

EVALUATIE VAN ENKELE PRODUCTIEPARAMETERS VAN SPIRULINA (*ARTHROSPIRA PLATENSIS*) IN BENIN, WEST-AFRIKA

Louise Kindt

Stamnummer: 01406500

Promotoren: Prof. Dr. Geert Baert, ing. Filip Debersaques

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de biowetenschappen: land- en tuinbouwkunde - afstudeerrichting tropische plantaardige productie

Academiejaar: 2018 - 2019



UNIVERSITEIT
GENT

EVALUATIE VAN ENKELE PRODUCTIEPARAMETERS VAN SPIRULINA (*ARTHROSPIRA PLATENSIS*) IN BENIN, WEST-AFRIKA

Louise Kindt

Stamnummer: 01406500

Promotoren: Prof. Dr. Geert Baert, ing. Filip Debersaques

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de biowetenschappen: land- en tuinbouwkunde - afstudeerrichting tropische plantaardige productie

Academiejaar: 2018 - 2019



UNIVERSITEIT
GENT

Auteursrechtelijke bescherming

De auteur en promotor geven de toelating dit manuscript voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van het werk te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperking van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting van de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

The author and promotor give the permission to use this manuscript for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this dissertation.

23/08/2019

Auteur
Louise Kindt

Promotor 1
Geert Baert

Promotor 2
Filip Debersaques

Voorwoord

Voor u ligt de masterproef: “Evaluatie van enkele productieparameters van spirulina (*Arthrospira platensis*) in Benin, West-Afrika” die het sluitstuk vormt van mijn opleiding biowetenschappen-landbouw. Het was een erg leerrijke periode, niet alleen het schrijven van de masterproef maar ook het individueel uitvoeren en uitdenken van de experimenten en het verblijf in Benin waren een hele ervaring. Het is een werk van lange adem geweest waarbij ik hulp kreeg van verschillende personen die ik graag zou willen bedanken.

Allereerst wil ik mijn twee promotors Prof. Dr. Geert Baert en ing. Filip Debersaques willen bedanken voor de begeleiding. De vele tips en feedback die ze mij gaven en de tijd die ze vrijmaakten om telkens na te lezen en bij te sturen waren goud waard.

Vervolgens wil ik zeker ook Jan Moens en David Amfreville (AML) bedanken voor het aanbrenge van het onderwerp van deze masterproef en het mogelijk maken van het onderzoek. Jullie hebben er alles aangedaan om mij met raad en daad bij te staan in Benin en mij er zo snel mogelijk thuis te laten voelen. Bedankt! Een speciale vermelding voor Franck: mijn rechterhand, chauffeur, handige Harry en zo veel meer tijdens mijn verblijf en de experimenten in Benin.

Graag wil ik ook nog al mijn vrienden bedanken voor de aanmoedigingen en de ontspanning. Daarbij ook zeker een woord van dank voor Wout, mijn vriend en rots in de branding.

Tot slot wil ik ook graag mijn ouders bedanken voor alle steun, niet alleen tijdens deze masterproef maar ook tijdens mijn volledige opleiding. Bedankt om altijd in mij te blijven geloven, voor alle positiviteit en duwtjes in de rug.

Louise Kindt

Gent, 23 augustus 2019

Abstract Nederlands

Uit de literatuur blijkt dat spirulina een microalg is met een enorm potentieel. Het wordt vaak als 'superfood' omschreven vanwege de grote variatie en concentratie aan voedingsstoffen die het bevat. Vooral door de hoge gehalten aan kwalitatieve proteïnen wordt het wereldwijd gebruikt als voedingssupplement. Spirulina heeft ook nog tal van andere toepassingen zoals bijvoorbeeld in dierenvoeding en als bron van pigmenten.

De masterproef omvat enerzijds een gedetailleerde literatuurstudie over de teelt van spirulina (groeimedium, turbulentiecontrole, voedingsbronnen, manier van oogsten..) en anderzijds werd via een praktijkstudie nagegaan hoe verschillende parameters de groei van spirulina kunnen beïnvloeden. De experimenten hiervoor vonden plaats in Cotonou, Benin in West-Afrika.

Als eerste experiment werd in kleine bassins spirulina opgekweekt waarbij ook de invloed van de toevoeging van bicarbonaat bestudeerd werd. In een daaropvolgend experiment werd een schaalvergroting doorgevoerd en werd de cultuur overgebracht naar een groter bassin om te kunnen oogsten. Tijdens het verloop van de proeven werden de temperatuur, pH en concentratie spirulina nauwgezet bijgehouden. In Gent werden tenslotte de in Benin gekweekte spirulina en 2 aangekochte monsters geanalyseerd.

Uit de resultaten van de proeven kan geconcludeerd worden dat heel wat factoren een rol spelen in een goede teelt. Het klimaat in het zuiden van Benin blijkt omwille van de te lage temperatuur en het onvoorspelbaar karakter van neerslag niet optimaal. Desondanks is wel gebleken dat op een relatief eenvoudige manier en met simpele installaties een teelt van spirulina gerealiseerd kan worden. Het gebruik van NPK i.p.v. afzonderlijke meststoffen heeft geen invloed op het eindproduct maar zorgt indirect wel voor een mindere groei o.a. door een te lage pH. De (gefractioneerde) toevoeging van bicarbonaat blijkt in deze proeven geen invloed te hebben. Uit de analyse van de stalen werd geconcludeerd dat de geoogste spirulina nutritioneel evenwaardig is met de andere stalen. Met een minimum aan kennis en meststoffen kan dus door zelfkweek in bv. huishoudens in derdewereldlanden een hoogwaardige eiwitbron en alternatief voor melk verkregen worden.

Kernwoorden: spirulina-microalg-cultivatie-eiwitbron-Cotonou

Abstract Engels

The literature shows that spirulina is a microalgae with an enormous potential. It is often described as 'superfood' because of the large variety and concentration of nutrients it contains. Because of its rich content of high quality proteins, it is used worldwide as a food supplement. Spirulina also has many other applications, including ingredients in animal feed and as a source of pigments.

On the one hand the master's thesis comprises a detailed literature study on the cultivation of spirulina (growth medium, turbulence control, food sources, way of harvesting, etc.) and on the other hand a practical study to examine how different parameters can influence the growth of spirulina. The experiments took place in Cotonou, Benin in West Africa.

In a first experiment, spirulina was grown in small basins and the influence of the addition of bicarbonate was also studied. In a subsequent experiment, an increase in scale was carried out and the culture was transferred to a larger basin in order to harvest. During the course of the experiments, the temperature, pH and concentration of spirulina were closely monitored. Finally, in Ghent, the spirulina grown in Benin and 2 purchased samples were analysed.

From the results of the trials it can be concluded that many factors play a role in an optimal cultivation. The climate in the south of Benin appears not to be ideal due to the low temperature and the unpredictable nature of precipitation. Nevertheless, it has been shown that the cultivation of spirulina can be realised in a relatively simple way and with simple installations. The use of NPK instead of individual fertilizers has no influence on the final product, but indirectly results in a lower growth due to, among other things, a too low pH. The (fractionated) addition of bicarbonate does not appear to have any influence in these tests. From the analysis of the samples it was concluded that the harvested spirulina is nutritionally equivalent to the other samples. With a minimum of knowledge and fertilizers, a high quality source of protein and an alternative to milk can be obtained by means of self-cultivation, e.g. in households in third world countries.

Keywords: *spirulina-microalgae-cultivation-proteinsource-Cotonou*

Inhoudstafel

1	Literatuurstudie	1
1.1	Inleiding.....	1
1.2	Microalgen.....	2
1.2.1	Algemeen	2
1.2.1.1	Karakteristieken	2
1.2.1.2	Toepassingen.....	2
1.2.2	Spirulina	4
1.2.2.1	Karakteristieken	4
1.2.2.2	Taxonomie	5
1.2.2.3	Historisch gebruik.....	7
1.3	Teelttechniek en cultivatiesystemen.....	8
1.3.1	Industriële productie.....	8
1.3.1.1	Algemeen	8
1.3.1.2	Systemen.....	10
1.3.2	Small scale productie	12
1.4	Cultivatie - groeifactoren.....	14
1.4.1	Algemeen	14
1.4.2	Nutrienten.....	14
1.4.2.1	Vereiste nutriënten en hun functie	14
1.4.2.2	Cultuurmedia.....	18
1.4.2.3	Productiviteit.....	19
1.4.3	pH.....	20
1.4.4	Temperatuur	20
1.4.5	Licht	21
1.4.6	O ₂ en CO ₂	22
1.4.6.1	Mengsystemen	22
1.4.6.2	Zuurstof.....	24
1.4.6.1	Koolstofdioxide.....	25
1.4.7	Contaminatie van de spirulinacultuur	25
1.5	Drogen en verwerken.....	26
1.5.1	Productieproces	26

1.5.1.1	Oogsten	27
1.5.1.2	Drogen.....	28
1.5.1.3	Verwerken.....	29
1.6	Samenstelling en nutritionele waarde.....	30
1.6.1	Biochemische samenstelling	30
1.6.1.1	Proteïnen	31
1.6.1.2	Lipiden en essentiële vetzuren	32
1.6.1.3	Koolhydraten.....	32
1.6.1.4	Vitaminen.....	33
1.6.1.5	Mineralen	34
1.6.2	Invloed van de groeiomstandigheden op de chemische samenstelling	35
1.6.2.1	Temperatuur	35
1.6.2.2	Licht	35
1.6.3	Toepassingen.....	36
1.6.3.1	Nutritionele toepassingen.....	37
1.6.4	Markt	38
2	Materiaal en methoden	43
2.1	Locatie	43
2.1.1	Algemene info	43
2.1.2	Klimatologisch	44
2.2	Experimenten Benin	45
2.2.1	Materiaal.....	45
2.2.1.1	Opstelling.....	45
2.2.1.2	Inhoud	46
2.2.1.3	Metingen	46
2.2.2	Proefopzet.....	47
2.2.2.1	Proef 1	47
2.2.2.2	Proef 2	47
2.2.2.3	Proef 3	47
2.2.2.4	Proef 4	48
2.3	Nutritionele analyse	50
2.3.1	Geanalyseerde stalen	50
2.3.2	Methoden analyses	50

3	Resultaten	51
3.1	Proeven Benin.....	51
3.1.1	Proef 1	51
3.1.2	Proef 2	53
3.1.3	Proef 3	57
3.1.4	Proef 4	59
3.2	Resultaten nutritionele analyse.....	63
4	Discussie	65
4.1	Proeven Benin.....	65
4.1.1	Proef 1	65
4.1.2	Proef 2	65
4.1.3	Proef 3	65
4.1.4	Proef 4	66
4.1.5	Algemeen	66
4.2	Nutritionele analyse.....	67
5	Conclusie	69
	Bijlagen	73
	Referentie lijst	77

1 Literatuurstudie

1.1 Inleiding

Het is een probleem dat reeds een tijd gekend is: het huidige productiesysteem van de klassieke landbouw kan niet op tegen de steeds stijgende bevolkingsdruk en de stijgende vraag aan voedingseiwitten die daarmee gepaard gaat. Een oplossing kan gezien worden in microbieel eiwit, of 'Single cell protein' (SCP), een nieuwe vorm van eiwit, onafhankelijk van landbouw. SCP is de verzamelnaam voor de gedroogde cellen van micro-organismen zoals bacteriën, gisten, algen en schimmels die op grote schaal gekweekt worden voor menselijke en dierlijke voeding. SCP hebben een aantal typische kenmerken zoals een grote groeisnelheid en een hoog proteïnegehalte. In vergelijking met de traditionele landbouwgewassen vereisen ze ook minder water en land en kunnen ze ook gekweekt worden in afvalwater, wat voor een circulaire economie zorgt en een oplossing biedt voor de dreigende schaarste van proper drinkwater. Daarenboven zijn ze zouttolerant waardoor ook zeewater gebruikt kan worden voor de cultivatie. Verdere voordelen van de cultivatie in vergelijking met traditionele gewassen zijn: een kortere levenscyclus, een continue productie gedurende het ganse jaar en de volledige biomassa die beschikbaar is om te oogsten en te gebruiken (Usharani et al., 2012) (Vonshak, 2002) (Anupama & Ravindra, 2000).

Spirulina, *Arthrospira*, is een microalg behorend tot de blauwalgen of cyanobacteriën. Blauwalgen bezitten voor de captatie van licht voor de fotosynthese, naast chlorofyl, ook een blauw pigment, vandaar de naam. Deze soort algen heeft gelijkenissen met planten aangezien ze aan fotosynthese doen, eigenschappen gemeen hebben met de bacteriën aangezien ze geen celwand bezitten en ze delen ook eigenschappen met het dierenrijk: hun celmembranen bevat namelijk complexe suikers, gelijkaardig aan glycogeen. *Spirulina* is zo'n 0,3 mm lang en kan herkend worden door zijn bijzondere spiraalvorm. Er bestaan meerdere soorten *spirulina*, waarvan de *platensis* soort de meeste aandacht trekt omwille van het grote eiwit-, vitaminen- en mineralengehalte (Usharani et al., 2012). Door de rijkdom aan nutriënten is *spirulina* erg beloftevol vooral in landen waar de traditionele levensmiddelen, hetzij door een gebrek aan middelen, hetzij door onwetendheid, niet voldoende hoeveelheden evenwichtig voedsel kunnen leveren dat nodig is voor een goede gezondheid. In die landen kan *spirulina* dan ook ingezet worden als voedingssupplement in de strijd tegen ondervoeding. Maar ook in de westerse wereld kent *spirulina* heel wat toepassingen, onder andere als gezondheidsvoedsel en natuurlijk supplement maar ook in de industrie voor de productie van chemicaliën en mogelijk ook in diervoeder (Dansou, 2002).

In deze masterproef wordt via een uitgebreide literatuurstudie een breed beeld gegeven over *spirulina* en de kweek van deze micro-alg. Door trials uitgevoerd in Cotonou, Benin in West-Afrika wordt nagegaan hoe verschillende groeiparameters de kweek van *spirulina* kunnen beïnvloeden. Wat is de rol van de gebruikte nutriënten, wat is de invloed van een veranderende temperatuur, pH? Bepalen ook de menging en het aanwezige zonlicht de groei? Ten slotte wordt er ook wat dieper ingegaan worden op de nutritionele waarde van *spirulina*. Is er een invloed van de locatie van cultivatie en de wijze van cultivatie (groeifactoren, teeltsysteem..) op de nutritionele samenstelling? En kan de *spirulina* als dusdanig ook in artisanale systemen zoals in Benin nog als hoogwaardige voedselbron beschouwd worden?

1.2 Microalgen

1.2.1 Algemeen

1.2.1.1 **Karakteristieken**

In de categorie van de algen of fytoplankton bestaan er twee grote groepen nl. de micro- en de macroalgen, ook wel zeewieren genoemd. Deze twee samen vormen de aquatische biomassa en vormen zowel in zoet als in zout water de basis van de meeste voedselketens. Microalgen zijn van de twee groepen veruit de meest interessante. Met een diameter van slechts 1 - 50 μm , zijn het heel kleine plantachtige organismen. Ze bezitten geen bladeren of wortels. De meeste soorten microalgen bevatten chlorofyl, hierdoor wordt via fotosynthese zuurstof geproduceerd door zonlicht te gebruiken als energie bron en CO_2 om te zetten in biomassa. De zuurstof die wereldwijd door algen geproduceerd wordt beslaat meer dan 75% van de totale zuurstofbehoefte voor mens en dier. Ook anorganische elementen zoals nitraat en fosfaat zijn als voedingstof nodig voor de groei van algen. Algen zijn autotroof, ze bouwen hun biomassa op uit anorganische elementen. De elementen worden met behulp van de geproduceerde koolhydraten omgezet in organische stoffen zoals eiwitten en vetten, waardoor algen kunnen gezien worden als de schakel tussen de levende en niet- levende materie (“About algae and cyanobacteria - AlgaePARC,” n.d.)

1.2.1.2 **Toepassingen**

Al decennialang worden microalgen op kleine schaal gekweekt, vooral in Azië en Noord-Amerika. Vaak gaat het dan om een klein aantal soorten zoals *Chlorella* en spirulina, die vooral gekweekt worden voor hun toepassing in de diervoeding en als voedingssupplement. Meer en meer wordt echter ook ingezet op andere biotechnologische toepassingen van algen. Veel chemicaliën, biochemicaliën en farmaceutisch interessante stoffen (stoffen met een antivirale, antibiotische of ontstekingsremmende werking zoals bijvoorbeeld spirulan, allophycocyanine en GLA¹) kunnen namelijk uit microalgen geëxtraheerd worden en ingezet worden in diverse toepassingen in voeding, cosmetica, de farmaceutische en chemische industrie (Vonshak, 2002). Het cultiveren van microalgen is één van de modernste biotechnologieën. De eerste culturen werden uitgevoerd door Beijerinck in 1890 met *Chlorella vulgaris*, het gebruiken van dergelijke culturen voor het bestuderen van de plantenfysiologie werd ontwikkeld door Warburg in het begin van de jaren 1900. Het onderzoek naar en de ontwikkeling van het in massa cultiveren van microalgen begon pas na 1948 in USA, Duitsland en Tokyo. Verdere interesse in algen groeide, vooral wanneer hun potentieel duidelijk werd inzake gas uitwisselen (eventueel voor ruimtevaart) en als bron van proteïnen (Borowitzka, 1999).

Met microalgen kan een heel brede range van producten geproduceerd worden. Dit gaat van chemische producten zoals polymeren en pigmenten tot zetmeel, proteïnen en lipiden voor dierlijke en menselijke voeding. In Tabel 1 is een overzicht gegeven van enkele commercieel belangrijke soorten algen met hun toepassing. Daaruit kan worden afgeleid dat de algen vooral commercieel ingezet worden als voeder voor maritiem leven zoals garnalen, oesters, kreeftjes en vissen. Ook kunnen een aantal algen ingezet worden voor de productie van biobrandstof, deze technieken zijn echter nog volop in ontwikkeling. De toepassingen van spirulina worden later in dit werk nog uitgebreider behandeld, zie 1.5.3.

¹ GLA: gammalinoleenzuur, een omega-6 vetzuur

Tabel 1 Commerciële toepassingen van enkele belangrijke microalgen

ALG	TOEPASSING	AUTEUR
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Voeder voor maritiem leven (oester, garnalen, kreeft)	Ehteshami et al., 2017 Chen et al., 2018 Crisp et al., 2018
<i>Chlorella spp</i>	Visvoeder Gezondheidsvoeder voor mens/ voedingssupplement Biodiesel	de Cruz et al., 2018 Chacón-Lee & González-Mariño, 2010 Muys et al., 2019 Thiruvenkadam et al., 2019
<i>Crypthecodinium cohnii</i>	Synthese van DHA ²	Diao et al., 2019
<i>Dunaliella salina</i>	Voeding (proteïnen) Beta caroteen	Achour et al., 2019 Kleinegris et al., 2011 Rammuni et al., 2019
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Bio diesel Voeder voor maritiem leven	Liang et al., 2018 Carboni et al., 2012 Qi et al., 2018
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantine ³	Salatti-Dorado et al., 2019 Rammuni et al., 2019
<i>Isochrysis spp.</i>	Voeder voor maritiem leven	Marquez et al., 2019 Rayner & Hansen, 2019 Vijayagopal, 2012
<i>Nanochloropsis spp.</i>	Visvoeder	de Cruz et al., 2018 Zhang et al., 2015 Vijayagopal, 2012 Vizcaíno et al., 2019
<i>Pavlova spp</i>	Voeder voor maritiem leven Humaan voeder supplement Bio brandstof	Vijayagopal, 2012 Marquez et al., 2019 Aysu et al., 2018
<i>Skeletonema</i>	Voeder voor maritiem leven	Amaro et al., 2019
<i>Arthrospira/Spirulina platensis</i>	Gezondheidseigenschappen Chemische bestanddelen ...	Capelli & Cysewski, 2010
<i>Tetraselmis suecica</i>	Voeder voor maritiem leven Visvoeder	Apandi et al., 2019 Vizcaíno et al., 2019
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Voeder voor maritiem leven Synthese van DHA Bio brandstof	Parrish et al. , 2012 Adarme-Vega et al., 2012 Lei et al., 2018

² Dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA, C22:6)

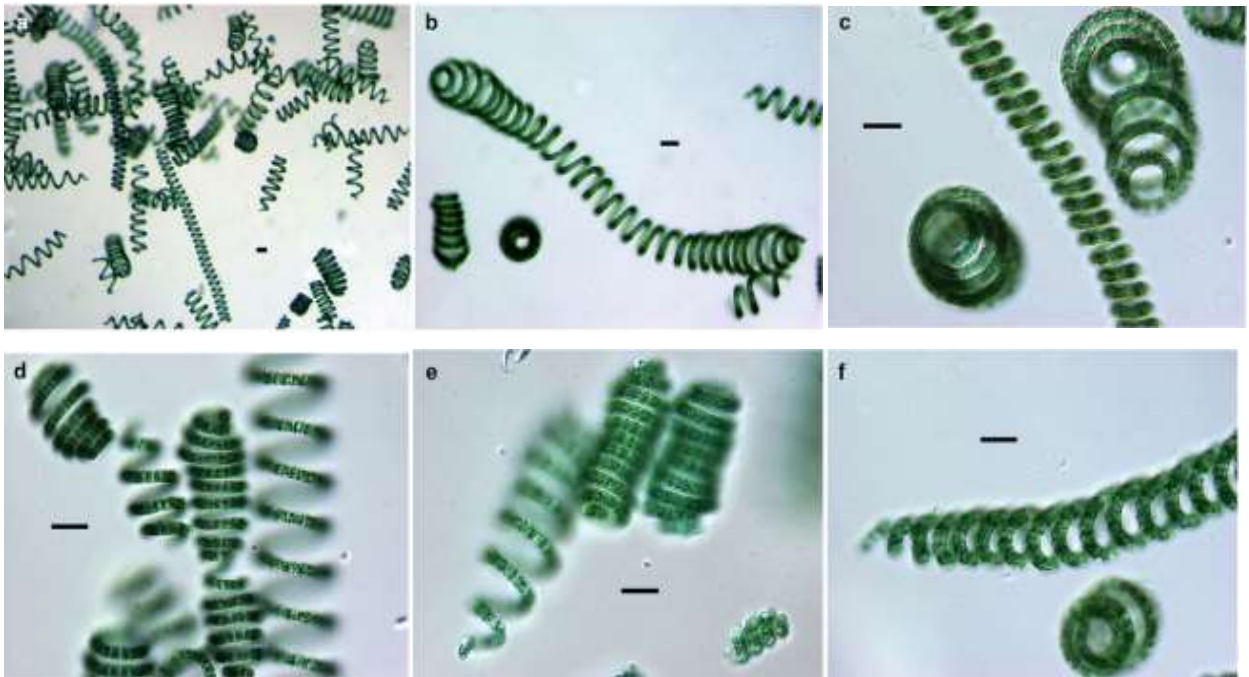
³ Astaxantine, soort carotenoïde met sterke antioxidante werking gebruikt als voedingssupplement in menselijke voeding

1.2.2 *Spirulina*

1.2.2.1 *Karakteristieken*

Spirulina is een primitieve microalg die zijn ontstaan vindt zo'n 3.5 miljoen jaar geleden en daarbij de mogelijkheid ontwikkelde om CO₂ gas opgelost in zeewater te gebruiken als nutriëntenbron voor reproductie. Het is een fotosynthetische organisme en daardoor dus volledig autotroof (Habib et al., 2008).

