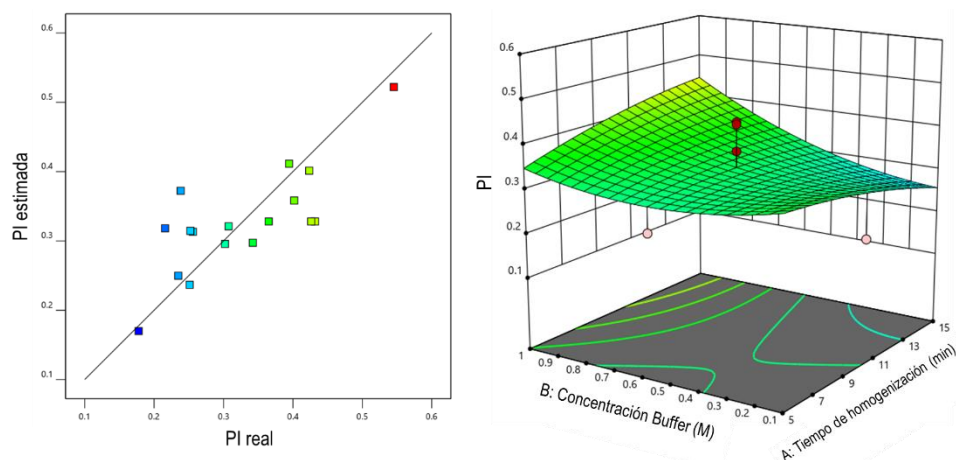


Figura 7. a) Valores pronosticados de PI versus la respuesta real. b) Efecto de A y B en PI.

Los resultados obtenidos mostraron que, para la extracción del pigmento, la maceración es un método eficiente por sí solo o si se combina con el baño ultrasónico. El uso de buffer 0.1 M es también parte de las condiciones óptimas encontradas, mientras que lo menos significativo fue el tiempo de homogenización. Estos resultados coinciden con lo reportado por Pereira *et al.* (2020), pero obtuvieron 3.6 mg R-PE/g de biomasa con la misma concentración de buffer y 10 min de homogenización y la variable menos significativa también fue el tiempo de homogenización. Sin embargo, en el estudio antes mencionado se utilizó la macroalga roja *Gracilaria gracilis*, lo cual pudo influir en que los resultados que obtuvieron fueron mayores que con la microalga *P. cruentum*.

En la Fig. 14 se muestran los colores obtenidos de las extracciones de las 17 corridas experimentales. Algunos de los tratamientos con maceración y sonda ultrasónica (Fig. 13b) tuvieron un color ligeramente naranja, por lo que se descartaron al no ser similares al color normalmente obtenido. Pereira *et al.* (2020) mencionan que a un periodo de tratamiento largo en la extracción se puede observar una degradación de PBPs, lo cual pudo afectar el color. Por otro lado, los colores más intensos y característicos del pigmento fueron los experimentos 5 y 14, particularmente maceración y baño ultrasónico con maceración (Fig. 13. 5 a y b, 14 a y b), quienes también mostraron los resultados más altos en la R-PE.

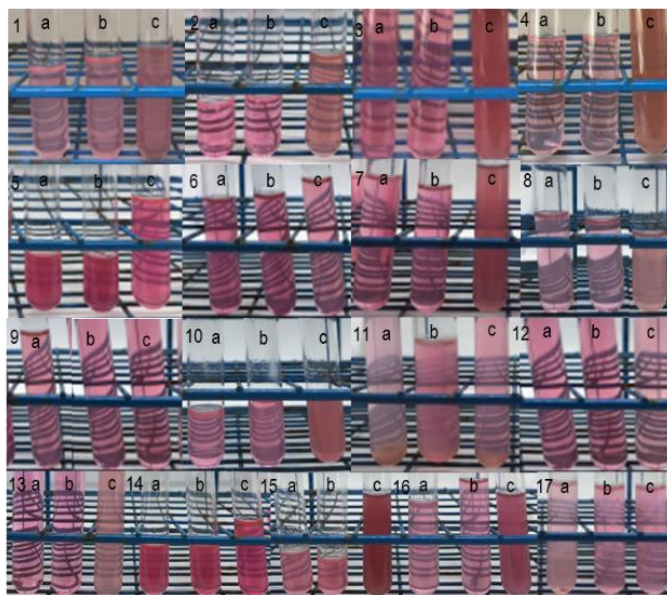


Figura 8. Color de R-PE de las 17 corridas experimentales. a) Maceración. b) Maceración y baño ultrasónico. c) Maceración y sonda ultrasónica.

CONCLUSIÓN

La maceración y el baño ultrasónico con maceración fueron los tratamientos con mejores resultados. Con 3 mL de buffer fosfato de sodio 0.1 M con 5 y 15 min de homogenización se obtuvieron los resultados más altos, y el tiempo de homogenización fue lo que menos influyó. Las condiciones óptimas para la extracción con maceración fueron 10 min de homogenización y 3 mL de buffer 0.1 M para obtener 0.099 mg R-PE/g y PI de 0.48. La extracción con maceración y baño ultrasónico tuvo condiciones de 5 min de homogenización con 3 mL de buffer 0.1 M para obtener 0.097 mg R-PE/g y PI de 0.44. Para la extracción con maceración y sonda ultrasónica fueron 7.9 min de homogenización con 5.7 mL de buffer 0.8 M para obtener 0.026 de mg R-PE/g y PI de 0.321. Estos resultados mostraron el potencial de los métodos de extracción en la biomasa de *P. cruentum* para ser una buena fuente de R-PE y usarse como un colorante alimenticio natural.

BIBLIOGRAFÍA

- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (1998). Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Washington: ADAC International.
- Bermejo, R., Álvarez-Pez, J. M., Ación F., F. G. & Molina G., E. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93, 73-85.
- Bligh, G. E. & Dyer, J. W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Caporgno, M. & Mathys, A. (2018). Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Frontiers in nutrition*, 5, 1-10.

- Durmaz, Y., Kilicli, M., Toker, O., 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, 1-8.
- García, A., Longo, E., Murillo, M. & Bermejo, R. (2021). Using a B-Phycoerythrin Extract as a Natural Colorant: Application in Milk-Based Products. *Molecules*, 26, 1-13.
- Guillard, R.R.L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Cultures of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press. 26-60 pp.
- Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 40, 63-70.
- Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equation for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations. *Biochimie and Physiologie Pflanze*, 167, 191-194.
- Levasseur, W., Perré, P. & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41, 1-23.
- Li, W., Pu, Y., Tang, Z., Zhao, F., Xie, M. & Qin, S. (2020). Energy transfer dynamics in B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium purpureum*. *Chinese Journal of Physics*, 66, 24-35.
- Mittal, R., Tavanandi, H. A., Mantri, V. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2017). Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum* (Rhodophyta). *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 92-103.
- Paggi, A. (2019). Microalgae as a Potential Source of Proteins (Elsevier). *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* (p. 70-73).
- Pereira, T., Barroso, S., Mendes, S. and Gil, M. M. (2020). Stability, kinetics, and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis*. *Journal of Food Science*, 0, 1-5.
- Simovic, A., Combet, S., Velickovic, T. C., Nikolic, M. & Minic, S. (2022). Probing the stability of the food colourant R-phycoerythrin from dried Nori flakes. *Food Chemistry*, 374, 1-10.
- Strickland, J. D. and Parsons, T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. Pigments analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. *Fish Resource Building Canada Bulletin*, 167, 185-199.
- Yemm, E. W. & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry*, 57, 508-514.