De uitwendige morfologie van *spirulina*, namelijk de multicellulaire cilindrische trichomen die over het hele filament gerangschikt zijn in een linksdraaiende helix, is kenmerkend voor het genus (Habib et al., 2008) (Vonshak, 2002) (Nuhu, 2013). Deze morfologie is duidelijk zichtbaar wanneer de *spirulina* onder een microscoop wordt bekeken (Figuur 1 en Figuur 2).

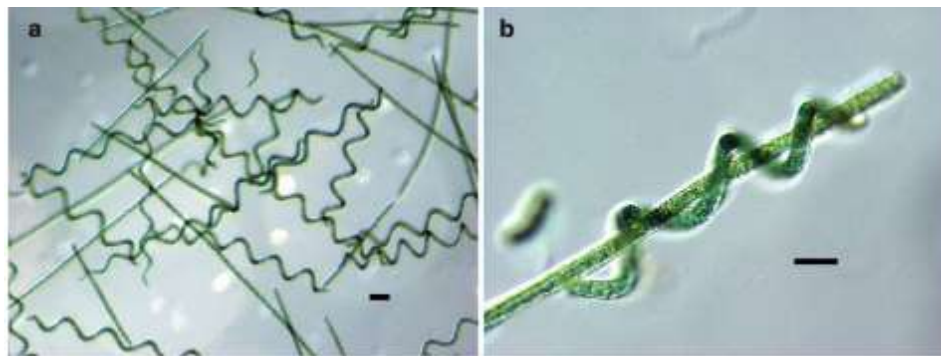


Figuur 1 Duidelijk zichtbare kenmerkende helix morfologie van *spirulina* (Sili, et al., 2012)



Figuur 2 Een beeld van *spirulina* strengen onder een lichtmicroscop, afkomstig uit een cultuur in Pahou

De trichomen van spirulina zijn samengesteld uit cilindrische cellen die binaire celdelingen ondergaan in een enkel vlak, loodrecht op de hoofdas. De trichomen worden opgedeeld in cellen door dwarswanden of septa. Trichoomverlenging treedt op door meerdere intercalaire celdelingen langsheen het gehele filament. Vermenigvuldiging vindt alleen plaats na fragmentatie van een trichoom, meestal het gevolg van een ‘opoffering’ (necrotic cell formation) van een cel of groep cellen op het breekpunt. Dit is echter minder het geval in massaproductie waar de spirulina onderworpen wordt aan een snelle menging (Sili et al., 2012; Habib et al., 2008). De afmetingen en andere morfologische kenmerken van de spirulinastrengen variëren sterk, niet alleen tussen populaties maar zelfs binnen een bepaalde populatie. De trichoombreedte varieert van ongeveer 2,5 tot 16 μm , terwijl de spiraalhoogte zich typisch uitstrekt van 0 tot 80 μm en de diameter van 15 tot 60 μm . (Sili et al., 2012). Omgevingsomstandigheden blijken ook een zekere invloed te hebben op de specifieke geometrie. Zo wordt de helixvorm enkel waargenomen wanneer de alg zich in een vloeistof of medium bevindt en gaat de streng abrupt over in een spiraalvorm wanneer deze in een vaste omgeving wordt gebracht (Vonshak, 2002). Binnen een populatie uit natuurlijke wateren kunnen zelfs rechte strengen voorkomen zoals zichtbaar in Figuur 3. De aanleiding en het mechanisme voor deze verandering zijn echter nog niet opgehelderd. Zeker is wel dat wanneer de rechte strengen verschijnen, hetzij door een natuurlijk fenomeen, hetzij door fysische of chemische veranderingen, deze niet terug converteren naar de helixvorm (Sili et al., 2012).



Figuur 3 Het voorkomen van rechte spirulina-strengen in een populatie geïsoleerd uit Lake Texaco in Mexico (Sili et al., 2012)

De kenmerkende helixvorm blijkt ook een specifieke functie te hebben. Door deze vorm kan de spirulina zichzelf beschermen tegen fotoinhibitie (zie verder) aangezien de helix er voor zorgt dat er schaduw valt op delen van de streng. In een adaptieve tijd kan de helix zich ook aanpassen en compacter worden als bescherming tegen een overmaat aan licht (Sili et al., 2012). Verder zorgt de helixvorm in combinatie met de aanwezigheid van vacuolen in de cellen die gevuld zijn met gas er ook voor dat spirulina drijvende matten vormt die in de natuur makkelijk oogstbaar zijn. Het oppervlak van spirulina is glad en zonder harde bedekking waardoor het door simpele enzymatische systemen gemakkelijk verteerd wordt (Habib et al., 2008).

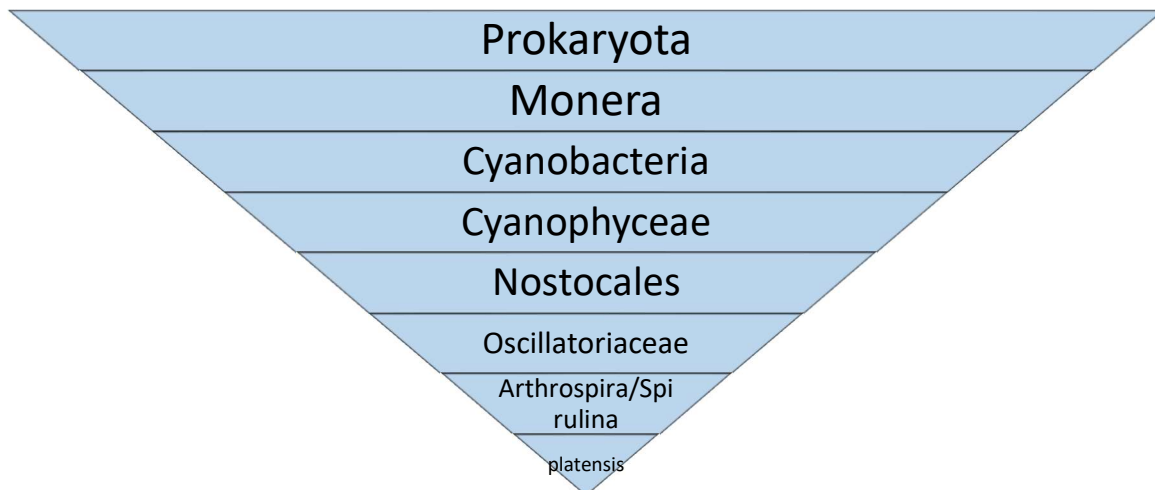
1.2.2.2 Taxonomie

Nadat er in de jaren voorheen al een aantal keer spirulina geïsoleerd werd uit waterstalen, was het pas in 1852 dat er een eerste taxonomisch rapport verscheen, geschreven door Stizenberger. In dit rapport werd het gevonden spirulina-genus de naam *Arthrospira* gegeven, gebaseerd op de aanwezigheid van septa, de spiraalvorm en een multicellulaire structuur (Habib et al., 2008; Sánchez et al., 2003).

In 1892 werden de studies van Stizenberger door Gomont bevestigd. Hij maakte daarenboven een onderscheid en classificeerde de vormen zonder septa onder het genus *Spirulina* en de vormen met septa onder het genus *Arthrospira*. In 1932 werden de micro-organismen uit de twee genera echter terug verenigd door Geitler, hij nam de aan- of afwezigheid van septa niet meer op in de classificatie en deelde de species in enkel op basis van morfologische gelijkenissen. Later werden in meer recente publicaties de twee genera terug als twee gescheiden groepen beschouwd (Habib et al., 2008; Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002).

Spirulina en *Arthrospira* worden door wetenschappers dus beschouwd als twee aparte genera. Echter is het wereldwijde onderzoek naar de microalgen uitgevoerd geweest onder de naam spirulina. De misvatting tussen wetenschappers en gebruikers is moeilijk de wereld uit te helpen. De microalgen die reeds van oudsher gekweekt wordt als voedingssupplement met reeds bewezen uitstekende gezondheidseigenschappen, en die in deze masterproef ook behandeld wordt, zijn species die behoren tot het genus *Arthrospira* maar dus nog heel vaak als spirulina worden aangeduid. Ook verder zal in dit werk de algemene naam spirulina gebruikt worden (Sánchez et al., 2003; Sili et al., 2012).

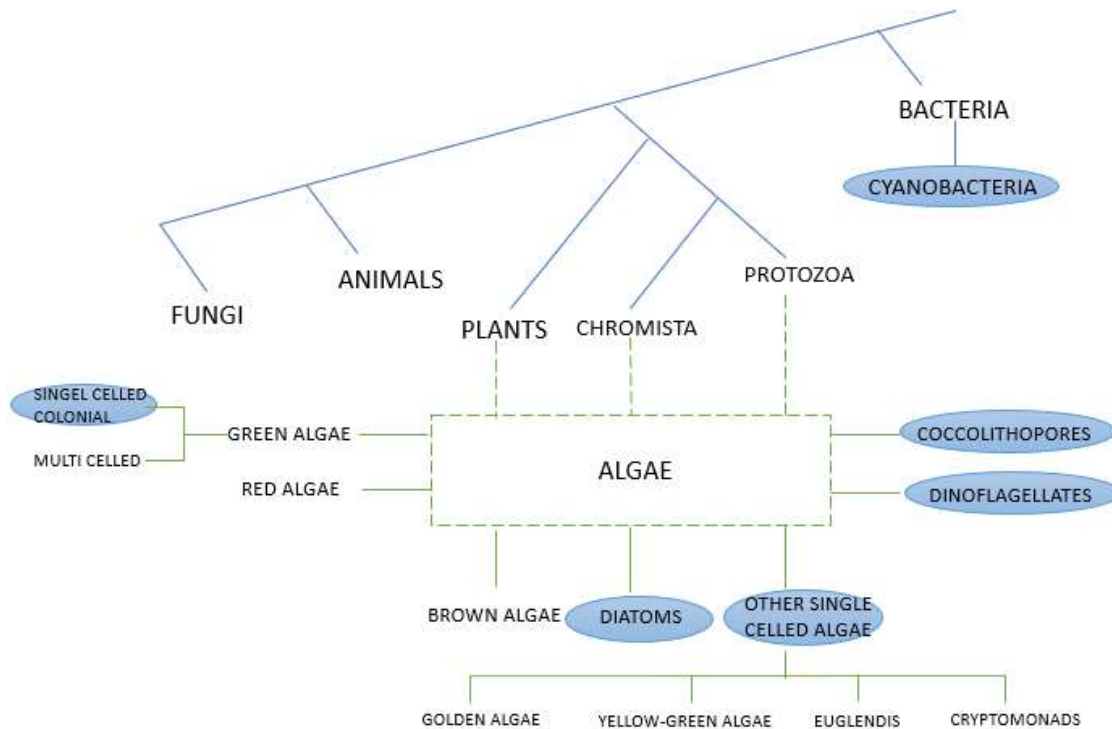
De meest voorkomende vormen binnen het genus *Arthrospira* zijn *Arthrospira maxima* en *Arthrospira platensis*, waarbij het vooral deze laatste is die de aandacht trekt omwille van de interessante inhoud en nutritionele- en gezondheidsvoordelen. Door de nog steeds heersende discussie omtrent de classificatie van de traditionele *Arthrospira spp.* wordt er vaak naar verwezen onder de naam *S./A. plantesis* (Vonshak, 2002). *Spirulina* en *Arthrospira* zijn de niet heterocyste, onvertakte, filamenteuze/draadvormige genera in de orde van de Nostacales en Familie Oscillatoriaceae afdeling cyanobacteriën (Usharani et al., 2012). In Figuur 4 wordt een overzicht gegeven van de volledige taxonomische indeling.



Figuur 4 Taxonomische classificaties van *Arthrospira platensis*

Spirulina en *Arthrospira* worden dus ondergebracht bij de groen-blauw-algen of cyanobacteriën. Deze twee benamingen worden beschouwd als volledig compatibel, de eerste verwijst naar de ecologische/biologische correlatie terwijl de tweede naar de taxonomische relatie verwijst. De cyanobacteriën zijn evolutionair gezien de brug tussen de bacteriën en de groene planten en hun systematische positie is al lange tijd een punt van discussie. Deze werden eerst beschouwd als algen. In 1962 werd een duidelijk onderscheid gemaakt tussen prokaryoten en eukaryoten waarbij het belangrijkste verschil tussen beide gebaseerd is op de aanwezigheid van een membraan rond de celorganellen bij eukaryoten. De groen-blauw algen werden in 1962

door Stanier en Van Neil in het prokaryote rijk ingedeeld en kregen de naam cyanobacteriën (Stanier & Van Niel, 1962). De cyanobacteriën vormen één van de meest diverse groepen binnen de prokaryoten en de definitie van species in het rijk is altijd al een moeilijkheid geweest. De prokaryoten worden op hun beurt dan weer ingedeeld onder de eubacteria (Habib et al., 2008; Sánchez et al., 2003; Vonshak, 2002). In Figuur 5 wordt weergegeven waar cyanobacteriën taxonomisch worden onderverdeeld. De stippellijnen wijzen aan dat een juiste classificatie van algen vaak erg moeilijk is. Ze kunnen op basis van verschillende kenmerken in verschillende rijken worden ondergebracht. De namen waarrond een ovaal geplaatst is worden in de biotechnologie als microalgen gezien.



Figuur 5 De plaatsing van cyanobacteriën binnen een bredere classificatie. De stippellijnen geven de classificatie weer die nog onder discussie staat. De ovaal geven de algen aan welke in de biotechnologie als microalgen worden aanzien <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/algae-phytoplankton-chlorophyll/>

De biotechnologie omtrent algen wordt onderverdeeld in macroalgen, microalgen en cyanobacteriën elk met hun eigen eigenschappen. Cyanobacteriën worden echter ook vaak ingedeeld onder de microalgen aangezien deze de classificatie van zowel prokaryote als eukaryote enkel- en meercelligen bevat (Usharani et al., 2012).

1.2.2.3 Historisch gebruik

Spirulina groeit natuurlijk in alkalische wateren van meren in warme gebieden. Het wordt al van ouds gebruikt als traditionele voedselbron door de volkeren die leven naast deze meren. Het is dan ook rond dergelijke meren, in Tsjaad en Mexico, waar respectievelijk de Kanembous stam en de Azteken spirulina als voedselbron verwerken en gebruiken, dat spirulina ontdekt werd. In vele Afrikaanse landen wordt spirulina op deze manier nog steeds gebruikt en verhandeld als menselijk voedsel (Habib et al., 2008; Vonshak, 2002).

Reeds in 1967 werd spirulina genoemd als 'superfood'. Dit heeft de alg vooral te danken aan zijn uitstekende nutritionele samenstelling. Spirulina bevat namelijk een grote hoeveelheid

proteïnen (60-70%) met een zeer goede kwaliteit, in termen van essentiële aminozuren, koolhydraten, essentiële vetzuren, vitaminen, mineralen en pigmenten. Vanaf de jaren '70 werden vele industriële onderzoeksprojecten opgestart omtrent de SCP, waar ook onderzoek naar de kweek van spirulina deel van uit maakte. Spirulina wordt tegenwoordig dan ook over de hele wereld, op industriële schaal gekweekt en op de markt gebracht als voedingssupplement of als actief ingrediënt in functionele voedingsmiddelen. Ook naast de rol in de humane voeding zijn er een aantal andere industriële toepassingen van spirulina die toch een zekere aandacht krijgen zoals spirulina als bron van chemicaliën of pharmaceutica en als supplement in diervoeder. De kleinschalige en vaak ook primitievere kweek in derdewereldlanden is echter ook nog steeds aanwezig (Habib et al., 2008; Capelli & Cysewski, 2012).

In vele West-Afrikaanse (en andere derdewereld-) landen zoals bv Burkina Faso, waar 30% van de kinderen tot 6 jaar leiden aan eiwit-energetische ondervoeding, kan de productie van spirulina zeker een belangrijke rol spelen. Hoewel hier wel enkele kanttekeningen dienen bij gemaakt te worden: de kweek wordt er namelijk vaak bemoeilijkt door een reeks praktische problemen variërend van de seizoensgebondenheid van de productie tot de kwetsbaarheid van de micronutriënten door bacteriële en schimmelinfecties, en zelfs de beschikbaarheid van de voedingsstoffen (Dansou, 2002).

1.3 Teelttechniek en cultivatiesystemen

De commerciële productie van spirulina kan opgedeeld worden in twee grote groepen. De eerste is die van de geïndustrialiseerde landen, deze hebben vooral interesse in de productie van de microalg voor zijn rol als voedingssupplement en voor het extraheren van hoogwaardige biochemicaliën. In deze landen wordt spirulina dan ook op grote schaal gekweekt en zijn heel wat hoogtechnische fotobioreactoren ontwikkeld om een zo hoog mogelijk rendement te kunnen behalen. Ten tweede zijn er de ontwikkelingslanden waar spirulina vooral gekweekt wordt als een belangrijke bron van proteïnen. De cultivatie gebeurt er relatief gemakkelijk en gedijt goed onder de lokale omstandigheden zonder dat een al te grote input nodig is. Gronden en zoutwater die ongeschikt zijn voor klassieke landbouw kunnen op die manier toch nog een nuttige functie krijgen (Habib et al., 2008).

1.3.1 Industriële productie

1.3.1.1 Algemeen

Commerciële systemen die op grote schaal algen cultiveerden begonnen in Japan in het begin van de jaren '60 met de kweek van *Chlorella*. Dit werd gevolgd door de ontwikkeling van een spirulinakwekerij in Lake Texoco in Mexico. In 1980 waren er in Azië reeds 46 bedrijven die op grote schaal algen produceerden. Ze produceerden per maand meer dan 1000 kg microalgen, voornamelijk *Chlorella*. In de jaren die volgden werden nog systemen ontwikkeld voor de commerciële productie van *Dunaliella salina*, als bron voor β -caroteen en ook voor het cultiveren van cyanobacteriën. In een korte periode van ongeveer 30 jaar is de industrie rond de kweek van algen dus helemaal uitgegroeid en erg gediversifieerd. Het succes van commerciële grootschalige producties van algen hangt onder andere af van het ontwikkelen van kosteneffectieve cultiveringssystemen (Borowitzka, 1999).

De cultivatie van spirulina kan plaats vinden in open systemen zoals meren, vijvers of lagunes maar ook in gesloten systemen. Tegenwoordig zijn het vooral de volgende twee technologieën die gebruikt worden voor de commerciële kweek van hoogwaardige producten: gesloten fotobioreactoren en open waterbassins, ook wel 'open raceways' genoemd (Soni et al., 2017).

Tabel 2 geeft een samenvatting van de verschillende systemen met hun karakteristieken, deze worden uitgebreid besproken onder 1.3.1.2. Enkele van de systemen zijn ook weergegeven in Figuur 6 en Figuur 7 .

Tabel 2 Samenvattende tabel van de cultivatiesystemen voor spirulina met hun karakteristieken

SYSTEEM	KARAKTERISTIEKEN	AUTEUR
Open systeem of raceway	Ondiepe ringvormige kanalen, menging gebeurt met een schoepenwiel.	Ugwu et al., 2008 Borowitzka, 1999 de Vree et al., 2015 Vonshak, 2002
Fotobioreactoren		
(Verticale) Kolom reactoren	Verschillende ontwerpen van variërende groottes 'Bubble Kolom' 'Air lift' Gemaakt uit transparante cilinders Menging gebeurt via zuurstof belletjes	de Vree et al., 2015 Soni et al., 2017
Vlakke plaat reactoren	Gesloten reactoren opgebouwd uit series vlakke, parallelle platen Groot oppervlak voor illuminatie Vele verschillende designs werden ontwikkeld Gemaakt uit transparant materiaal voor een maximaal gebruik van zonne-energie	Ugwu et al., 2008 Soni et al., 2017 Hoekema et al., 2002 Vonshak, 2002
Buisreactoren	Opgebouwd uit een enkele laag horizontale buizen of meerdere verticaal op elkaar gestapelde buizen Buizen geconstrueerd in glas of plastic Menging en beluchting d.m.v. een pomp of met een beluchtingssysteem Kunnen verticaal, horizontaal, kegelvormig of hellend zijn	de Vree et al., 2015 Soni et al., 2017 Vonshak, 2002
Inwendig verlichte reactoren	Inwendig verlicht met fluorescerende lampen Menging door gebruik van schoepen Kan ingesteld worden op afwisseling kunstmatig- en zonlicht Voor uitwendige massa cultivatie zijn wat technische inspanningen nodig	Ugwu et al., 2008 Soni et al., 2017
Hybride systemen	Combinatie open en gesloten systeem Verschillende systemen nog in ontwikkeling	Zittelli et al., 2013 Soni et al., 2017

1.3.1.2 Systemen

- Open cultivatie systeem of raceway

Open systemen kunnen verder opgedeeld worden in natuurlijke wateren zoals meren en vijvers en artificiële vijvers of bassins. De open systemen worden het meest geconstrueerd als grote circulaire vijvers, tanks of de zogenoemde ‘raceway ponds’ (Figuur 6). Het grote voordeel van de open systemen is dat ze gemakkelijker te construeren en onderhouden zijn waardoor ook de productie- en operationele kosten erg laag blijven. Na een cultivatie zijn ze eenvoudig te reinigen en op te ruimen. Er zijn bij dergelijke open systemen echter ook wat nadelen. Zo gaan de spirulinacellen in de open systemen het invallende licht minder goed gebruiken, zijn er heel wat verdampingsverliezen, is er diffusie van CO₂ naar de atmosfeer en is er behoefte aan een groot areaal land. Daarbij komt ook nog dat er in open systemen inefficiënt belucht wordt, waardoor de biomassa-productiviteit behoorlijk wat lager ligt. Bij een open systeem speelt de invloed van de omgeving ook een grotere rol. Zo is de groei onder andere afhankelijk van de locatie, het seizoen en de temperatuur en is er ook een grotere kans op contaminatie door andere fauna. Hierdoor is de kweek van algen in een open systeem beperkt tot soorten die kunnen groeien onder extreme condities zoals spirulina (Ugwu et al., 2008; Soni et al., 2017).

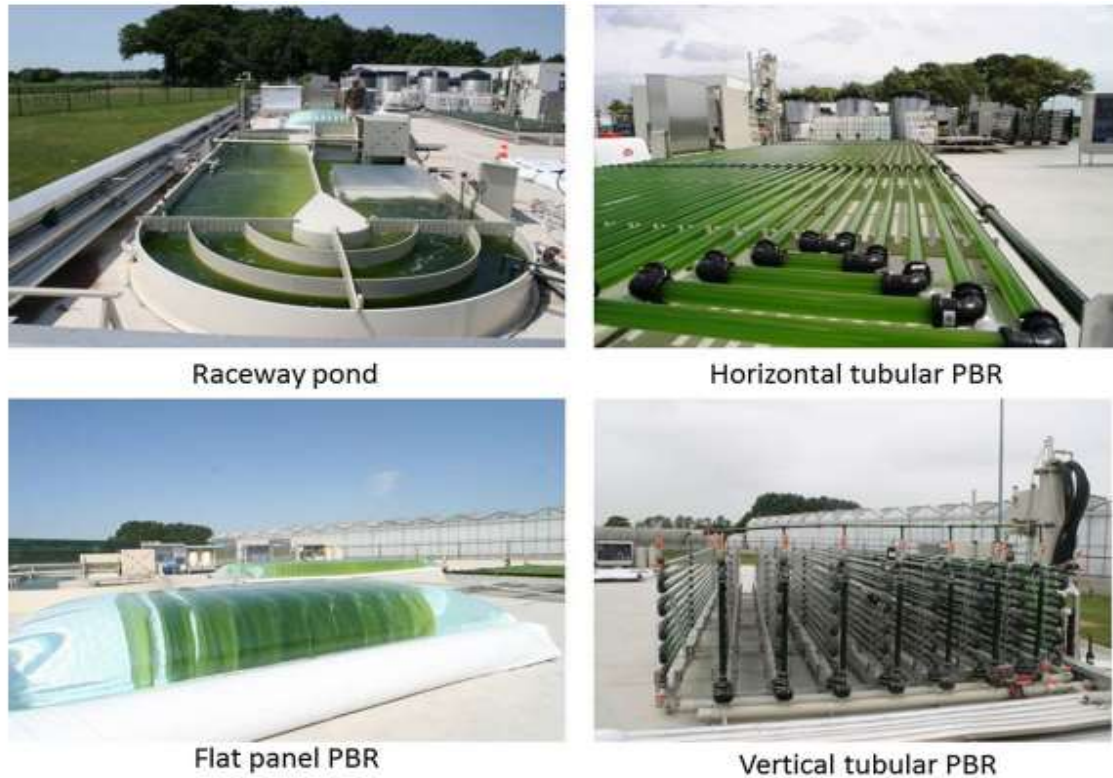
- Fotobioreactoren

Gesloten systemen (fotobioreactoren) trokken vooral de aandacht door het feit dat de cultivatiecondities beter gecontroleerd kunnen worden dan in open systemen. Ook wordt er een hogere biomassa geproduceerd en kan contaminatie gemakkelijker voorkomen worden. Het nadeel van de gesloten systemen is dat er nog een groot gebrek is aan efficiënt werkende fotobioreactoren. Ondanks de vele onderzoeken er naar, zijn er slechts een klein aantal fotobioreactoren die op een effectieve manier zonne-energie kunnen aanwenden voor massaproductie van algen (Ugwu et al., 2008).

Voor massa-cultivatie van spirulina in openlucht zijn buis- of tubulaire fotobioreactoren één van de meest geschikte systemen (Figuur 6). Bij buisvormige fotobioreactoren is het wel reeds beschreven dat er een moeilijke massa transfer plaatsvindt en er dus een sterke accumulatie van geproduceerd zuurstof kan op treden. Hoge gehalten aan opgelost zuurstofgas worden vooral bekomen wanneer de reactoren opgeschaald worden. Het onder controle houden van de temperatuur in dergelijke installaties kan ook een uitdaging zijn, ze kunnen daarom uitgerust worden met een thermostaat maar dit is duur en moeilijk te implementeren (Soni et al., 2017). Een goed mengsysteem is een vereiste in buis-fotobioreactoren opdat een efficiënte lichtdistributie over de cellen bekomen wordt en foto-inhibitie (waarbij de cellen onderaan te weinig licht ontvangen nodig voor celgroei) op die manier voorkomen wordt (Ugwu et al., 2008; Ugwu et al., 2005).

In vergelijking met horizontale buisreactoren is de accumulatie van opgelost zuurstofgas in vlakke plaatreactoren lager. Uit diverse onderzoeken blijkt dat hoge fotosynthetische efficiëntie kan gehaald worden met vlakke plaatreactoren (Hoekema et al., 2002; Soni et al., 2017).

Verticale kolomreactoren zijn eenvoudig te bedienen, compact en laag in kosten. De biomassaconcentratie en de groeisnelheid die kan bekomen worden in de zogenaamde ‘air lift’ en ‘bubble colom’ reactoren zijn vergelijkbaar met de resultaten bekomen uit een buis fotobioreactor (Soni et al., 2017).



Figuur 6 Voorbeelden van verschillende soorten cultivatiesystemen: open systeem ('raceway pond'), horizontale en verticale kolom fotobioreactor en een vlakke plaat fotobioreactor (de Vree et al., 2015)

- **Hybride systemen**

In de hybride systemen worden de kenmerken van de open systemen en de fotobioreactoren gebundeld. Het basisidee hierbij is dat fotobioreactoren de open systemen benaderen zodat de kosten verlaagd worden. Hierbij zijn er twee typevoorbeelden, te zien in Figuur 7. De eerste is een soort van overdekt bassin waarbij de bedekking zorgt voor een scheiding tussen de gassen net boven het bassin en de omgeving waardoor contaminatie via regen, stof en dieren vermeden wordt. Bij het tweede type wordt een buisvormig ontwerp gedeeltelijk gevuld en daarna opgepompt en verbreed zodat het uiteindelijk lijkt op een overdekt open bassin (Zittelli et al., 2013). Door het gebruik van hybride systemen kunnen hogere productieniveaus bekomen worden, zijn er dus niet veel investerings- en productiekosten, worden de condities beter gecontroleerd en wordt er een hoger biomassadensiteit verkregen. Bovendien kan dergelijk systeem ook op industriële schaal ingezet worden (Soni et al., 2017).



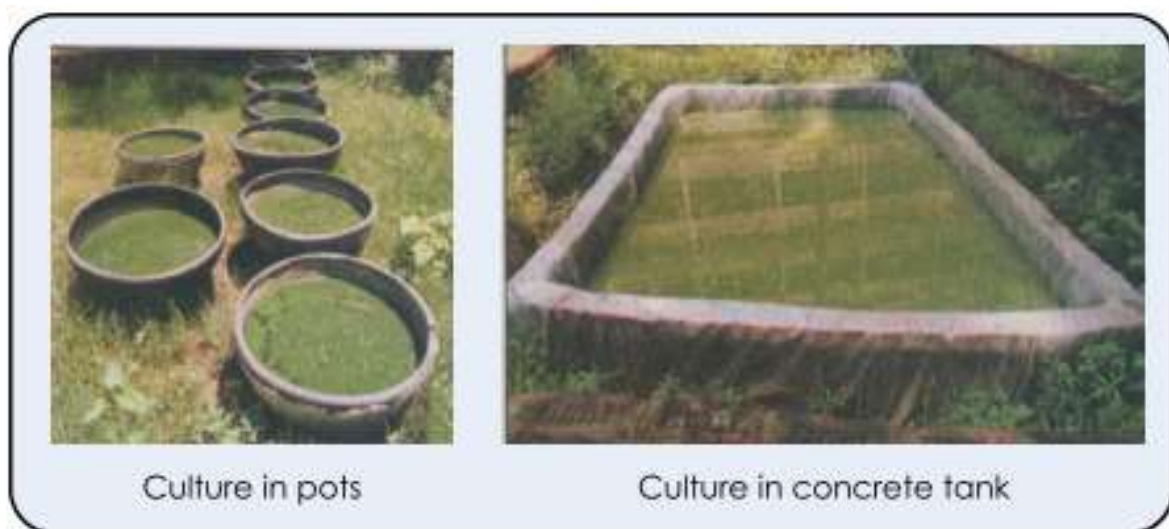
Figuur 7 Hybride fotobioreactoren. Links de opgepompte zakken, rechts overdekt bassin in tunnelvorm (Zittelli et al., 2013)

1.3.2 Small scale productie

De systemen zoals hier boven beschreven hebben als grote nadeel dat ze heel wat input aan energie, licht en andere zaken vereisen om de ideale leefomstandigheden na te bootsen. In dat opzicht is het een heel stuk goedkoper om de beschreven hoogtechnologische systemen te vermijden, de natuur zijn werk te laten doen en de algen op een natuurlijke wijze te laten groeien. Deze manier van cultivatie is in de tropen dan ook nog steeds de manier waarop spirulina geproduceerd wordt en op de markt gebracht wordt. De output uit dergelijk artisanal gekweekte spirulina is niet zo groot en de spirulina heeft niet de groeisnelheden zoals die in een fotobioreactor worden verkregen. Deze lagere output wordt wel gecompenseerd door het feit dat de kosten voor de productie sterk gereduceerd worden en dat voor de productie gebruik gemaakt wordt van (goedkopere) lokale nutriënten. De kwaliteit van de spirulina geproduceerd op de artisanale wijze is vaak niet even hoog als de spirulina uit de ‘schone’ industrie, waardoor het vaker gebruikt wordt als diervoeder (Vonshak & Richmond, 1988; Habib et al., 2008).

De kleinschalige productie van spirulina kan ook gezien worden als een inkomensgenererende activiteit in de huishoudens en/of in de dorpen. De spirulina wordt gedroogd en verwerkt en kan aan het lokale dieet worden toegevoegd. Daarnaast kan de kleinschalige productie er ook gecombineerd worden met de kleinschalige landbouw en viskwekerij.

Spirulina leent zich tot een eenvoudige technologie. De cultivatie kan gebeuren in geconstrueerde bassins waarin de stroom traag is (zo'n 10 cm/s). Het roeren of mengen kan gebeuren via simpele systemen aangedreven door wind energie of gewoon door handenarbeid. Voorbeelden van dergelijk geconstrueerde bassins in Bangladesh zijn te zien in Figuur 8. De grootste kost in de kleinschalige systemen is het groeimedium. Naast de kost is ook de beschikbaarheid van het groeimedium, met name de anorganische nutriënten vaak een probleem. In heel wat studies (zie 1.4.2) zijn hiervoor oplossingen bedacht, door het formuleren van ‘low cost’ media en het gebruik van afvalwater of lagune water (zoutwater) als groeimedia (Vonshak & Richmond, 1988; Habib et al., 2008).



Figuur 8 Vormen van kleinschalige spirulinateelt in Bangladesh (Habib et al., 2008)

In India werd een systeem ontwikkeld dat op het platteland een relatief grote productie van spirulina mogelijk maakte op een eenvoudige en artisanale wijze. Bij ‘modderpot’ spirulina productie wordt een medium gebruikt bestaande uit biogasslib of mest, 2-3 g zeezout of een chemisch medium en pure spirulina cultuur. De modderpotten worden tot aan de rand in de grond geplaatst, en gevuld met water gemengd met het medium en een kleine hoeveelheid pure spirulina. De potten worden drie tot vier keer per dag met de hand geroerd en in het zonlicht geplaatst. (Habib et al., 2008)

Naast het ontwikkelen van systemen kan spirulina ook ‘geproduceerd’ worden door het te oogsten uit de meren waarin de spirulina natuurlijk groeit. Dit gebeurt bijvoorbeeld aan de oevers van bepaalde meren of vijvers in Tsjaad en China, waar de teelt en het gebruik van de spirulina ook voor het eerst ontdekt werden. In Figuur 9 zijn foto's weergegeven van een dergelijke productie uit Lake Kosorom in Tsjaad. De spirulina vormt op het meer matten die aan de oppervlakte bovendrijven en vervolgens geoogst kunnen worden. De geoogste spirulina wordt in de zon te drogen gelegd en kan daarna als een cake verkocht worden op de lokale markt (Sili et al., 2012).



Figuur 9 Foto's van de primitieve small scale cultivatie van spirulina in Lake Kosorom in Tsjaad. (a) overzicht van het meer (b) de bovendrijvende spirulina matten (c) ophoping van de spirulina biomassa aan de randen van het meer (d) oogsten van de spirulina van op het oppervlak van het meer (e) het verzamelen van de gedroogde stukken spirulina die op de markt kunnen verkocht worden als soort cake (Sili et al., 2012)

1.4 Cultivatie - groeifactoren

1.4.1 Algemeen

Het grote concept van de cultivatie van spirulina is eigenlijk sterk gelijkend op die van de conventionele landbouw namelijk het aanwenden van het systeem van fotosynthese voor de productie van biomassa die dan gebruikt kan worden al bron van voedsel, chemicaliën en energie (Vonshak, 2002).

De principes die leiden tot maximale productiviteit van cultiveringssystemen van algen en dus ook spirulina en hier ook uitgebreid behandeld zullen worden zijn de volgende (Zittelli et al., 2013; Posten, 2009):

- Adequate menging zodat er een passende licht-donker-cyclus aan de cellen ter beschikking wordt gesteld en er geen gradiënten ontstaan.
- Een juiste oriëntatie van het systeem waarin wordt gecultiveerd zodat foto-inhibitie vermeden wordt en de fotosynthesecapaciteit gemaximaliseerd wordt.
- Grote massa-transfercapaciteit zodat er efficiënt CO₂ wordt toegevoegd en er geen O₂ wordt opgehoopt. In geval van ophoping zal de fotosynthese dalen en dus ook de algengroei.
- Een hoge verhouding oppervlakte tot volume zodat de celconcentratie kan stijgen.
- Regeling van de temperatuur op of nabij de optimumtemperatuur voor het gecultiveerde organisme
- Regeling en controle van de pH, CO₂-concentratie en de nutriëntenconcentratie.
- Adequaar oogststelsysteem zodat een optimale dichtheid van de populatie behouden blijft.

Verder kan er dus gesteld worden dat de snelheid van groei van de algen door drie grote factoren bepaald wordt: de hoeveelheid licht, de hoeveelheid koolstofdioxide en de beschikbaarheid van voedingstoffen. Daarnaast spelen ook de temperatuur en de pH een rol. Factoren als voedingstoffen, temperatuur en pH zijn relatief eenvoudig te sturen. De beperkende factoren voor de algengroei zijn eerder de hoeveelheid beschikbaar licht en de efficiëntie waarmee dit door de alg gecapteerd en gebruikt wordt. (*De groene belofte: Algen*, 2013)

1.4.2 Nutrienten

1.4.2.1 Vereiste nutriënten en hun functie

- Koolstof

Koolstof is het belangrijkste nutriënt nodig voor de groei van spirulina. Door de hoge gehalten aan natriumcarbonaat in alkalische meren is spirulina in dergelijke meren dan ook het dominante organisme. Naast de arbeid is de koolstofbron de grootste kost bij de productie van spirulina (Vieira Costa et al., 2003). Tijdens de fotosynthese wordt, met behulp van lichtenergie, anorganische koolstof omgezet in organisch materiaal (Soni et al., 2017).

Koolstof wordt voornamelijk opgenomen in de anorganische CO₂-vorm. In het geval van spirulina die in een vloeibaar milieu leeft, wordt de CO₂ opgelost in het water waarin het een zwak zuur-base-systeem vormt. Dit systeem is afhankelijk van de pH waardoor in een spirulinacultuur HCO₃⁻ (bicarbonaat) de dominante koolstofvorm is. De anorganische koolstof wordt in de spirulinacellen gefixeerd en omgezet naar een organische vorm via de Calvin cyclus (Markou et al., 2014). In culturen op grote schaal wordt CO₂ hoofdzakelijk voorzien via gas dat door middel van bubbels in het kweekmedium worden gebracht. Deze methode heeft echter een

aantal nadelen zoals het grote energieverbruik dat gepaard gaat met het inpompen van de CO₂, de hoge kost nodig voor het comprimeren van het gas, de moeilijke opslag en verlies van CO₂ naar de lucht. Daarom kan een alternatief voor het toevoegen van koolstof in spirulinacultuur het gebruik van bicarbonaat zijn. Door de combinatie van het bicarbonaat en de hoge pH van het spirulinamedium gaat er minder koolstof verloren naar de lucht. Echter, in het geval dat natriumbicarbonaat als enige koolstofbron wordt gebruikt, is voor de productie van 1,0 kg spirulina ongeveer 9,0 kg natriumbicarbonaat nodig. De productiekosten van spirulina zijn dus hoog bij gebruik van natriumbicarbonaat als enige koolstofbron. Behalve natriumbicarbonaat zou ook ammoniumbicarbonaat kunnen gebruikt worden, vooral in China, daar ammoniumcarbonaat daar vrij eenvoudig en aan een lagere prijs dan natriumbicarbonaat te verkrijgen is (Ding et al., 2017).

- Stikstof

Stikstof is een noodzakelijk element voor de aanmaak van koolhydraten en eiwitten (aminozuren), nucleïne-zuren (DNA, RNA), en pigmenten zoals chlorofyl en fycocyanine. Het kan worden opgenomen in de anorganische vorm als NO₃⁻, NO₂⁻, NO en NH₄⁺ en soms ook als N₂. In organische vorm kan stikstof worden opgenomen als ureum of aminozuren. Aangezien spirulina in vergelijking met planten een erg groot eiwitgehalte bezit, is de stikstofbehoefte groot (Markou et al., 2014).

Stikstof kan toegediend worden aan een spirulinamedium als ureum, kaliumnitraat, natriumnitraat of ammoniumchloride (of ammoniak zelf). Ureum is de goedkoopste optie en heeft ook als voordeel dat het twee N-atomen bevat (46% N) in plaats van één zoals bij de nitraten (kaliumnitraat = 14%N, natriumnitraat = 16%N). Een onderzoek van Danesi et al (2002) toonde aan dat ureum een positieve invloed heeft op de groei van spirulina en dat de groeisnelheid in een medium met ureum gelijk is aan of groter is dan die in een medium met andere stikstofbronnen. Ureum is dus een goede stikstof bron voor spirulina en veroorzaakt geen nadelige effecten zolang de concentratie onder 1,5 g/l wordt gehouden (Vieira Costa et al., 2003). Nitraten zijn de meest gebruikte minerale stikstofvormen voor de kweek op synthetische media en hebben evenmin toxische effecten op de spirulinacellen die concentraties tot 100 mM verdragen (Markou et al., 2014).

Daarnaast kunnen ook ammoniumvormen of ammoniak gebruikt worden voor stikstoftoediening. Deze stikstofvorm zou door de spirulinacellen de voorkeur genieten daar de opname en assimilatie ervan minder energie kost in vergelijking met andere stikstofbronnen. Hoewel de groeisnelheid bij het gebruik van ammoniak gelijk of lager is dan wanneer nitraat gebruikt wordt (Boussiba & Gibson, 1991). Een nadeel bij het gebruik van ammoniak of ammonium is de mogelijke toxiciteit. Vrije ammoniak heeft een schadelijk effect op de microalgen in relatief lage concentraties (Abeliovich & Azov, 1976). De toxiciteit wordt vooral bepaald door de pH van de cultuur, die bepaalt of de giftige vorm van vrije ammoniak dominant is of het niet-giftige ammonium ion. Als de pH waarde boven de pK-waarde van ammoniak/ammonium is, stijgt de concentratie vrije ammoniak die het fotosynthetische systeem aantast en schade veroorzaakt aan fotosysteem II. Aangezien spirulina gedijt in media met een hoge pH is het beter bestand tegen ammoniaktoxiciteit dan andere cyanobacteriën of microalgen. De mate van toxiciteit lijkt gerelateerd te zijn aan het verschil tussen de intracellulaire en extracellulaire (medium) pH-waarden. Bij lage pH-verschillen, zoals in het

geval van spirulina, is de weerstand tegen ammoniaktoxiciteit hoger (Belkin & Boussiba, 1991; Markou et al., 2014).

Als ammonium als stikstofbron wordt toegepast kan de pH-waarde dalen door het vrijkomen van H^+ ionen tijdens de assimilatie, terwijl bij het gebruik van nitraat de pH-waarde stijgt door het vrijkomen van OH^- ionen (Perez-Garcia et al., 2011). Een bijkomende beperking van het gebruik van ammoniak als stikstofbron is dat het door vervluchtiging uit het medium verloren kan gaan, vooral bij hogere pH-waarden zoals bij spirulina het geval is (Markou et al., 2014).

Ook kunnen verschillende afvalwaters afkomstig van de vee- of voedselverwerkende sector gebruikt worden als organische stikstofbron, maar de aanwezigheid van bacteriën in de cultuur die de organische stikstof omzetten in anorganische vorm lijkt noodzakelijk (Markou et al., 2014).

Het gelijktijdig aanwezig zijn van verschillende stikstofbronnen in het medium beïnvloedt wel de stikstofopname. Het is reeds aangetoond dat de opname van bepaalde bronnen onderdrukt wordt wanneer er in het medium ook een andere vorm aanwezig is. Zo zal bijvoorbeeld, wanneer er ammonium/ammoniak aanwezig is, de opname van nitraat en nitriet onderdrukt worden (Boussiba & Gibson, 1991). Ook nitraat en nitriet remmen elkaar wederzijds af (Markou et al., 2014).

- Fosfor

Kleine hoeveelheden fosfor zijn nodig en essentieel voor de werking van de cel. Het is een bestanddeel van verschillende organische moleculen zoals DNA, RNA, membraanfosfolipiden en ATP. In natuurlijke omstandigheden is fosfor bij de groei van spirulina vaak het limiterende nutriënt (Markou et al., 2014).

Er zijn verschillende soorten fosfaatmeststoffen die gebruikt kunnen worden als fosforbron zoals kalium-, natrium- en ammoniumfosfaten of superfosfaten, die allemaal geproduceerd worden met behulp van fosfaatgesteente (natuurfosfaat) als grondstof. Fosfor wordt door de spirulinacellen opgenomen in de orthofosfaat-vorm, andere anorganische fosforvormen kunnen met behulp van enzymen worden omgezet tot de opneembare orthofosfaat-vorm (Markou et al., 2014). De cellulaire productie van deze enzymen is significant hoger wanneer het beschikbare fosfor lager is en wanneer cellen beperkt zijn of er al een hele tijd geen nutriënten werden toegevoegd (Dyhrman & Ruttenberg, 2006). De snelheid van fosfor opname wordt bepaald door de celconditie en door verschillende omgevingsfactoren: beschikbare energie (licht), pH, temperatuur, saliniteit van het medium en beschikbare K^+ , Na^+ en Mg^{2+} ionen (Cembella et al., 1984; Markou et al., 2014).

Bij verhoogde pH-waarde door fotosynthese en de alkalisatie van het medium kunnen polyvalente kationen, zoals kalium en magnesium, neerslaan met fosfaten en kan de beschikbaarheid van fosfor verminderen (Markou et al., 2014) dit vooral in afvalwater waarin het gehalte aan tweewaardige kationen hoog is (Cembella et al., 1984).

- Kalium

Kalium speelt een belangrijke biologische rol, omdat het een activator is voor een aantal enzymen die betrokken zijn bij de fotosynthese en de ademhaling, het beïnvloedt de eiwit- en koolhydraatsynthese en reguleert het osmotische potentieel van de cellen (Markou et al., 2014).

Kalium kan in de vorm van verschillende zouten worden toegevoegd aan spirulinaculturen, zoals als K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KNO_3 , KSO_4 , KCl of met behulp van afvalwaterstromen (Markou et al., 2014). Afval en afvalwater uit de agro-industriële sector blijken rijk te zijn aan kalium, bv. varkensmest kan K_2O gehalten bevatten variërend van 3 tot 7,5 g/l en pluimveemest bevat tot 32,5 mg/g K_2O (Markou & Georgakakis, 2011).

- Micronutriënten

Spirulina vereist een grote nutriënteninput en hoge zoutconcentraties, ook te zien aan het feit dat spirulina natuurlijk in de alkalische meren groeit en gevonden werd (Usharani et al., 2012).

Essentiële micronutriënten zijn Mg, S, Ca, Na, Cl, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, B en Co. Afvalwater en zeewater zijn een goede bron voor de meeste van deze voedingsstoffen (Markou et al., 2014).

Magnesium is belangrijk in enkele vitale celprocessen zoals ATP-reacties en is een activator voor verschillende belangrijke enzymen. Het is ook een bestanddeel van het fotosynthetische apparaat en in het bijzonder van de chloroplasten. Magnesium wordt in waterige oplossingen voornamelijk terug gevonden als het Mg^{2+} kation. Bij een hoge pH-waarde (hoger dan 11) zoals de media waarin spirulina groeit, kan Mg^{2+} echter neerslaan als magnesiumfosfaat of magnesiumhydroxide. Deze minerale precipitaten kunnen leiden tot flocculatie van de spirulina biomassa, wat niet wenselijk is (Vandamme et al., 2012). Magnesium wordt voornamelijk als $MgSO_4$ aan de culturen toegevoegd, maar ook andere magnesiumzouten kunnen worden gebruikt (Markou et al., 2014).

Zwavel is een bestanddeel van de aminozuren cysteïne en methionine en van sulfolipiden die deel uitmaken van de dubbele fosfolipide laag van de celmembranen. Bovendien is het een bestanddeel van vitaminen, regulerende verbindingen en een aantal zwavelhoudende secundaire metabolieten zoals bijvoorbeeld dimethylsulfoxide. Zwavel kan in veel verschillende vormen worden gevonden, maar wordt door spirulina opgenomen in de vorm van sulfaat (SO_4^{2-}) terwijl andere vormen zoals sulfide giftig zijn. Sulfaat is beschikbaar in verschillende vormen van meststoffen en kan worden geleverd als $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, K_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ - $MgSO_4$ (Markou et al., 2014).

Calcium is een belangrijk bestanddeel van de celwanden. Het beïnvloedt ook de celdeling en is een secundaire boodschapper die de morfogenese beïnvloedt. Calcium in het aquatisch milieu is voornamelijk aanwezig onder de vorm van Ca^{2+} en wordt zowel actief als passief opgenomen door diffusie. Als er in het medium hoge calciumconcentraties aanwezig zijn kan dit in combinatie met hoge pH-waarden resulteren in de vorming van $CaCO_3$ en andere calciumzouten die neerslaan. Hierdoor kan de alkaliniteit van het medium en de concentratie van sommige mineralen zoals ijzer en fosfor afnemen (Shimamatsu, 2004). Calcium wordt vaak toegevoegd aan de culturen als $CaCl_2$, maar er kunnen ook andere vormen zoals $Ca_3(PO_4)_2$ of $Ca(NO_3)_2$ worden gebruikt (Markou et al., 2014).

Ijzer wordt geassocieerd met enzymen door complexe vorming met de S- of N-groepen van verschillende aminozuren. Daarnaast is ijzer ook betrokken bij fundamentele enzymatische processen zoals het zuurstofmetabolisme, elektronenoverdracht, stikstofopname en DNA-, RNA- en chlorofylsynthese (Markou et al., 2014). In waterige oxische (zuurstofrijke) omgevingen is ijzer vooral in de Fe^{3+} vorm aanwezig aangezien Fe^{2+} snel geoxideerd wordt. Fe^{3+} vormt oxiden en hydroxiden, die onoplosbaar zijn. Daarnaast is ijzer gemakkelijk te absorberen op de oppervlakken van de deeltjes, wat dus resulteert in een lage biologische

beschikbaarheid. In natuurlijke omgevingen en in huishoudelijk afvalwater is ijzer vaak niet biologisch beschikbaar en wordt het groeivermogen van spirulina geremd (Sunda & Huntsman, 1995). Om die reden wordt ijzer in media toegevoegd als gechelateerde complexen, waardoor de bio-beschikbaarheid stijgt (Markou et al., 2014).

1.4.2.2 Cultuurmedia

- Klassieke samenstellingen

De beschreven nutriënten worden in verschillende combinaties en concentraties samengevoegd in cultuurmedia waarin de spirulina wordt gecultiveerd. Verschillende cultuurmedia worden gebruikt om een nieuwe cultivatie te starten afhankelijk van de waterbron. Het gebruikte water moet schoon zijn of gefilterd om de groei van andere algen te voorkomen. Water bevat vaak genoeg calcium, maar als het te hard is veroorzaakt het modder. De samengestelde media bestaan voornamelijk uit ureum en carbonaat wordt vervangen door bicarbonaat. Ook bepaalde ionen kunnen aanwezig zijn zoals sulfaat, chloride, nitraat en natrium. Ureum is efficiënter om stikstof te leveren, maar is zeer giftig in een grote concentratie. Spirulina kan zowel op nitraat als op ureum alleen groeien, maar het gebruik van beide tegelijkertijd is het meest bevorderlijk. De gehalten aan fosfaat, magnesium en calcium mogen niet te veel worden verhoogd. Eventueel kan de kaliumconcentratie evenredig worden verhoogd, op voorwaarde dat het niet meer dan vijf keer de natriumconcentratie wordt. Als er chemische meststoffen worden gebruikt om de kosten te verlagen, moeten deze van het oplosbare of gekristalliseerde type zijn en niet die van het type met langzame afgifte (korrels) (Soni et al., 2017).

Er zijn verschillende mediasamenstellingen bekend en ze worden meestal ingezet volgens de lokale groeiomstandigheden. De meest gebruikte en ook het eerst ontwikkelde is Zarrouk's medium (Zarrouk, 1966). Andere media die tegenwoordig gebruikt worden in verschillende productiecentra zijn kleine variaties op het Zarrouk-medium (Usharani et al., 2012). Chemische samenstellingen van verschillende groeimedia worden vergeleken in Tabel 3.

Tabel 3 Chemische samenstelling van verschillende groeimedia

AUTEUR	Madkour et al., 2012 Dineshkumar et al., 2016	Pandey et al., 2010	Pandey et al., 2010 Sukumaran et al., 2018	Pandey et al., 2010	Soni et al., 2017	Madkour et al., 2012
INGREDIENT	Zarrouk's medium (g/l)	Rao's medium (g/l)	CFTRI medium (g/l)	OFERR medium (g/l)	Conventioneel groei medium (g/l)	Reduced cost medium (g/l)
NaHCO ₃	16,8	15	4,5	8	16	16,8
K ₂ HPO ₄	0,5	0,5	0,5	-	-	0,235
NaNO ₃	2,5	2,5	1,5	-	-	-
K ₂ SO ₄	1,0	0,6	1,0	0,5	0,5	0,353
NaCl	1,0	0,2	1,0	5,0	1,0	0,471
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20	0,04	1,2	0,16	0,1	-
EDTA	0,08	-	-	-	-	0,353
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04	0,008	0,04	-	0,1	0,176
FeSO ₄ .2H ₂ O	0,01	-	0,01	0,05	-	0,256
H ₃ BO ₃	2,86	-	-	0,052ml	-	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,180	-	-	-	-	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222	-	-	-	-	0,222
Na ₂ MoO ₃	0,015	-	-	-	-	0,0177
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,074	-	-	-	-	0,079
NH ₄ VO ₃	22,9	-	-	-	-	-
NiSO ₄ .7H ₂ O	47,8	-	-	-	-	-
NaWO ₂	17,9	-	-	-	-	-
Ti ₂ (SO ₄) ₃ .6H ₂ O	4,4	-	-	-	-	-
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	4,4	-	-	-	-	-
IJzer citraat	-	-	-	-	-	-
Peptone *	-	-	-	-	-	-
KNO ₃	-	-	-	-	2,0	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	-	-	-	0,1	-
IJzer chelaat	-	-	-	-	¼ theelepel	-
Kalk	-	-	-	-	0,1	-
NH ₄ NO ₃	-	-	-	-	-	0,118
CO(NH ₂) ₂	-	-	-	0,2	-	0,088
Fe EDTA	-	0,20	-	-	-	-
A ₅ oplossing**	-	1 ml	-	-	-	-

* peptone: een wateroplosbare mix van polypeptiden en aminozuren gevormd door de partiele hydrolyse van proteïnen

** Samenstelling A₅ oplossing: 2,860 g/l H₃BO₃, 1,810 g/l MnCl₂, 0,222 g/l ZnSO₄, 0,0177 g/l Na₂MoO₄, 0,079 g/l CuSO₄

1.4.2.3 Productiviteit

De productiviteit is een maat voor de hoeveelheid spirulinabiomassa die per oppervlakte en per tijdseenheid wordt geproduceerd. Het nutriëntengehalte van het medium is één van de belangrijkste factoren om een hoge biomassaproductiviteit te verkrijgen. Het gebruik van bepaalde nutriënten kan immers de productiekosten veranderen en de groei of biomassasamenstelling danig beïnvloeden (Grobbelaar, 2007; Soni et al., 2017). De jaarlijkse biomassaproductie van spirulina in fotobioreactoren is 3000 ton, wat maximaal is in

vergelijking met andere microalgensoorten. Een productie tot 127.000 kg/ha.j kan worden bereikt in grote raceways met een gemiddelde productiviteit tussen 73-109.000 kg/ha.j (Bharathiraja et al., 2015).

1.4.3 pH

Spirulina werd van nature geïsoleerd uit alkalische en zoute meren die worden gekenmerkt door een hoog gehalte aan carbonaat-bicarbonaat en een hoge pH-waarde. Spirulina overleeft niet alleen bij hoge pH-waarden, maar gedijt ook in dergelijke omstandigheden. De vereiste van een hoge pH zorgt er voor dat spirulina kan worden aangeduid als een obligatoire alkalifiel (Sili et al., 2012).

Een cultuur met een pH tussen de 9 en 11 wijst op een gezonde cultuur en zorgt voor een goede groei van de spirulina (Usharani et al., 2012; Soni et al., 2017). Het zorgt er bovendien ook voor dat andere organismen de cultuur niet kunnen contamineren omdat ze simpelweg niet in staat zijn om te overleven in een alkalisch milieu (Soni et al., 2017). De pH heeft een invloed op zowel de beschikbaarheid van de nutriënten voor de spirulina als op de fysiologische eigenschappen van de spirulina zelf (Usharani et al., 2012). Het beïnvloeden van de groei door de pH kan immers op twee manieren. Enerzijds bepaalt de pH de beschikbaarheid van koolstof en de vorm waarin deze beschikbaar is, waardoor de pH dus kan interfereren met de fotosynthese (Soni et al., 2017; Juneja et al., 2013). Anderzijds zorgt een veranderende pH ook voor een storing van de processen die plaatsvinden in de cel membranen (Soni et al., 2017).

De pH van een medium aanpassen kan algengroei limiteren door metabolische inhibitie, waardoor gesteld kan worden dat de optimale pH de initiële pH is waaraan de spirulina zich heeft aangepast (Juneja et al., 2013).

Wanneer CO₂ snel wordt verbruikt en niet tijdig terug wordt aangevuld ontstaat een hogere pH. Vandaar dat een pH-stijging gedurende piekperiodes in fotosynthese vaak wordt waargenomen in de open raceways, en dit dus aanduidt dat er een koolstoflimitatie is (Chisti, 2016).

Wanneer de pH een waarde bereikt die lager is dan 10 kan er een overmatige productie van EPS (exopolysacharide) door de spirulina of een te trage biologische afbraak ervan ontstaan. Dit zal leiden tot "kleverigheid" van de biomassa en/of een uitvlokking van spirulina tot ongewenste aggregaten. De vorming van vlokken/klonters door EPS is echter niet schadelijk (Jourdan, 2001).

1.4.4 Temperatuur

Temperatuur is een belangrijke factor die de groeisnelheid van spirulina beïnvloedt. Spirulina kan groeien tussen de 20 en 37 °C maar de maximale opbrengsten voor spirulina worden verkregen bij een temperatuur tussen de 30 en 35 °C. Als de temperatuur boven de 35 °C reikt kan dit zorgen voor verbleking van de culturen (Usharani et al., 2012) en wanneer een temperatuur hoger dan 38 °C wordt bereikt wordt de groei erg belemmerd (Soni et al., 2017). Onderzoek heeft aangetoond dat de optimale temperatuur voor een goede fotosynthese zich situeert rond 35 °C (Torzillo & Vonshak, 1994; Sili et al., 2012). Onder de 17 °C is de spirulinagroei praktisch nihil maar er treedt geen sterfte op. Daardoor kan gesteld worden dat spirulina tijdens de nacht praktisch niet groeit (Soni et al., 2017).

Logischerwijs wordt spirulina dan ook in de natuur gevonden in wateren met een relatief hoge temperatuur. Daarbij kunnen verschillende populaties en groepen verschillen in hun optimale groeitemperatuur en hun resistentie tegen extreme temperaturen (Sili et al., 2012).

In vele delen van de wereld is bij het cultiveren van algen in open racewaysystemen de temperatuur de meest limiterende factor voor het behalen van een hoge biomassa. Een cultuur in openlucht ondergaat namelijk een dagcyclus waarbij in gebieden buiten de tropen een temperatuurverschil tot 20 °C kan ontstaan. 's Morgens is de temperatuur er namelijk 15-20 °C terwijl een optimale temperatuur tussen de 35 en 38 °C enkel gehaald wordt in de vroege namiddag. Zelfs in de tropen waar de cultuur de optimale temperatuur bereikt zal de temperatuur gedurende een groot deel van de dag nog steeds onder het optimale niveau liggen. Een dag-nacht-cyclus met koudere temperaturen 's nachts blijkt wel belangrijk te zijn. Zo zou een te hoge temperatuur 's nachts zorgen voor een stijging van de respiratie wat zorgt voor een verlies van biomassa. Dit verlies hangt af van de biomassa compositie en kan oplopen tot zo'n 30% van de voorgaande dagelijkse productie (Habib et al., 2008).

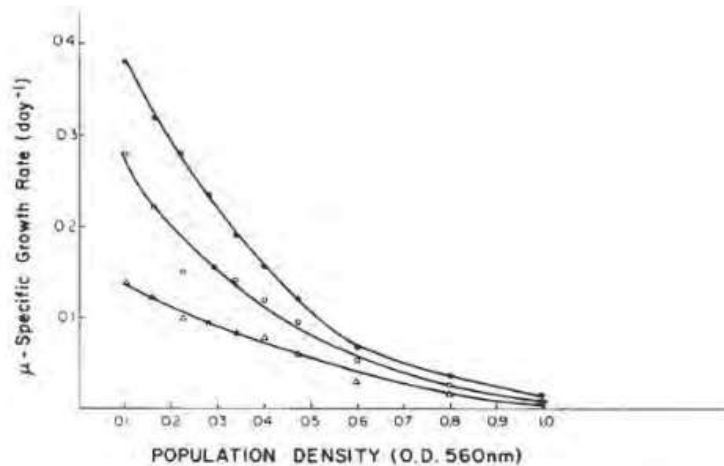
1.4.5 Licht

Spirulina wordt beschouwd als een fotoautotroof organisme. Behorend tot de cyanobacteriën zetten ze net als fotosynthetische bacteriën en hogere planten lichtenergie om in chemische energie door middel van fotosynthese. Het is al vaak gerapporteerd dat de lichtkwaliteit, -intensiteit en de duur van belichting een invloed hebben op de spirulinagroei. (Soni et al., 2017) De rol van licht bij de groei van spirulina is dus duidelijk, hoewel direct zonlicht niet wordt aangeraden. Eerder wordt geadviseerd om slechts 30% van het volle directe zonlicht te laten invallen maar soms kan een hoger percentage gewenst zijn wanneer de cultuur 's morgens na een koude nacht snel weer moet worden opgewarmd. Groei vindt enkel plaats overdag in de aanwezigheid van licht, desondanks wordt een belichting van 24 u niet aangeraden. De spirulina heeft namelijk de donkere periodes nodig om chemische reacties zoals de aanmaak van proteïnen en respiratie te laten doorgaan (Soni et al., 2017).

Het eerste onderzoek naar het effect van licht op de groei van spirulina werd uitgevoerd door Zarrouk. Uit dat onderzoek werd besloten dat de groeisnelheid een maximum bereikt wanneer de cultuur wordt gekweekt onder een lichtintensiteit tussen de 25 en 30 k Lux (Sili et al., 2012).

Bij openlucht cultivatiesystemen is de natuurlijke zonnestraling de enige bron van licht. In dat geval is de beschikbaarheid en de hoeveelheid van licht dus afhankelijk van het geografische gebied, het klimaat en de seizoenen gebondenheid. De lichtbehoefte varieert daarenboven ook nog eens van organisme tot organisme (Soni et al., 2017; Usharani et al., 2012).

De optische dichtheid staat in rechtstreeks verband met de lichtintensiteit. Hoe hoger de dichtheid hoe groter de vereiste lichtintensiteit wordt, hoe lager de dichtheid hoe minder licht er vereist wordt (Soni et al., 2017). Dit kan ook vanuit volgende bevinding verklaard worden: wanneer algen op een diepte van 12-15 cm gekweekt worden in een open raceway zal zelfbeschaduwing de beschikbaarheid van licht voor de enkele cel in de cultuur regelen. Een bepaald deel van de cultuur zal dus altijd een tekort aan licht ontvangen om aan de fotosynthesebehoefte te voldoen en zal dus, per definitie, licht gelimiteerd zijn. Wanneer in tegenstelling een erg verdunde cultuur gebruikt wordt en het licht in de hele waterkolom kan doorschijnen zal er geen lichtlimitatie zijn. In het begin van de jaren 80 werd reeds aangetoond dat wanneer de concentratie van de cultuur toeneemt, de zelfbeschaduwing toeneemt, resulterend in een afname van de groeisnelheid (Vonshak, 2002) (Habib et al., 2008). Zoals weergegeven in Figuur 10 blijkt deze reactie van de groeisnelheid op de zelfbeschaduwing het grootst in de zomer.



Figuur 10 De groeisnelheid van spirulina in relatie met de concentratie van de populatie en het seizoen. ●-● zomer, ○-○ lente en herfst en Δ-Δ winter (Vonshak, 2002)

Fotoinhibitie is het verlies van fotosynthetische capaciteit als gevolg van schade aan het fotosynthesesysteem II veroorzaakt door foton flux dichtheden die groter zijn dan nodig om de fotosynthese te verzadigen (Sili et al., 2012). Vonshak en Guy waren in 1988 de eersten die het fenomeen van fotoinhibitie in openluchtculturen van spirulina beschreven (Vonshak & Guy, 1988). Door de fotosynthetische activiteit van de culturen te volgen die bij volle zonnestraling of onder schaduwrijke omstandigheden werden gekweekt, stelden ze vast dat het beschaduen van de culturen resulteerde in een toename van de fotosynthetische activiteit en een toename van de productiviteit (Vonshak, 2002). Deze bevindingen leken in eerste instantie wat contradictorisch met het dogma dat algen culturen in open lucht licht als limiterende factor hebben.

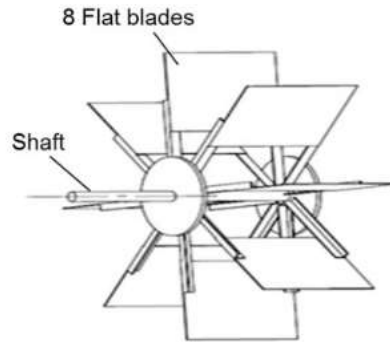
Culturen die opgegroeid zijn onder hoge lichtintensiteiten zijn in zekere mate geacclimatiseerd en hebben zo een hogere resistentie tegen fotoinhibitie (Sili et al., 2012).

1.4.6 O₂ en CO₂

Het mengen van de algencultuur en dus het voorzien van een turbulente stroming is voor een aantal zaken erg belangrijk. Het zorgt voor een uniforme distributie van CO₂, een verwijdering van het opgehoopte O₂ gas en het voorzien van een optimaal lichtregime (Usharani et al., 2012; Habib et al., 2008; Vonshak, 2002).

1.4.6.1 Mengsystemen

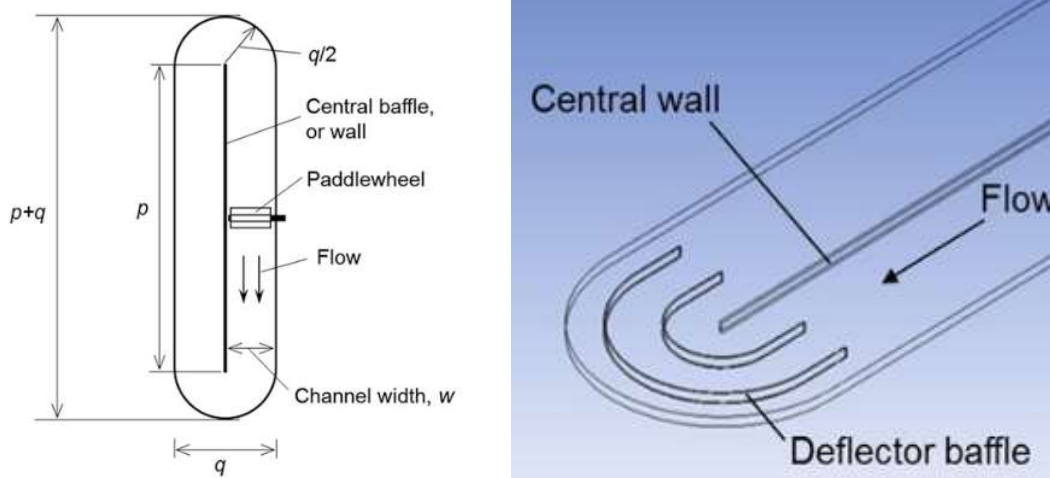
Verschillende manieren van mengen zijn reeds beschreven gaande van pompen, zwaartekrachtgestuurde menging, manueel mengen tot aangedreven schoepen (Usharani et al., 2012). Het schoepenrad (Figuur 11) is het meest voorkomende roersysteem in de spirulina cultivatie, en wordt beschouwd als zijnde het meest effectieve en minst dure systeem (Chisti, 2016) desondanks worden ook andere systemen uitgetest (Habib et al., 2008).



Figuur 11 Een typisch schoepenrad gebruikt voor menging in een raceway pond (Chisti, 2016)

Een probleem bij het mengen met het schoepenrad ligt in de aard van de stroming. Volgens Habib et al. (2008) is deze namelijk meestal niet turbulent genoeg om een optimaal licht regime te voorzien voor de enkele cel. Door in de raceways folies toe te voegen in een design gelijkend op dat van een vliegtuigvleugel, wordt door de door de folies gecreëerde wervelingen de systematisch menging beïnvloed. Hierdoor wordt een meer dan dubbele toename van fotosynthetische efficiëntie waargenomen. Een alternatief apparaat voor het mengen in ondiepe algenvijvers bestaat uit een plank die de doorsnede van de bassin afsluit maar boven de bodem nog een smalle spleet vrijlaat. De plank wordt heen en weer bewogen waardoor turbulentie ontstaat en de cultuur door de smalle strook langs onder wordt bewogen. Deze techniek is echter nog niet opgeschaald en een uitgebreide evaluatie van het systeem moet nog worden uitgevoerd (Habib et al., 2008).

De constructies van open bassins voor de cultivatie van spirulina worden vaak op dezelfde manier uitgevoerd om een goede stroming te krijgen. In Figuur 12 is een typische constructie van een bassin weergegeven. Aan de halfronde uiteinden van het bassin worden in de meeste gevallen gebogen keerschotten geplaatst. Deze zorgen voor een gelijkmatige stroming in de bocht en minimaliseren het ontstaan van dode zones. Dode zones zijn zones in het medium waarin er nauwelijks of geen turbulentie is waardoor deze een negatieve invloed hebben op de menging, vaste stoffen kunnen bezinken en er dus energieverliezen zijn (Chisti, 2016).



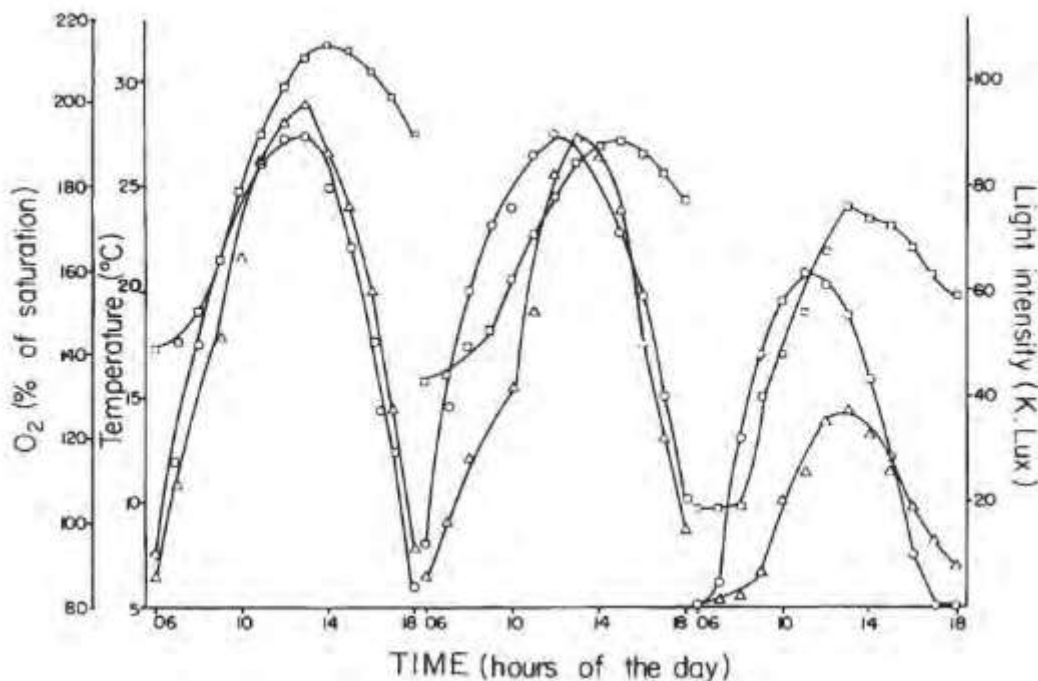
Figuur 12 Typische constructie van een open raceway-bassin voor spirulinaproductie (Chisti, 2016)

1.4.6.2 Zuurstof

Zuurstof wordt geproduceerd doorheen het proces van fotosynthese en wordt bijgevolg opgehoopt in de cultuur. Een belangrijke rol van een turbulente stroming is bijgevolg ook het verwijderen van die zuurstof. In relatief kleine bassins waar er hoge debieten kunnen bereikt worden, kan de zuurstofconcentratie niet hoger zijn dan 200% van de verzadiging van de lucht. In grotere bassins waar het water relatief langzaam stroomt (10-20 cm/s) kan, wanneer er een grote fotosynthetische snelheid gehaald wordt, de zuurstofconcentratie oplopen tot 500% van de verzadiging. Hoge concentraties O₂ remmen de fotosynthese en de groei en kunnen leiden tot een totaal verlies van de cultuur (Vonshak, 2002).

Wanneer het zuurstofgehalte op een waarde van 20 tot 22 mg/l wordt gehouden, wordt er geen significante vermindering van de fotosynthetische activiteit waargenomen. Het blootstellen van culturen aan een hoger niveau dan dit resulteert in een snelle afname van de fotosynthetische activiteit. Daarbij gaat een te hoge concentratie leiden tot een verminderde groeisnelheid en het verbleken van de pigmenten (Vonshak, 2002).

Er van uitgaand dat de fotosynthesesnelheid gebruikt kan worden als indicator van de metabole activiteit van spirulina gekweekt in openluchtsystemen, zijn de veranderingen in zuurstofconcentratie gedurende de dag gecorreleerd met de veranderingen in licht en temperatuur. In de zomer is de limiterende factor voor de groei licht, immers de dagelijkse piek in zuurstofconcentratie wordt bereikt op het zelfde moment als wanneer de lichtintensiteit zijn maximum bereikt. In de winter echter blijkt temperatuur de beperkende factor te zijn aangezien de zuurstofpiek de temperatuurpiek in de vijver volgt in plaats van de lichtintensiteit (Vonshak, 2002; Habib et al., 2008). In Figuur 13 zijn deze bevindingen grafisch weergegeven.



Figuur 13 Veranderingen doorheen de dag in zuurstofconcentratie, temperatuur en lichtintensiteit tijdens verschillende seizoenen. Van links naar rechts zomer - lente- winter (Vonshak, 2002)

1.4.6.1 Koolstofdioxide

Voor hoogproductieve algenculturen volstaat de hoeveelheid CO₂ in de lucht niet. Het is dan ook een noodzaak om de verschillende systemen die gebruikt worden voor de kweek van algen te beluchten met CO₂ gas. Dit gas kan afkomstig zijn als ‘afvalstroom’ uit de industrie, zoals bijvoorbeeld verbrandingsgassen. Deze gassen leveren dan CO₂ én zijn arm aan zuurstof waardoor ze het door de algen geproduceerde zuurstof gemakkelijk kunnen opnemen. (*De groene belofte: Algen*, 2013; Chisti, 2016)

1.4.7 Contaminatie van de spirulinacultuur

Contaminatie door verschillende algensoorten kan een mogelijk probleem vormen bij het kweken van microalgen en dus ook spirulina in openlucht. Bij wijze van voorbeeld enkele maatregelen om de contaminatie met *Chlorella* te vermijden. Ten eerste het handhaven van een hoge bicarbonaat concentratie (alkalisch milieu), het nemen van voorzorgsmaatregelen om de opgeloste organische belasting in het medium zo laag mogelijk te houden en in de winter het verhogen van de temperatuur door kasverwarming (Vonshak, 2002; Habib et al., 2008).

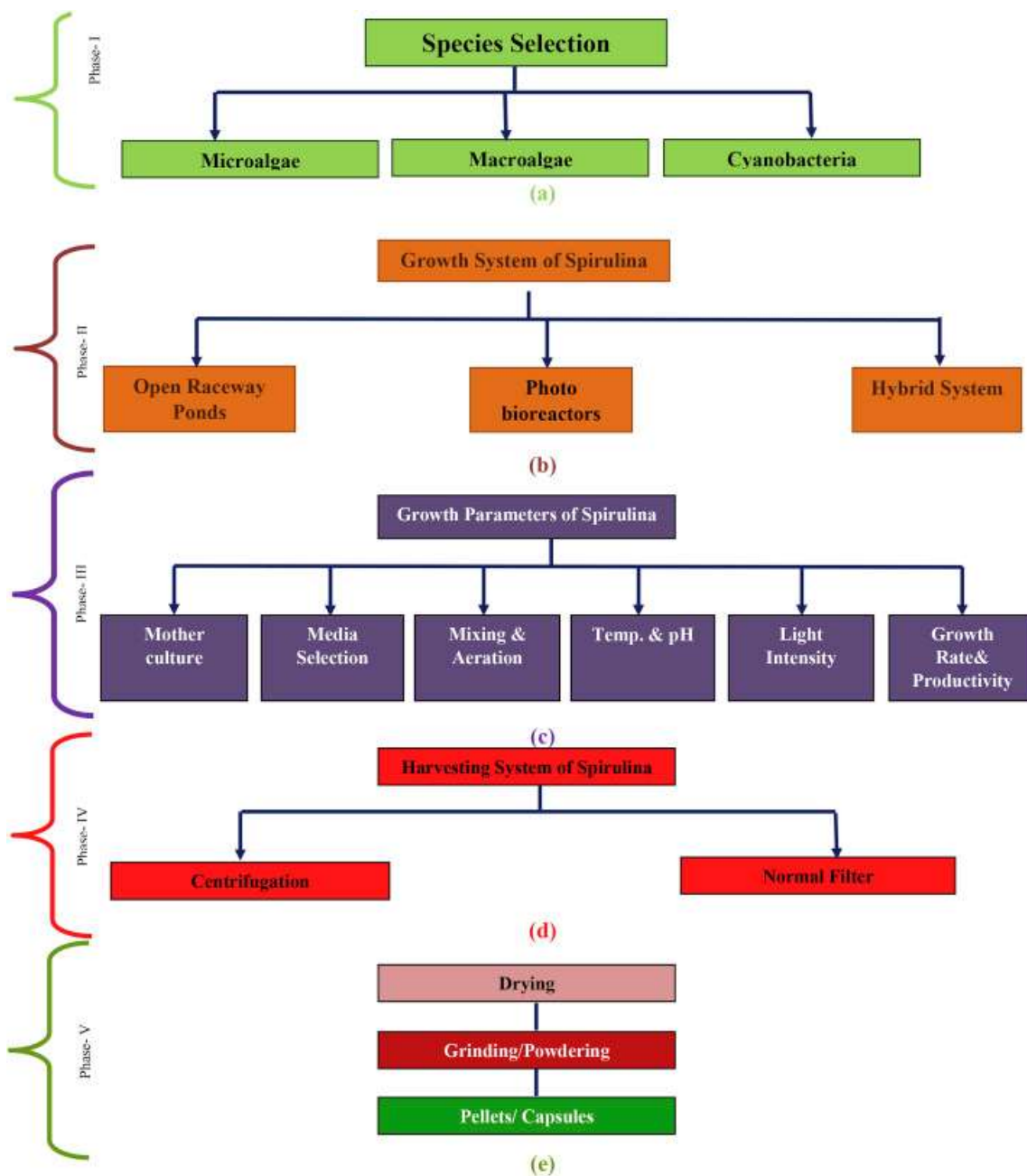
De ontwikkeling van grazers in de teelt, voornamelijk van het amoebe-type, vormt een ander probleem. Deze worden bij spirulina waargenomen in sommige onjuist onderhouden commerciële vijvers. Toevoeging van ammoniak remde de ontwikkeling van deze grazers. Lincoln et al. (1983) meldden ook dat de populatie van grazers aanzienlijk afnam toen ammoniak als belangrijkste stikstofbron werd gebruikt (Lincoln et al., 1983; Vonshak, 2002; Habib et al., 2008).

De ervaring leert dat contaminerende organismen geen ernstige problemen opleveren zolang een goede groei in de cultuur wordt gehandhaafd. Tevens zijn er tot nu toe geen cyanofagen waargenomen die spirulina aanvallen (Habib et al., 2008).

1.5 Drogen en verwerken

1.5.1 Productieproces

Om tot een afgewerkt spirulinaproduct te komen dienen een aantal stappen in verschillende fasen gevolgd te worden. In Figuur 14 is een flowchart weergegeven die de verschillende stappen koppelt. De groeisystemen en de groeifactoren, zoals hierboven uitgebreid beschreven, zijn de bepalende fasen in de productie. De daaropvolgende fase is de oogst- en productiefase. Deze bestaat uit het oogsten door middel van filtratie of centrifugatie waarna het product gedroogd, vermalen en gepelletiseerd wordt. Deze processen worden in de volgende alinea's besproken.



Figuur 14 Flowchart voor het cultiveren van spirulina. Vertrekkende van de selectie van de algensoort tot het vormen van de pellets (Soni et al., 2017)

1.5.1.1 Oogsten

Het beste moment om te oogsten is 's ochtends vroeg aangezien dan het percentage proteïnen het hoogst is, de koudere temperaturen het werk draaglijker maken en er meer uren zonneschijn ter beschikking zijn (gedurende de dag) om het geoogste materiaal te laten drogen (Soni et al., 2017).

Het oogsten wordt over het algemeen in een aantal stappen uitgevoerd waarbij in de eerste stap de spirulina uit zijn medium verwijderd wordt en een biomassa verkregen wordt die 10% droge stof en 50% residueel medium bevat. In een tweede stap wordt nog meer medium verwijderd om als eindproduct een spirulinabiomassa van zo'n 20% droge stof te verkrijgen (Vonshak, 2002; Soni et al., 2017).

Een eerste methode om de spirulina van het medium te verwijderen is gebruik maken van centrifugatie. Deze techniek wordt vooral bij grootschalige productie in de industrie gebruikt. Het is een behoorlijk efficiënte methode maar gevoelige algen cellen kunnen worden beschadigd wanneer ze tegen de rotorwand worden gedrukt (Soni et al., 2017).

Een tweede manier is om de spirulina te oogsten via filtratie. De installaties bestaan meestal uit een aantal opvolgende filterfases. De spirulinacultuur wordt vanuit het cultivatiesysteem over de filter(s) gepompt waarna het filtraat rechtstreeks terug in het systeem terecht komt. Er zijn twee soorten filters namelijk schuine of trilzeven. Hellende zeven zijn 380 tot 500 mesh⁴ met een filteroppervlak van 2 - 4 m² per eenheid en zijn in staat om bijna 10 tot 18 m³ spirulina cultuur per uur te oogsten (Ogbonna et al., 1999; Habib et al., 2008). Het rendement van het oogsten van de biomassa is zeer hoog en bedraagt bijna 95%. Trilzeven filteren hetzelfde volume per tijdseenheid als de schuine zeven, maar vereisen een derde van de oppervlakte. Trilzeven kunnen worden geplaatst in dubbele of driedubbele verdiepen van filters met een diameter tot 183 cm. Hun oogstrendementen zijn vaak zeer hoog. De combinatie van zowel een schuine filter als een trilzeef wordt gebruikt. Bij het verpompen van de algenkweek over de filters kunnen de spirulina-draden fysiek beschadigd raken. Herhaaldelijk oogsten leidt tot een toenemende verrijking van de kweek met eencellige microalgen of korte spirulina-draadjes, die gemakkelijk door de zeef kunnen ontsnappen (Habib et al., 2008; Vonshak, 2002).

Ook in de kleinschalige (small-scale) productie wordt de spirulina door middel van filters geoogst. Hiervoor wordt een filter of vezeldoek met openingen van minstens 50 µm gebruikt. Met behulp van emmers wordt de cultuur over bijvoorbeeld een twee-traps filter gegoten. Hierbij zorgt de eerste filter voor het tegenhouden van contaminaties als kleine insecten en blaadjes terwijl de tweede filter specifiek de spirulina tegenhoudt. Het verkregen residu kan dan nogmaals over een nog fijnere filter worden gestuurd. Het filtraat valt in ieder geval terug in het bassin waaruit de cultuur wordt gefilterd. In Figuur 15 is een dergelijke opstelling weergegeven zoals gebruikt wordt in een spirulinaproductie centrum in Pahou, Benin.

⁴ Een maat die staat voor het aantal openingen per inch in een gaas.



Figuur 15 Typische opstelling voor de oogst bij small-scale productie in Pahou, Benin. Een houten zeef wordt gebruikt om de contaminatie uit de cultuur te zeven. Waarna de cultuur over 2 opvolgende (witte) filterdoeken wordt gebracht.

Na het filteren worden de zouten uit de biomassa gewassen en wordt de gewassen koek vaak nog gehomogeniseerd voor deze wordt gedroogd (Soni et al., 2017).

1.5.1.2 Drogen

In principe zou spirulina binnen de zes uur na oogsten, vers, geconsumeerd moeten worden, hoewel het door een droging tot minstens een jaar bewaard kan worden voor later gebruik (Juneja et al., 2013).

Bij het droogproces was de grootste uitdaging van de voedingsbedrijven om de nutritionele verliezen tijdens het droogproces zoveel mogelijk te beperken. Dit terwijl ondertussen wel een zo hoog mogelijk gehalte aan spirulinabiomassa gerecupereerd dient te worden, en dit alles op een kostenefficiënte manier. Verschillende droogtechnieken zijn reeds geïmplementeerd: zondrogen, vriesdrogen, spraydrogen, ‘drum’ drogen en koken (Soni et al., 2017).

Spraydrogen wordt vaak in de industrie gebruikt. Bij dit systeem worden fijne druppels aan een erg hoge temperatuur gedroogd en dit levert een extreem fijn poeder met een lage schijnbare dichtheid op. Door het snelle proces wordt het behoud van warmtegevoelige nutriënten, pigmenten en enzymen gegarandeerd. Vriesdrogen wordt beschouwd als de beste manier van drogen maar is vaak veel te duur en te gecompliceerd (Vonshak, 2002). Aangezien spirulina een dunne celwand heeft, voldoet zonlicht echter al om de alg te steriliseren en het eetbaar te maken. Drogen door middel van de zon is de meest gebruikte techniek, vooral bij small-scale

producties in derdewereldlanden. Wanneer er gedroogd wordt in direct zonlicht moet het droogproces wel erg snel gebeuren omdat anders het chlorofyl vernietigd wordt en het gedroogde product een blauwe schijn kan krijgen (Soni et al., 2017).

Belangrijk bij al deze droogtechnieken is dat de biomassa die gedroogd wordt dun genoeg moet zijn om te drogen vooraleer het begint te gisten. Het beginnen gisten kan tijdens en na het droogproces opgemerkt worden door een kenmerkende geur. Gebruikelijk worden daarom twee vormen gebruikt voor het droogproces: dunne lagen van eerder vloeibare biomassa op een plastic film of staafvormige ‘spaghetti strengen’ die op een geperforeerde plaat worden gelegd zoals weergegeven in Figuur 16. In het eerste geval zal de lucht horizontaal over de film passeren terwijl in het laatste geval de lucht verticaal door de plaat gaat. De staafvorm is theoretisch beter omdat verdamping rondom kan plaatsvinden, de staven moeten echter wel stevig genoeg zijn om hun vorm te behouden, dus dit type droging is beperkt tot biomassa die door persen kan worden ontwaterd (Soni et al., 2017).



Figuur 16 Staafvormige spaghetti-strengen van spirulina op een geperforeerde plaat, klaar voor het droogproces.

De totale droogtijd moet minstens twee uur zijn. De droogtemperatuur moet worden beperkt tot 68 °C en de droogtijd is beperkt tot 7 uur. Een te hoge temperatuur en dus overdroging leidt vaak tot het verlies van enkele essentiële componenten zoals vitamines, chlorofyl en carotenoïden (Vonshak, 2002; Jourdan, 2001). Het drogen wordt uitgevoerd tot een vochtgehalte van 3 à 4% wordt bereikt, voor een betere bewaring onder opslag is het vochtgehalte best niet hoger dan deze waarden (Soni et al., 2017; Vonshak & Richmond, 1988). Wanneer de biomassa een vochtgehalte van meer dan 8% bezit, zal dit leiden tot de groei van schimmels en bacteriën in het product (Vonshak, 2002).

Tijdens het droogproces is heel wat energie nodig om water te laten verdampen vanuit de natte biomassa. Om 1 kg water te laten verdampen is ongeveer 2.257 kJ energie nodig, maar dit varieert naargelang de efficiëntie van het droogproces. Deze efficiëntie is bij het drogen door de zon rond de 50% aangezien het materiaal blootgesteld is aan de openlucht terwijl dat de efficiëntie van een vacuüm droogproces kan oplopen tot 80% (Papadaki et al., 2017; Soni et al., 2017).

1.5.1.3 Verwerken

Na het drogen worden de strengen of de ‘koeken’ tot poeder vermalen. Het vermalen neemt zo’n 6 tot 10 u in beslag en wordt uitgevoerd tot een gemiddelde poedergrootte van 200-800

nm wordt bekomen. De spirulina kan vervolgens als poeder blijven bestaan of nog worden omgezet tot tabletten, vlokken, capsules of verder vernalen worden tot ultra-fijn poeder. Commercieel wordt spirulina vooral als poeder en als tablet verkocht (Soni et al., 2017; Ogbonna et al., 1999).

Bij de productie van hoogwaardig spirulina is ook de verpakking een essentiële stap. Bij de industriële verwerking wordt het poeder onmiddellijk opgezogen naar een inzamelhopper in de verpakkingsruimte en wordt onder vacuüm verzegeld in vaten met speciale gasbarrièrezakken. Deze specifieke soort verpakking wordt gebruikt om de oxidatie van bepaalde vitale pigmenten zoals carotenoïden tot een minimum te beperken. Het verzegelde product wordt vervolgens in vaten geplaatst voor verzending. In deze vaten kan het product tot 4 jaar blijven zitten met weinig verandering in de biochemische samenstelling of voedingseigenschappen. Uit studies waarbij het pigmentverlies onder verschillende opslagomstandigheden werd vergeleken blijkt er bij de gasbarrièrezak geen verder verlies meer te zijn nadat de aanvankelijke zuurstofconcentratie in de zak is uitgeput (Vonshak, 2002).

1.6 Samenstelling en nutritionele waarde

1.6.1 Biochemische samenstelling

De gemiddelde biochemische samenstelling van Spirulina is voorgesteld in Tabel 4.

Tabel 4 Gemiddelde chemische samenstelling van spirulina

COMPONENT	INHOUD	AUTEUR
Proteïnen	50-70% DS	Falquet & Hurni, 2006 Habib et al., 2008
Lipiden	5,6-7% DS > 11% DS	Bujard, 1970; Eartrise, 1986; Habib et al., 2008; Hudson & Karis, 1974
Koolhydraten	15- 25% DS	
Vitaminen		
➤ B-Caroteen	700-1.700 mg/kg	Falquet & Hurni, 2006 Careri et al., 2001
➤ Vitamine E	15-190 mg/kg	Challem, 1981 Eartrise, 1986
➤ Vitamine B12	0,1-0,34 (zonder pseudo vitamine B12)	Falquet & Hurni, 2006
Mineralen		Falquet & Hurni, 2006; Soni et al., 2017
➤ Calcium	1.300-14.000 mg/kg	
➤ Fosfor	6.700-9.000 mg/kg	
➤ Magnesium	2.000-4.000 mg/kg	
➤ Ijzer	600-2.500 mg/kg	
➤ Zink	21-40 mg/kg	
➤ Koper	8-10 mg/kg	
➤ Chroom	2,8 mg/kg	
➤ Mangaan	25-37 mg/kg	
➤ Natrium	4.500 mg/kg	
➤ Kalium	6.400- 15.400 mg/kg	

1.6.1.1 Proteïnen

Om historische redenen is er een sterke focus op eiwitten wanneer het over spirulina gaat. In enige zin ook correct als men rekening houdt met zowel de rijkdom als de kwaliteit van de eiwitten in spirulina. Falquet & Hurni (2006) geven echter aan dat het proteïnenbelang toch enigszins getemperd moet worden, enerzijds vanwege de relatief hoge kosten van spirulina en anderzijds omdat de dagelijks ingenomen hoeveelheden spirulina voor een volwassene nauwelijks meer dan 12-24 gram kunnen bedragen. Het is dus niet mogelijk om meer dan 15 gram eiwit per dag via een redelijke inname van spirulina te verwachten: deze hoeveelheid is slechts een kwart tot een derde van de dagelijkse eiwitbehoefte voor een persoon van 60 kg, gebaseerd op de momenteel aanbevolen dagelijkse inname, d.w.z. 0,7 tot 1 g per kg lichaamsgewicht. In het geval van ondervoede kleine kinderen echter, zou het niet onrealistisch zijn om tot 10 g spirulina op te nemen in het dagelijkse rantsoen, dat, afhankelijk van het gewicht van het kind, meer dan 50% van de aanbevolen eiwitinname kan vertegenwoordigen (Falquet & Hurni, 2006).

Het eiwitgehalte van spirulina varieert tussen de 50 en 70% op droog gewicht basis (Falquet & Hurni, 2006; Habib et al., 2008). Zelfs voor een micro-organisme zijn deze waarden uitzonderlijk hoog. De beste bronnen van plantaardig eiwit bereiken slechts de helft van deze niveaus, bijvoorbeeld sojameel bevat "slechts" 35% ruw eiwit. In termen van eiwitopbrengst moet er ook rekening gehouden worden met het feit dat bij spirulina alles eetbaar is, in tegenstelling tot gewone planten waarbij slechts een beperkt deel eetbaar is. De stikstof die door meststoffen wordt geleverd wordt daarom bij spirulina veel efficiënter omgezet in eetbare eiwitten voor de mens (Falquet & Hurni, 2006).

Vanuit kwalitatief oogpunt zijn spirulinaproteïnen compleet, omdat alle essentiële aminozuren aanwezig zijn en 47% van het totale gewicht van de eiwitten uitmaken (Bujard, 1970). De zwavelhoudende aminozuren: methionine en cysteïne zijn het minst goed vertegenwoordigd (Bujard, 1970). Lysine is volgens sommige auteurs ook licht ondervertegenwoordigd (PAG, 1974), volgens anderen niet (Clément et al., 1967). De biologische waarde van spirulinaproteïnes is dus zeer hoog, en het optimum kan worden bereikt door aanvulling met een goede bron van zwavelaminozuren en eventueel lysine. Granen zoals rijst, tarwe en gierst of sommige oliehoudende zaden zoals sesam zouden uitstekende supplementen zijn. Zo consumeert de bevolking van Tsjaad de spirulina in combinatie met gierst, die bijzonder rijk is aan methionine en cysteïne (Falquet & Hurni, 2006).

Verder hebben cellen van spirulina geen cellulose celwanden waardoor de proteïnen erg gemakkelijk te verteren zijn. Daardoor vereist spirulina geen kookproces of andere behandeling om de proteïnen vrij te stellen. Dit is een voordeel voor de productie en omdat op die manier ook andere waardevolle bestanddelen zoals vitamines en onverzadigde vetzuren niet beschadigd worden (Falquet & Hurni, 2006).

1.6.1.2 Lipiden en essentiële vetzuren

Hoewel verschillende publicaties (Bujard, 1970; Eartrise, 1986; Habib et al., 2008) een waarde weergeven van 5,6 tot 7% van het droge gewicht aan lipiden, zouden betere extractiesystemen het mogelijk maken om meer dan 11% te verkrijgen (Hudson & Karis, 1974).

De menselijke behoeftes aan essentiële vetzuren wordt vastgelegd op 1 - 2% van de energienname voor volwassenen en 3% voor kinderen (Falquet & Hurni, 2006).

Spirulina is aanbevolen als voedingssupplement in gevallen van essentieel vetzuurtekort (Hudson & Karis, 1974) aangezien het kan beschouwd worden als een van de rijkste bronnen van gamma-linoleenzuur (8-40% van de totale vetzuren), na menselijke melk en enkele weinig gebruikte plantaardige oliën zoals bijvoorbeeld hennepolie (Ciferri, 1983). Gamma-linoleenzuur (18:3 omega-6) is zeldzaam in alledaagse voedingsmiddelen en zou een hoge voedingswaarde hebben. Normaal wordt het in de mens gesynthetiseerd uit linolzuur (18:2 omega-6) van plantaardige oorsprong, maar in geval van stoornissen of een tekort aan endogene synthese kan een direct opname van gamma-linoleenzuur interessant zijn. De omega-3 variant, α -linoleenzuur is niet aanwezig in spirulina (Falquet & Hurni, 2006). Ook andere essentiële vetzuren zijn aanwezig, zoals linolzuur (18:2 omega-6). Er is ook een vrij hoog gehalte aan palmitinezuur (16:0) aanwezig: 25 tot 60% van de totale vetzuren (Falquet & Hurni, 2006).

Door toevoeging van bepaalde vetzuren direct in het kweekmedium kan de lipidsamenstelling van spirulina aanzienlijk wijzigen, dus door toevoeging van linolzuurzouten (C18:2), kan het gamma-linoleenzuur van spirulina sterk beïnvloed worden (Ronda & Lele, 2008).

Terwijl sommige auteurs (Bujard, 1970) de afwezigheid van sterolen, meer bepaald cholesterol, benadrukken, blijkt dat in bepaalde spirulinastammen toch 1,5% van de lipiden sterolen zijn. Geen enkele publicatie geeft echter een waarde van meer dan 0,015% van het droge gewicht van spirulina voor vrije sterolen (Hudson & Karis, 1974; Clément et al., 1967).

1.6.1.3 Koolhydraten

In totaal maken koolhydraten 15-25% van het droge gewicht van spirulina uit. Eenvoudige koolhydraten, glucose, fructose en sacharose, zijn slechts in zeer kleine hoeveelheden aanwezig. Bijna alle opneembare koolhydraten bestaan uit polymeren zoals glucosamine. (1,9% van het drooggewicht), rhamnosamine (9,7%) of glycogeen (0,5%) (Quillet, 1975). Het enige koolhydraat dat in voldoende hoeveelheden voorkomt om van belang te zijn is mesoinositol-fosfaat, dat een uitstekende bron is van organisch fosfor en inositol (350-850 mg/kg droge stof). Dit inositolgehalte is ongeveer acht keer zo hoog als dat van rundvlees en enkele honderden keren zo hoog als dat van de groenten met de hoogste gehalten (Challem, 1981). Verder worden spirulina polysacchariden verondersteld een stimulerend effect te hebben op DNA-herstelmechanismen, wat het radio-beschermende effect van spirulina kan verklaren (Falquet & Hurni, 2006).

Een polysaccharide specifiek voor spirulina, 'spirulan', is geïsoleerd en gedeeltelijk gekarakteriseerd (Lee et al., 1998; Lee et al., 2000). Het is een drager van veel sulfaatresiduen en bevat uroninezuur en is zeer polyanionisch; het skelet bestaat hoofdzakelijk uit methyl-rhamnose en methyl-xylose. Deze stof lijkt veelbelovend als antiviraal middel in sommige therapeutische toepassingen (Hayashi et al., 1996).

1.6.1.4 *Vitaminen*

- β -caroteen

In spirulina bestaan de carotenoïden voor 80% uit β -caroteen en voor 20% uit voornamelijk fysoxanthine en cryptoxanthine. Per kg bevat spirulina zo'n 700-1700 mg β -caroteen, dat door alle zoogdieren kan worden omgezet tot vitamine A (Careri et al., 2001). Aangezien de behoefte aan vitamine A voor een volwassene slechts 1 mg per dag is, is 1-2 g spirulina per dag genoeg om aan deze behoeftes te voldoen. Doordat retinol (vrije Vitamine A) niet aanwezig is in spirulina wordt het risico tot overdosis beperkt aangezien β -caroteen niet cumulatief toxisch is (Falquet & Hurni, 2006). De vermelde β -caroteen waarden voor spirulina werden gevonden in gesproeidroogde spirulina-monsters, d.w.z. zonder verwarming. In het geval van drogen op verwarmde vaten zouden deze waarden met bijna een derde moeten worden verlaagd (Bujard, 1970). Aangezien carotenoïden zeer gevoelig zijn voor oxidatie, is het van essentieel belang om rekening te houden met de droogprocessen die gebruikt worden om de spirulina monsters te verkrijgen waarop de metingen zijn uitgevoerd. Afhankelijk van het type droging, maar ook van de korrelgrootte van het eindproduct, werden voor β -caroteen aanzienlijke verschillen gemeten (Seshadri, 1991).

In vele derdewereldlanden is een vitamine A deficiëntie veel voorkomend en kan spirulina hierbij een oplossing bieden. In een studie uitgevoerd door Seshadri (1993) op 5000 Indiase kleuters werd aangetoond dat een dagelijkse dosis van 1 g spirulina verrassend effectief was tegen een chronisch vitamine A-deficiëntie. Na vijf maanden daalde het aandeel van kinderen met een ernstig vitamine A-tekort (met vlekken op het bindvlies van het oog) van 80% naar 10%. Deze studie lijkt aan te tonen dat zelfs een zeer lage dosis spirulina voldoende kan zijn om een aanzienlijke vermindering te verkrijgen van de risico's van blindheid en neurologische schade veroorzaakt door vitamine A-tekort bij kinderen (Falquet & Hurni, 2006).

- Vitamine E

Het gehalte vitamine E in gedroogde spirulina bedraagt 50-190 mg/kg een niveau dat vergelijkbaar is met die van tarwekiemen (Challem, 1981; Earthrise, 1986). Verschillen in resultaten kunnen het gevolg zijn van vele factoren die voornamelijk afhankelijk zijn van de groeiomstandigheden, maar vooral van het drogen van spirulina. Zo is het bijvoorbeeld zeer waarschijnlijk dat sproeidrogen, waardoor de spirulina sterk wordt gebroken, de houdbaarheid van oxidatiegevoelige vitaminen, waaronder vitamine E, aanzienlijk zal verminderen (Falquet & Hurni, 2006).

- Wateroplosbare vitaminen - Vitamine B12

Spirulina is minder rijk aan B-vitaminen dan de gisten maar is wel nog steeds een goede bron. Spirulina bezit desalniettemin een uitzonderlijk hoog gehalte aan vitamine B12 (cobalamine). Deze vitamine is de moeilijkste om te verkrijgen in een vleesloos dieet omdat geen enkele gewone voedingsplant het bevat. Spirulina is vier keer zo rijk aan B12-verbindingen als ruwe lever, lange tijd naar voren gebracht als de beste bron (Falquet & Hurni, 2006). Er moet echter worden opgemerkt dat er een controverse bestaat over de werkelijke biologische beschikbaarheid van vitamine B12 in spirulina voor de mens. Sommige radiochemische tests zouden de aanwezigheid van "actieve" vitamine B12 in spirulina ontkennen. Deze resultaten zouden variëren afhankelijk van de spirulinastammen en zouden dus wel hoge niveaus van "actieve" B12 tonen in sommige stammen (Hau, 1995). Een onderzoek van Watanabe et al.,

(2002) stelt dat het de overheersende verbinding in spirulina pseudovitamine B12 zou zijn, een inactieve corrinoid. Deze lijkt geen B12 activiteit te hebben bij de mens, maar verstoort het normale metabolisme van vitamine B12 niet (Watanabe et al., 2002).

1.6.1.5 Mineralen

De gemiddelde gehalten aan mineralen aanwezig in spirulina zijn weergegeven in Tabel 4. Interessant zijn vooral de gehalten aan ijzer, calcium, fosfor, magnesium en kalium. Het ijzergehalte is zeer hoog in spirulina, zeker wanneer dit vergeleken wordt met een dagelijkse aangeraden hoeveelheid van 18 mg. IJzertekort komt algemeen voor, vooral bij zwangere vrouwen en kinderen terwijl voedselbronnen met een goed ijzergehalte eerder schaars zijn. Zo bevatten granen die beschouwd worden als één van de betere ijzerbronnen slechts 150-250 mg/kg ijzer. Bovendien heeft het ijzer in plantaardige bronnen een zeer lage biologische beschikbaarheid, slechts 5% is werkelijk opneembaar, dit terwijl voor spirulina wel een hoge biobeschikbaarheid is aangetoond (Falquet & Hurni, 2006). Meer nog, in een studie van Puyfoulhoux et al. (2001) werd zelfs aangetoond dat spirulina-ijzer beter wordt geabsorbeerd dan ijzer uit vlees. Natuurlijke spirulina bevat nauwelijks meer dan 600 mg/kg ijzer. In het geval van gekweekte spirulina worden aan het groeimedium ijzerzouten toegevoegd, vaak in een complex met EDTA of citroenzuur waardoor de ijzerwaarden gemakkelijk verhoogd worden tot 600-1000 mg/kg (Falquet & Hurni, 2006). Sommige bedrijven drijven de waarden zelfs op tot extreme ijzergehalten, zo is er op de Europese markt spirulina te vinden met bijna 2.500 mg/kg ijzer (<http://www.biospirulina.com/pdf/Spiron%2036gr.pdf>). Deze gehalten kunnen potentiële problemen van overdosering opleveren (Falquet & Hurni, 2006).

Calcium, fosfor en magnesium zijn in spirulina in vergelijkbare hoeveelheden aanwezig als in melk (Tabel 5) (den Hartog et al., 1988). De hoeveelheden van deze elementen zijn in evenwicht waardoor een risico op ontkalking door een teveel aan fosfor uitsluit (Briend, 1998). De biologische beschikbaarheid van calcium in spirulina is bovendien hoger dan in melk. Calcium speelt een belangrijke rol bij de aanmaak en de ondersteuning van botten en is vooral belangrijk voor kinderen tussen 9 en 18, ouderen en zwangere vrouwen. Voor diverse redenen zoals gezondheids-, religieuze en culturele, zijn sommige mensen (vaak in derdewereldlanden) echter beperkt in het gebruik van melk en andere zuivelproducten. Spirulina kan dus in deze gevallen een geschikt alternatief vormen (Ekantari et al., 2017).

Regio's met arme magnesiumgronden komen vaak voor en veroorzaken deficiënties in de bevolking die er leeft, wat kan leiden tot hart- en vaat- en zenuwstoornissen. Magnesiumtekort komt veel voor bij ernstig ondervoede kinderen, omdat zij vaak alleen graanpapjes met een laag magnesiumgehalte opnemen (Briend, 1998). Spirulina kan worden beschouwd als een uitstekende voedselbron van magnesium: het is van nature rijk aan magnesium en dit magnesium is biologisch beschikbaar voor mensen (Planes et al., 2002).

Tabel 5 Nutritionele vergelijking van melk en spirulina

MINERAAL	MELK	SPIRULINA
Ca	1.250	1.300-14.000 mg/kg
P	900	6.700-9.000 mg/kg
Mg	130	2.000-4.000 mg/kg
Fe	0.3	600-2.500 mg/kg

Veel voedingsdeskundigen hekelen al enige tijd de lage kalium/natriumverhouding in het overgrote deel van de voedingsmiddelen in de geïndustrialiseerde landen. De hoge kaliuminhoud van spirulina is in dat opzicht een interessant gegeven (Falquet & Hurni, 2006).

1.6.2 Invloed van de groeiomstandigheden op de chemische samenstelling

1.6.2.1 *Temperatuur*

Uit onderzoek van Colla et al. (2007) blijkt dat de temperatuur een belangrijke invloed heeft op de productie van biomassa, proteïnen, lipiden en fenolen. Hierbij bleek een temperatuur van 35 °C een negatieve invloed uit te oefenen op de biomassa-productie maar wel een positief effect te hebben op het proteïnen, vetten en fenolen gehalte. Meer nog zelfs werden van deze laatste componenten de hoogste gehalten gehaald bij een temperatuur van 35 °C. Daaruit kan geadviseerd worden dat, wanneer spirulina gekweekt wordt voor nutritionele doeleinden, best deze temperatuur kan gehanteerd worden. De grootste productie van biomassa werd verkregen bij 30 °C en bij deze temperatuur bleek de stikstofconcentratie geen invloed te hebben op de samenstelling en de biomassa-productie. Hierdoor kan in Zarrouk's medium bij een temperatuur van 30 °C de stikstofconcentratie verlaagd worden van 2,5 g/l tot 0,625 g/l zonder te moeten inboeten aan biomassa-productie (Colla et al., 2007).

Onderzoek naar effecten van de groeiomstandigheden op het β -caroteengehalte in spirulina toonde echter andere resultaten. Een temperatuur boven de 35 °C zorgde voor een daling in het gehalte aan β -caroteen. Een hogere lichtintensiteit (tot 10 k Lux) zorgde voor een verhoging van het β -caroteen gehalte. Het β -caroteengehalte bleek het hoogst bij spirulina gekweekt onder rood licht, gevolg door deze gekweekt onder blauw licht en wit licht. Een nitraat tekort in het medium bleek geen invloed te hebben op het β -caroteen gehalte, wel werd een hoger gehalte gevonden bij een stijging van het gehalte NaCl in het medium (Habib et al., 2008).

De fotosynthese-activiteit van een cultuur bij 25 °C in vergelijking met een kweek bij 35 °C blijkt meer gericht op koolhydraatsynthese dan op eiwitsynthese. Gemiddeld vertegenwoordigden eiwitten en koolhydraten in de ochtend respectievelijk 67,5 en 18,7% van de droge biomassa; in de avond veranderden deze waarden naar 59,9 en 26,3%. In de cultuur geteeld bij 35 °C daarentegen, werd de samenstelling van de biomassa gedurende de dag nauwelijks gewijzigd. Respiratie 's nachts leidde tot hogere koolhydraatverliezen in de kweek bij 25 °C, de hoeveelheid koolhydraten die 's nachts verloren ging was iets hoger dan de biomassaverliezen. Dit verschil is het gevolg van een significante eiwitsynthese tijdens de nacht (Habib et al., 2008).

1.6.2.2 *Licht*

Ook de lichtintensiteit blijkt een rol te spelen. Een hogere intensiteit resulteert in een hogere biomassa productie maar een lagere intensiteit zorgt voor een biomassa die rijker is aan pigmenten en proteïnen (Soni et al., 2017).

De kwaliteit van het licht zou naast de invloed op de groei ook een rol spelen in de eiwit en pigment synthese. Uit een onderzoek uitgevoerd door Subramanian en Jeejibai (Usharani et al., 2012) bleek dat blauw licht aanleiding gaf tot de hoogste eiwitconcentratie, terwijl wit fluorescerend licht met een rood-oranje component meer energie leverde voor een beter eiwit- en pigmentsynthese. De lichtintensiteit in het begin van de cultivatie zou laag moeten zijn, zodat fotolyse vermeden kan worden (Usharani et al., 2012). Er is een variatie in eiwitgehalte van 10 tot 15% afhankelijk van het tijdstip van de oogst in relatie tot de fotoperiode, met de hoogste waarden verkregen aan het begin van de lichtperiode (Rijn & Shilo, 1986).

De eiwitten in spirulina kunnen geklasseerd worden onder de phycocyaninen, componenten van het fotosynthetisch apparaat van cyanobacteriën. Deze phycocyaninen zijn verantwoordelijk voor de blauwverkleuring van spirulina-poeder die te lang aan licht wordt blootgesteld. Phycocyaninen zijn namelijk minder gevoelig voor vernietiging door een overmaat licht dan chlorofyl-moleculen waardoor de blauwe kleur van phycocyaninen overheerst wanneer chlorofylgroen vernietigd wordt (Falquet & Hurni, 2006).

1.6.3 Toepassingen

Spirulina kent als hoogwaardige voedingsstof heel wat toepassingen in zowel humane als dierlijke voeding. Andere chemische componenten zijn dan weer biotechnologisch interessant om in de industrie te extraheren. In Tabel 6 zijn de voornaamste toepassingen van spirulina weergegeven. In 1.6.3.1 wordt er dieper ingegaan op de nutritionele meerwaarde van spirulina als supplement of voedingsbron.

Tabel 6 Samenvatting van de voornaamste toepassingen van spirulina

TOEPASSINGSGEBIED	TOEPASSING	AUTEUR
Menselijke gezondheid	Verbeteren immuunsysteem	Habib et al., 2008 Hoseini et al., 2013
	Nutritioneel supplement en voedingsbron	zie 1.6.3.1
	Anti-kanker effect	O'Shaughnessy et al., 2002 Grawish, 2008
	Antiviraal (HIV, Herpes, Influenza...) en antibacterieel effect	McCarty, 2007 Hoseini et al., 2013 Parages et al., 2012 Hayashi et al., 1996 Sánchez et al., 2003
	Antioxidant werking	Romay et al., 1998
	Bescherming tegen vergiftiging door zware metalen	Sharma et al., 2011 Hoseini et al., 2013
	Verlaging van cholesterol en vermageren	Usharani et al., 2012 Sánchez et al., 2003
Landbouw	N-Meststof	Venkataraman, 1981 Zeenat & Sharma, 1990 Habib et al., 2008
	Kippenvoeder	Venkataraman et al., 1994
	Rundveevoeder	Habib et al., 2008
	Vis en aquatisch voeder	Cao et al., 2018 Venkataraman et al., 1994 Habib et al., 2008
Biochemisch	Blauwe kleurstof voor voeding en o.a. plastic: extractie fycocyanine	Tavanandi et al., 2018 Sarada et al., 1999
Overige	In snoepgoed, shampoo, huidverzorgingsproducten, kauwgom,...	Sánchez et al., 2003

1.6.3.1 *Nutritionele toepassingen*

Naast de toepassingen van spirulina in landbouw en biochemie wordt spirulina al decennialang gebruikt als voedselbron door verschillende populaties. Het wordt beschouwd als een krachtige supervoeding en ook als een wonder dat van nature groeit in de oceanen en zoutmeren in subtropische klimaten. Slechts recent is het herontdekt als potentieel voor de menselijke consumptie. Spirulina bevat vrijwel alle nutriënten die in het ideale complete voedsel zitten. Een aanzienlijk deel van de eiwitten, vitaminen, minerale zouten, koolhydraten, pigmenten, sporenelementen en essentiële vetzuren zijn aanwezig. In tegenstelling tot andere algen is spirulina ook gemakkelijker te consumeren. Doelgroep van de nutritionele voordelen van spirulina zijn vooral specifieke groepen als kinderen, zwangere vrouwen, ouderen, atleten,... (Soni et al., 2017; Usharani et al., 2012).

Vooraf in derdewereldlanden, waar ondervoeding nog een belangrijke plaats in de samenleving inneemt, blijkt uit verschillende onderzoeken het hoog potentieel van spirulina in dit verhaal. Er moet echter opgemerkt worden dat onderzoeken naar de effecten van spirulina vaak moeilijk te voeren zijn. Enerzijds beperkt de naleving van de ethische normen het type onderzoek dat kan worden uitgevoerd sterk, en anderzijds is de essentiële follow-up van patiënten vaak willekeurig en zijn er over het algemeen veel follow-ups die verloren gaan. Daarbij komt dat veel landen met ondervoeding ook politiek moeilijke regio's zijn waardoor veel pogingen tot onderzoek niet eens slagen (Falquet & Hurni, 2006).

Belangrijk bij humanitaire noodsituaties is dat de noodvoedselvoorraden cultureel aanvaardbaar zijn, rijk aan eiwitten en vitaminen, verteerbaar, mengbaar met granen en gedurende lange tijd in omgevingsomstandigheden kunnen worden opgeslagen. Spirulina is in staat veel van deze eigenschappen te leveren en kan in dergelijke situaties dus perfect ingezet worden. Een belangrijk bijkomend voordeel daarbij is dat spirulina ten opzichte van de meeste andere voedingsmiddelen ter plaatse kan worden geteeld en daardoor ook op langere termijn een oplossing biedt bij de ontwikkeling van voedingsstrategieën. Veel van de meer kwetsbare gemeenschappen zoals bijvoorbeeld kustgemeenschappen die gevoelig zijn voor stormen en overstromingen of gemeenschappen in droge gebieden die kwetsbaar zijn voor mislukte oogsten en overbegrazing, zijn immers enorm gebaat bij de ontwikkeling van kleinschalige spirulinaproductie. Verschillende organisaties hebben dit potentieel reeds geïmplementeerd. In Vietnam, deelt een spirulina-producerend centrum elk jaar voedsel uit aan duizenden kinderen die leiden aan Marasmus en Kwasiorkor⁵ en er lopen verschillende projecten in India, Senegal, Togo, Burkina Faso, Benin, de Centraal-Afrikaanse Republiek, Brazilië, Cuba en Thailand (Habib et al., 2008).

Vele onderzoeken toonden reeds het belang van spirulina aan. Zo produceert en gebruikt de vereniging "Nutrition Santé Bangui", die een centrum voor kindervoeding beheert, al meer dan 15 jaar spirulina in Bangui, Centraal-Afrikaanse Republiek. In 1993 hadden al meer dan 300 kinderen een behandeling gekregen op basis van een spirulina-sardienmengsel en de directeur

⁵ Marasmus en Kwasiorkor zijn wereldwijd de meest voorkomende vormen van ondervoeding bij kinderen. Bij kwasiorkor is er vooral een eiwittekort terwijl er bij Marasmus zowel een energie- als een eiwittekort is. Bij Marasmus hebben de kinderen ernstige spierafbraak en minimaal vetweefsel, ze zien er uitgemergeld uit. Kinderen met Kwasiorkor daarentegen hebben veel oedeem en vertonen het kenmerkende opgezwollen buikje (Walton & Allen, 2011).

van het centrum, mevrouw M.-E. Picard, schreef: "Deze eerste gegevens tonen het belang aan van spirulina bij ondervoedingsproblemen, zelfs bij ernstige vormen. Het is een gemakkelijk te gebruiken product, dat goed geaccepteerd wordt door moeders als het goed is uitgelegd." (Picard, 1993). Vervolgens werd deze studie uitgebreid en werd een groep van 592 kinderen in de leeftijd van 0 tot 5 jaar die het spirulina-sardienmengsel kregen, vergeleken met een groep van 182 kinderen die naast de standaard maaltijd alleen sardien kregen. De duur van de behandeling varieerde van 94 tot 145 dagen en de spirulinadosis was 5 g/dag. Analyse van de resultaten toonde een significant grotere verbetering voor kinderen die spirulina kregen, zowel in termen van gemiddelde gewichtstoename als herstel (Falquet & Hurni, 2006).

Ook in Burkina Faso werd een vergelijkende studie over voedingsherstel uitgevoerd op 84 hiv-positieve kinderen en 86 hiv-negatieve kinderen. Deze studie toonde niet alleen het belang van spirulina voor de behandeling van ondervoeding bij kinderen aan, maar ook de bijzonder gunstige invloed ervan op het herstel van kinderen die besmet zijn met het aidsvirus. De werkzaamheden werden uitgevoerd in Ouagadougou, waarbij gebruik werd gemaakt van een spirulina die plaatselijk werd geproduceerd met behulp van eenvoudige installaties (Simpore et al., 2005).

Niet enkel in Afrika, ook in Azië werd het nutritioneel belang van spirulina aangetoond. In India concentreerde een onderzoek van Sachdeva et al. (2004) op 60 schoolmeisjes zich niet alleen op de puur nutritionele gevolgen van een lage dosis spirulina (1 g/d), maar ook op de mogelijke indirecte effecten op hun intellectuele prestaties. Er werd geconcludeerd dat spirulina statistisch significante effecten heeft op zowel de hematologische status van studenten als op hun intellectuele prestaties. Daarbij volgde na het onderzoek een aanbeveling aan de Indiase regering om spirulina gratis aan te bieden in scholen in achtergestelde gebieden (Falquet & Hurni, 2006).

In de Westerse wereld wordt spirulina verkocht als voedingssupplement en als aanvulling in voedsel. De industriële vleesindustrie is tegenwoordig verantwoordelijk voor een groot deel van de ecologische voetafdruk van mensen. Dit zowel op vlak van grondstoffengebruik zoals water- en landgebruik, een inefficiënte voedselomzetting, import van eiwitbronnen (zoals soja) als op vlak van vervuiling zoals het gebruik van pesticiden en de uitstoot van broeikasgassen. Daarbij komt dat de overconsumptie in het Westen heel wat gezondheidsrisico's met zich meebrengt zoals obesitas, diabetes en bepaalde soorten kanker. Het aanbrengen van andere eiwitbronnen in het dieet en het eten van alternatieve voedingsmiddelen, beide mogelijk met spirulina, lijkt dus uit gezondheids- en klimaat oogpunt noodzakelijk (Moons et al., 2018).

1.6.4 Markt

- Algemeen

Sinds 2000 is de productie van microalgen voor voedsel en voeder vervijfvoudigd. Spirulina wordt tegenwoordig gekweekt in meer dan 22 landen met een productie waarde van zo'n 40 miljoen USD en het wordt in meer dan 70 landen geconsumeerd (Moons et al., 2018). In 2016 was Europa verantwoordelijk voor 32% van de wereldwijde consumptie, de regio Azië/Pacific heeft de snelst groeiende markt voor spirulina met een jaarlijkse groei van 14,48%. Deze groei is vooral te wijten aan de sterke groei van de voedselverwerkende industrie in de regio, de groeiende aquacultuur en de groeiende vraag voor spirulina door vegetarische consumenten. Volgens de FAO is India namelijk wereldwijd het land met de laagste vlees consumptie, als gevolg van het grote aantal vegetarische inwoners (Coherent Market Insights, 2017).

Verschillende bedrijven in de gezondheidszorgindustrie produceren spirulinaproducten. Enkele van de grote bedrijven betrokken in de wereldwijde spirulinaproductie zijn weergegeven in Tabel 7. DIC nam na een jarenlange samenwerking Earthrise Nutritionals over en bezit vandaag de grootste kwekerij ter wereld in Californië. DIC zorgt, dankzij de Earthrise-kwekerij, samen met het zusterbedrijf in Japan voor 1/3^{de} van de wereldwijde spirulinaproductie, produceert zo'n 1000 ton per jaar en is daarmee de grootste producent (http://www.dic-global.com/en/whats_dic/scene/spirulina/). Het bedrijf heeft ook enkele distributeurs in Europa die de Earthrise-spirulina als 'Spirulina California' verkopen zoals NaturKraftWerke Spirulina in Zwitserland en Natesis Spirulina in Frankrijk. De enorme grootte van dit bedrijf is duidelijk zeker in vergelijking met 'Spiruline de Burkina' die een gemiddelde productie van 2 ton per jaar hebben. De spirulinakwekerijen in Burkina Faso zijn er vooral op voorzien om de lokale populatie van relatief goedkope spirulina te voorzien en worden gesteund door tal van NGO's.

Tabel 7 Grote spelers op de spirulina markt met hun locatie en producten die te koop worden aangeboden

BEDRIJF	LOCATIE	PRODUCTEN	WEBSITE
Earthrise Nutritionals	VS, California	Tabletten, poeder, capsules	earthrise.com
DIC Lifetec Spirulina	Japan	Blauwe kleurstof voor voeding, poeder, tabletten, diervoeder	dlt-spl.co.jp/business/en/spirulina/
Cyanotech Spirulin	VS, Hawaï	Poeder en tabletten	cyanotech.com
Boonsom Spirulina Farm	Thailand	Tabletten, capsules, poeder, scrub, zeep, massage-olie	boonsomfarm.com
Far East Bio-Tec Co. (FEBICO)	Taiwan	Poeder en tabletten. Ook in combinatie met andere algen zoals chlorella gebruikt in middeltjes gaande van sprays tot hondeneten en gelaatsverzorging	febico.com
Therasana	Frankrijk/Laos	Gourmet Spiruline: Poeder en tabletten al dan niet in combinatie met andere voedingssupplementen	https://gourmet-spiruline.fr/
Spiruline de Burkina (samenwerking met NGO TECHNAP)	Burkina Faso	Poeder en vlokken	spirulineburkina.org
Green Valley	Duitsland	Thee, koeken	greenvalley.de
Sanatur Spirulina	Duitsland	Tabletten, poeder, capsules ook in combinatie met Chlorella.	sanatur.de/bio-spirulina.html
Marcus Rohrer Spirulina	Nederland	Tabletten en poeder	spirulina.nl
RBC Life Sciences	VS, Texas	Tabletten en poeder	rbclifesciences.com

- Benin

De beschikbare spirulina te vinden in de lokale apotheken in Cotonou, Benin zijn weergegeven in Tabel 8.

Tabel 8 Beschikbare spirulina op de markt in Benin

PRODUCENT	PRODUCT	PRIJS	
Dou Bogan – Pahou	Tabletten	€191/kg	
Dou Bogan – Pahou	Capsules	€241/kg	
Spiruline pour la santé - Kandi	Capsules	€ 241/kg	
Bio Original Spirulina-Hong Kong	Tabletten	€198/kg	

<p>Evans Carter- USA</p>	<p>Tabletten</p>	<p>€201/ kg</p>	
------------------------------	------------------	---------------------	--

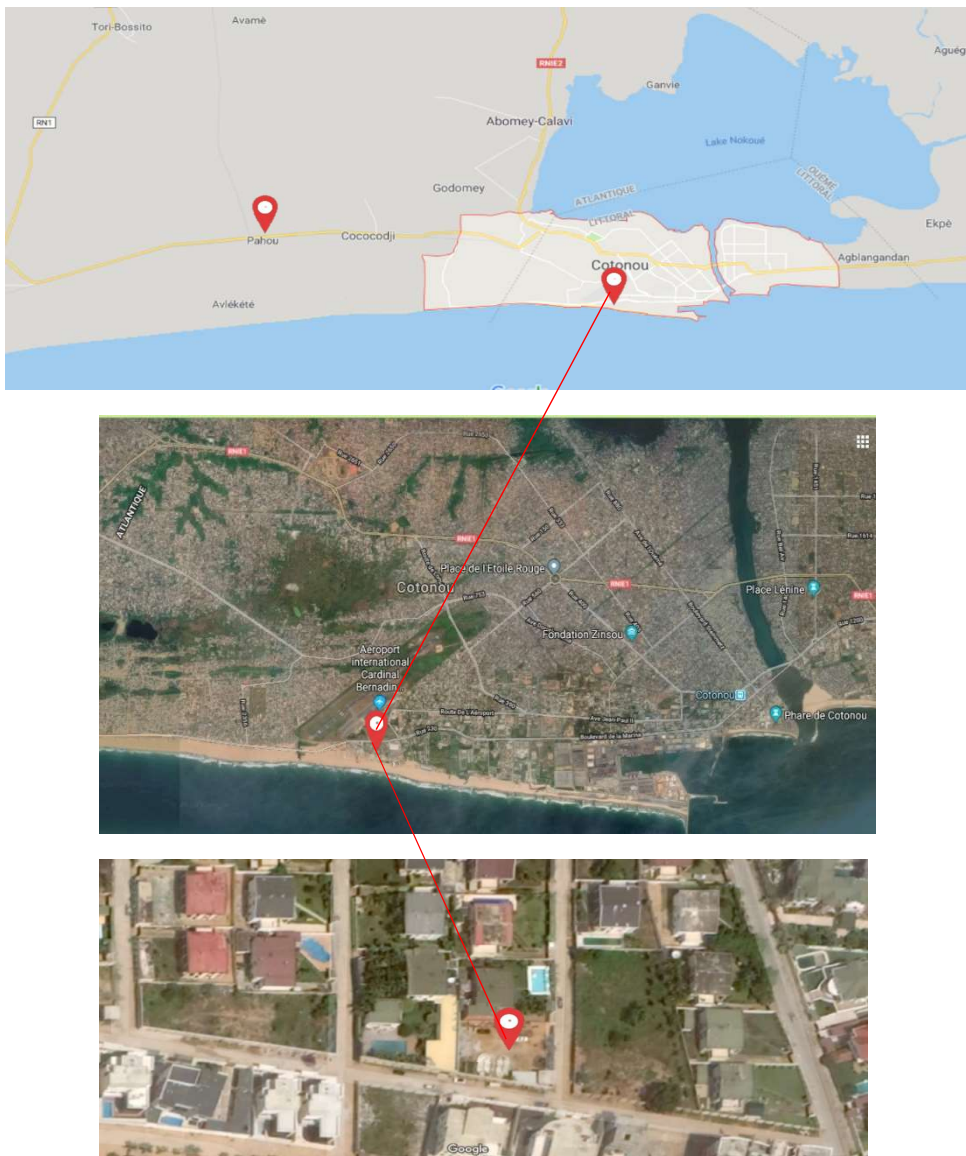
2 Materiaal en methoden

2.1 Locatie

2.1.1 Algemene info

Het onderzoek van deze masterproef vond plaats in Benin. Benin is een land in West-Afrika gelegen langs de Guinee kust met als buurlanden Togo, Niger, Nigeria en Burkina Faso. De officiële hoofdstad van het land is Porto Novo.

De proeven zelf werden uitgevoerd in Cotonou, een grote kuststad in het uiterste zuiden van Benin. Cotonou is de grootste en economisch meest belangrijke stad door de haven en luchthaven. Het klimaat in het zuiden is niet ideaal voor de kweek van spirulina (zie verder) maar de keuze om de proeven hier op te zetten kwam er hoofdzakelijk door de vlotte bereikbaarheid en toegang tot benodigd materiaal. Gedurende een week werd een opleiding gevolgd in een spirulina kwekerij in Pahou, een stadje op zo'n 20 km van Cotonou. Daarna werden de proeven opgezet op een ommuurd stuk privé eigendom van het bedrijf AML van David Amfreville, gelegen in het centrum van Cotonou vlakbij de kust (Figuur 17).

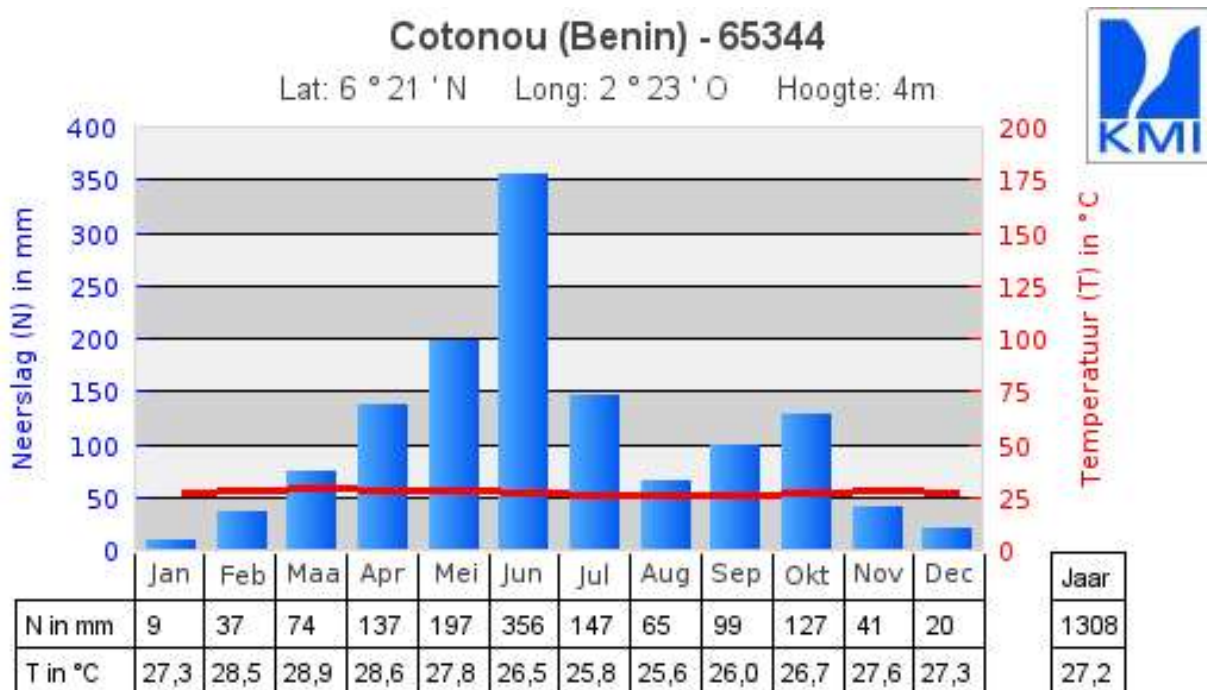


Figuur 17 Locatie van de uitgevoerde proeven

2.1.2 Klimatologisch

In het noorden is het klimaat tropisch met afwisselend een regen- en een droog seizoen (mei tot oktober). In het zuiden is het klimaat subequatoriaal, met twee regenseizoenen (maart tot juli en september tot oktober). In het centrum heerst een droger klimaat.

De gemiddelde jaarlijkse temperatuur is 27,5 °C en er valt gemiddeld jaarlijks 1059,4 mm regen. Tijdens het hoogtepunt van het regenseizoen (juli-september) valt er tussen de 200 en 300 mm per maand. In het zuiden van Benin is er echter wel een grote variatie van jaar tot jaar in de hoeveelheid en verdeling van de neerslag. Door klimaatveranderingen is er een toenemende variabiliteit in het regenseizoen waargenomen, gekenmerkt door een verkorting van het regenseizoen. In het binnenland van Benin is de neerslag afgenomen, terwijl in de kuststreek de neerslag is toegenomen (The World Bank Group, 2019). De verdeling van de neerslag en de gemiddelde temperatuur in Cotonou voor de periode 1961 – 1990 is voorgesteld in Figuur 18.



Figuur 18 Klimatogram van Cotonou met de klimatologische gemiddelden van 1961-1990.
<https://www.meteo.be/nl/klimaat/klimaat-in-de-wereld>

2.2 Experimenten Benin

2.2.1 Materiaal

2.2.1.1 Opstelling

Zes kleine bassins werden elk geconstrueerd uit een 1000 l vat dat doormidden gesneden werd. Deze werden op een horizontale lijn opgesteld zodat elk bassin evenveel en even lang zonlicht ontving (Figuur 19).

Twee grote betonnen bassins werden geconstrueerd op de manier die in verschillende bronnen aangegeven wordt. Er werd in de bassins ook een schoepenrad geplaatst dat zorgde voor een gelijkmatige stroming (Figuur 20).

Kleine tentjes konden boven de kleine bassins of in de grote bassins geplaatst worden en dienden als bescherming tegen regen en zorgden voor schaduw.



Figuur 19 Opstelling van de kleine bassins



Figuur 20 Opstelling van de twee grote bassins. Rechts gevuld met spirulina cultuur

2.2.1.2 Inhoud

Als startbron werd spirulina gebruikt verkregen uit de bassins in een kwekerij in Pahou (<https://www.gleauty.com/BJ/Pahou/1043220302422541/Spiruline-B%C3%A9nin>).

Voor het voorzien van de nutriënten werden twee verschillende NPK meststoffen gebruikt. De samenstelling van beide is weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 9).

Ook werd in bepaalde proeven zout en/of bicarbonaat toegevoegd.

Tabel 9 Samenstelling gebruikte NPK meststoffen

NPK Meststof 1 (%) 20-20-20		NPK Meststof 2 (%) 20-20-20	
N (totaal)	20	N (totaal)	20
		N-NH ₄	4
		N-NO ₃	5.6
		N-ureum	10.4
P ₂ O ₅	20	P ₂ O ₅	20
K ₂ O	20	K ₂ O	20
Fe-EDTA	0.02	Fe	0.07
Mn-EDTA	0.02	Mn	0.03
Cu-EDTA	0.02	Cu	0.05
Zn-EDTA	0.02	Zn	0.01
Mo	0.0006	B	0.02

2.2.1.3 Metingen

Voor de verschillende metingen werd van volgende materialen gebruik gemaakt:

- Een roerstok (bezemsteel): telkens een andere stok voor een andere samenstelling.
- Disque de Secchi / Secchi schijf : een meetlat van 40 cm met onderaan een schijfje in wit plastic met diameter 4 cm. Dit is een hulpmiddel om de concentratie spirulina aanwezig in de oplossing op een eenvoudige wijze te scoren. De meetlat wordt ondergedompeld in de cultuur en er in gebracht tot de witte schijf net niet meer te zien is, het afgelezen aantal centimeter op de lat geeft dan een score van de concentratie weer. De 0 van de meetlat ligt bij de witte schijf, bijgevolg geeft een lagere score een hoger concentratie spirulina weer. Het aflezen gebeurt telkens door dezelfde persoon en deze kijkt loodrecht op de meetlat.
- Aquariummeter: meten van pH en temperatuur. Deze wordt vastgemaakt op een kleine houten constructie die voor het meten met de lange zijde op de bodem van het bassin geplaatst wordt. Op die manier bevinden de sensoren zich tijdens het meten telkens op een gelijke hoogte boven de bodem.



Figuur 21 Aquarium meter en secchi disque

2.2.2 Proefopzet

2.2.2.1 Proef 1

De eerste proef was een testfase om de optimale omstandigheden uit te testen. In de proef werd geprobeerd om met de nutriënten beschikbaar op de lokale markt een staal spirulina, verkregen uit de kwekerij in Pahou, verder op te kweken en te vermeerderen. Vier kleine bassins (zie 2.2.1.1) werden gevuld met 20 cm water, 1 kg NPK meststof en spirulina tot met de secchi schijf een waarde van 6 bereikt werd. Voor bassin 1, 3 en 4 werd NPK meststof 1 gebruikt, voor bassin 2 NPK meststof 2.

Gedurende de dagen volgend op de opstart werd dagelijks elke drie uur (om 9u, 12u, 15u en 18u) de temperatuur, de pH en de secchi (dus de concentratie spirulina) gemeten. Om een stroming te voorzien in de cultuur werd met de hand minstens elk uur geroerd met een bezemsteel.

2.2.2.2 Proef 2

Vanaf deze proef werd een standaard opstart stappenplan uitgewerkt om de uniformiteit te waarborgen. De volledige uitwerking van deze procedure is te vinden in bijlage 1.

In deze proef werden de vier bassins opnieuw opgezet en werd stikstof als limiterend nutriënt beschouwd, de hoeveelheid toegevoegde NPK werd hierop afgestemd. Aan de hand van inhoud van de NPK meststoffen (zie 2.2.1.2) werd geconcludeerd dat, om zeker geen overschot te hebben en de negatieve effecten van een teveel aan N te vermijden, er best 200g NPK meststof 1 zou worden toegevoegd. Verder werd ook in elk bassin 5 g/l zout toegevoegd dat vooraf opgelost werd in een weinig water.

Tijdens deze fase van de proef was het heel warm weer met felle zon. De bassins werden niet in de rechtstreekse zon geplaatst om foto-inhibitie te vermijden, ze stonden altijd onder de bescherming van tentjes. Als de temperatuur van de cultuur te laag werd, werden de tentjes op bepaalde momenten weggehaald. Het roeren werd op die momenten intensiever en gebeurde iedere 10 minuten. Temperatuur, pH en concentratie werden opnieuw elke drie uur gemeten.

Na vier dagen werd naast de reeds toegevoegde NPK en het zout ook 80 g bicarbonaat toegevoegd aan bassin 1 en 2. Aan bassin 3 en 4 werd geen bicarbonaat toegevoegd, deze werden als controle beschouwd.

2.2.2.3 Proef 3

De vier bassins uit proef 2 werden terug uniform gemaakt door menging (zelfde inhoud in elk bassin) en vervolgens vermeerderd tot zes bassins volgens de methode in het stappenplan in bijlage 2.

Vervolgens werd er een proef met de gefractioneerde toevoeging van bicarbonaat op uitgevoerd. Bassin 1 en 4 worden als controle gehouden. In bassin 3 en 5 wordt 90 g bicarbonaat in één keer toegevoegd. In bassin 2 en 6 wordt 90 g bicarbonaat gefractioneerd toegevoegd in drie keer: gedurende drie opeenvolgende dagen 30 g.

2.2.2.4 Proef 4

In deze proef werden bassins 1, 2, 3, 5 en 6 (uit proef 3) overgebracht in het grote betonnen bassin. Bassin 4 werd gespaard en stap voor stap opnieuw vermeerderd zodat er een reserve opgebouwd werd. De proef in het grote bassin was vooral een test of de gebruikte methode en concentraties meststoffen, gebruikt in de eerste proeven met de kleine bassins, ook werkten op grotere schaal.

- Groot bassin

Als eerste stap werd een meetlat gemaakt om het volume water in te schatten. Daarvoor werd het bassin gevuld met telkens 1000 l en een streepje geplaatst op de meetlat. Het water werd daarna terug uit het bassin verwijderd. Het inschatten van de hoeveelheid water, wanneer de echte proef begint en er dus spirulina in aanwezig is, is belangrijk om bij verdamping of een regenbui respectievelijk water of nutriënten te kunnen toevoegen. De hoogte moet daarenboven ook hoog genoeg zijn om door het schoepenrad een continue stroming te verkrijgen.

Er worden vijf bassins van elk ongeveer 200 liter (proef 3) overgebracht in het bassin, aangevuld met drie keer een 1000 l vat met puur water. Dit leidde tot een diepte van 11 centimeter en een concentratie secchi groter dan 11.

Vervolgens werd er 4 kg NPK meststof 1 toegevoegd, 16 kg zout en 533.3 g bicarbonaat.

In het bassin werden een aantal tentjes geplaatst zodat er ook schaduwzones aanwezig zijn. Door de stroming is de spirulina echter nooit continu in de schaduw en is er dus een goede afwisseling tussen zon en schaduw. Wanneer er te veel regen valt wordt een deel van het water overgepompt naar het tweede bassin en wordt het waterniveau op een constant niveau gehouden.

- Verdere vermeerdering – back up klein bassin

Nadat de vijf andere bassins waren overgebracht naar het grote bassin werd bassin 4 stapsgewijs vermeerderd.

In een eerste stap wordt van één bassin naar twee bassins gegaan als volgt:

- Toevoegen 200 l water + 200 g NPK meststof 1 + 1 kg zout
- Alles goed mengen
- 200 l overbrengen naar een tweede bassin.

In een tweede stap wordt van twee bassins naar vier bassins gegaan als volgt:

- 200 l water + 200 g NPK meststof 1 + 1 kg zout toevoegen in bassin 1
- 200 l water + 200 g NPK meststof 1 + 1 kg zout toevoegen in bassin 2
- 100 l van bassin 1 overbrengen naar bassin 3
- 100 l van bassin 2 overbrengen naar bassin 3
- 100 l van bassin 1 overbrengen naar bassin 4
- 100 l van bassin 2 overbrengen naar bassin 4.

Ten slotte wordt van vier bassins naar zes bassins gegaan volgens het stappenplan in bijlage 2.

- Oogst

Als laatste stap werd een eerste oogst (Figuur 22) uitgevoerd op 400 l water en werd een stappenplan opgesteld: zie bijlage 3.

Het gedroogde staal werd vervolgens geanalyseerd en vergeleken met andere stalen (zie 2.3).



Figuur 22 Links zeven gebruikt voor de oogst. Rechts uitgewrongen verzamelde spirulina

2.3 Nutritionele analyse

In het Ugent Laboratorium Chemische Analyse (campus Schoonmeersen in Gent) werd een aantal verkregen spirulina stalen geanalyseerd en werd de samenstelling bepaald. Drie verschillende stalen werden geanalyseerd.

2.3.1 Geanalyseerde stalen

- Een staal gedroogde spirulina geoogst uit het groot bassin (proef 4)
- Een staal verwerkte gedroogde spirulina afkomstig uit de kwekerij in Pahou (aangekocht)
- Een staal gekocht in een lokale apotheek import vanuit Amerika (aangekocht)

2.3.2 Methoden analyses

De gemeten chemische parameters en gebruikte methoden zijn weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10 analysemethoden samenstelling spirulina

Ruw Vet	Rechtstreekse analyse	ISO 6492 (A)
Ruw eiwit	Analyse met Dumas methode	ISO 16634-1
Aminozuren	voorbereiding conform EEG 152/2009	Bepaling via HPLC OPA/FMOC - Pré-column derivatisatie
Calcium	Analyse via LCA methode	Meting met ICP-AES: ISO 11885
IJzer	Analyse via LCA methode	Meting met ICP-AES: ISO 11885
Kalium	Analyse via LCA methode	Meting met ICP-AES: ISO 11885
Magnesium	Analyse via LCA methode	Meting met ICP-AES: ISO 11885
Natrium	Analyse via LCA methode	Meting met ICP-AES: ISO 11885
Fosfor	Analyse via LCA methode	Meting met ICP-AES: ISO 11885
Zink	Analyse via LCA methode	Meting met ICP-AES: ISO 11885

3 Resultaten

3.1 Proeven Benin

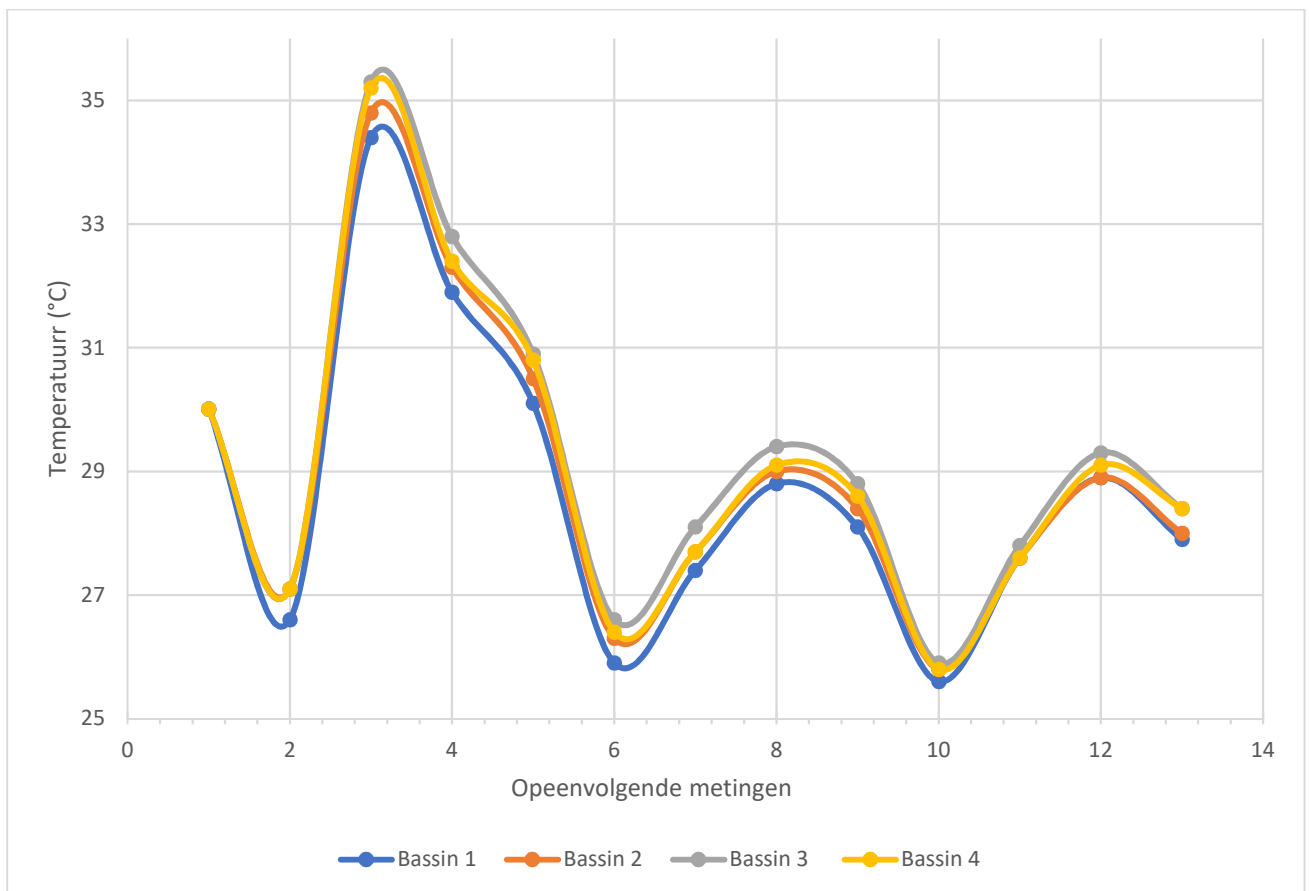
3.1.1 Proef 1

- Algemene waarnemingen

Bij de opstart van de bassins werd een licht ammoniakale geur waargenomen. Op de avond van dag 1 (5^{de} meting) vertoonden bassin 1 en 3 een geel/bruine kleur en hadden deze een rottende geur. De spirulina cultuur in bassin 2 vertoonde in vergelijking met de andere bassins een behoorlijk groene schijn. Over het algemeen wordt bij Bassin 4 meer schuimvorming waargenomen dan in de andere bassins. Tijdens de laatste metingen van de proef drijven op bassin 4 bruinkleurige algen boven en zijn er ook veel vliegjes aanwezig.

- Temperatuur

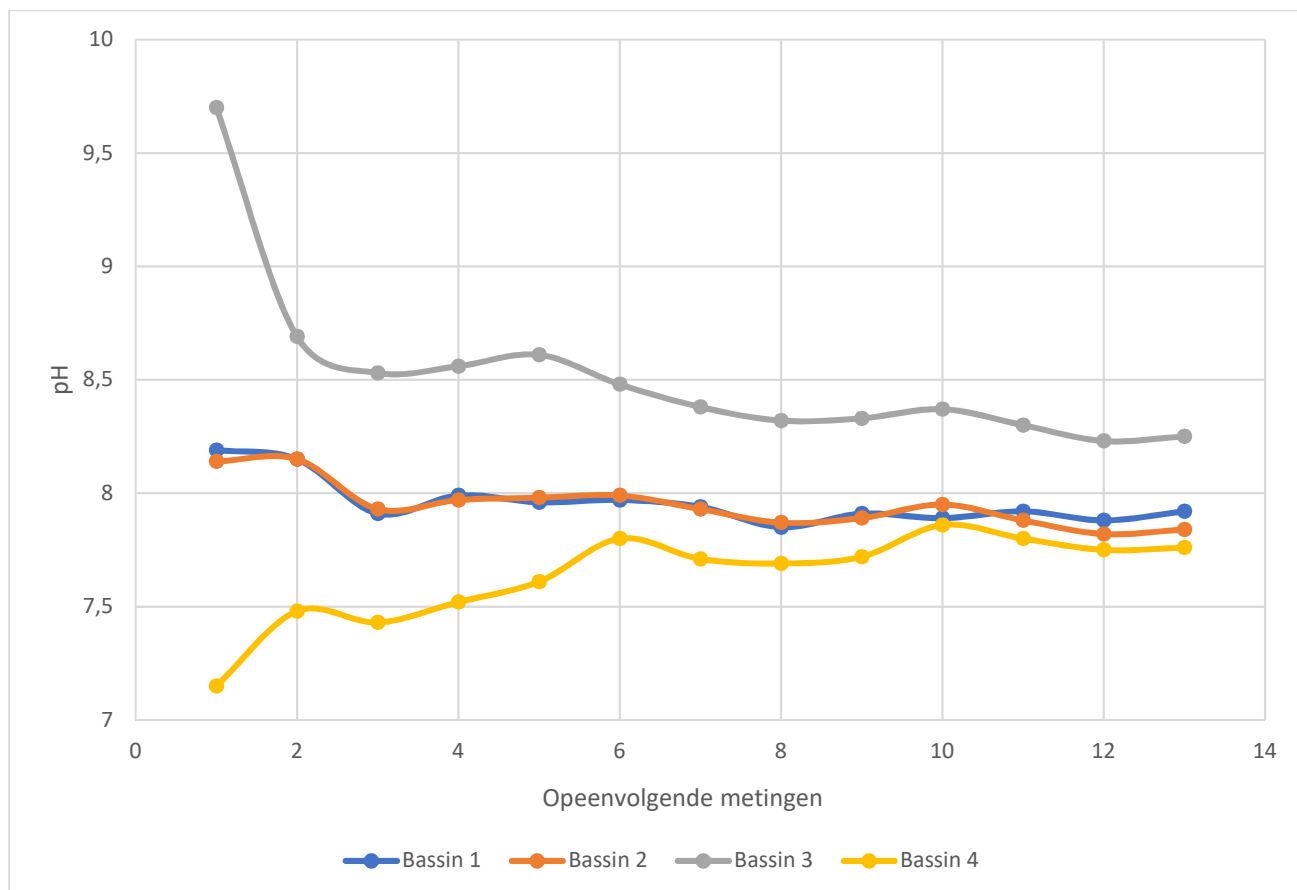
Het verloop van de temperatuur is voorgesteld in Figuur 23. De temperatuur daalt telkens sterk 's nachts. De eerste dag (meting 3) wordt een hoge temperatuur van ongeveer 35 °C gehaald. Na de tweede nacht (meting 7-8) stijgt de temperatuur niet meer zo sterk als de eerste dag. Vanaf dan blijft de temperatuur gedurende de proef overdag schommelen rond 29 °C en zakt deze 's avonds en 's morgens tot 26 °C.



Figuur 23 Temperatuurverloop in de vier bassins gedurende proef 1. De temperatuur werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 2 de tweede meting, 4 de vierde meting enz.

- pH

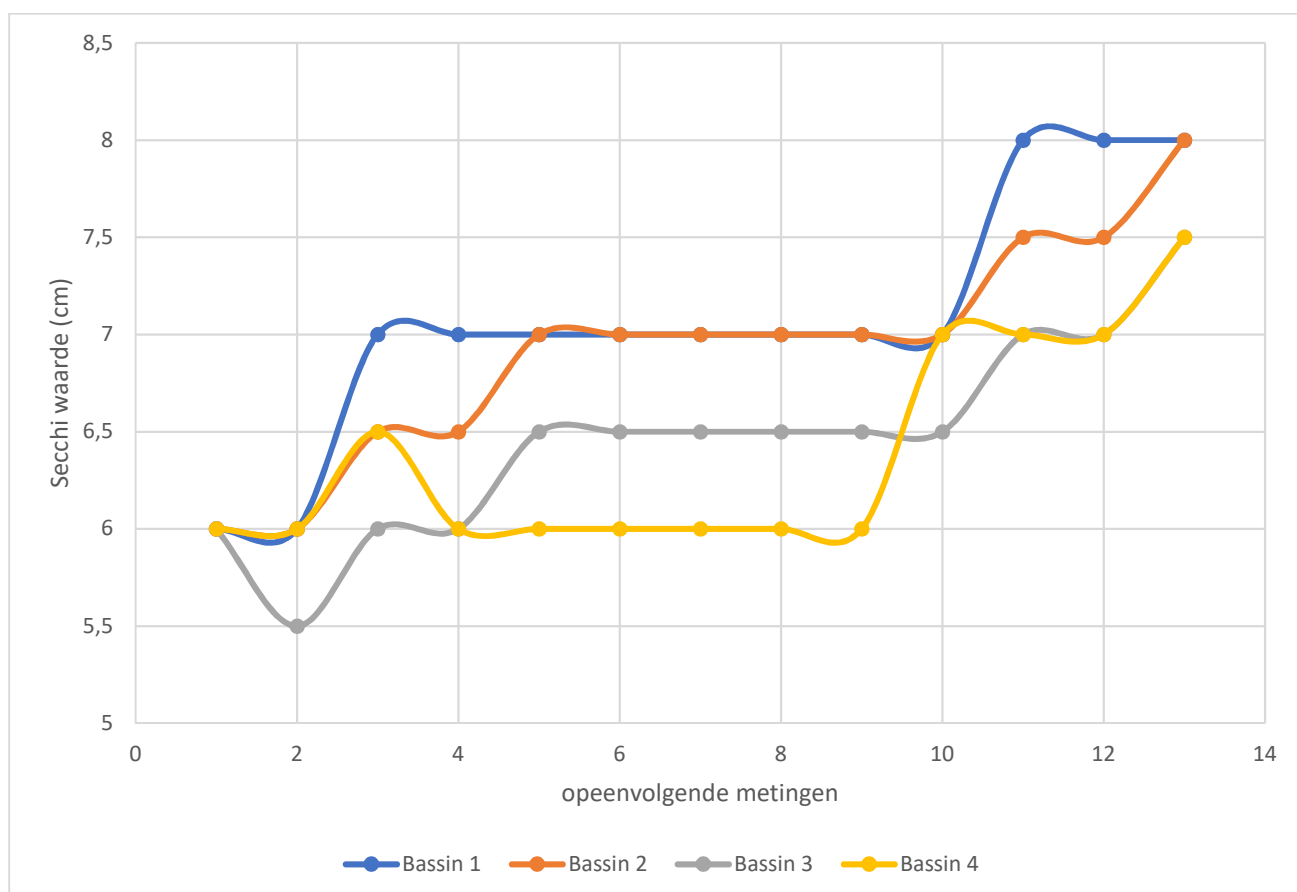
De beginwaarde van de pH van bassin 4 (7,15) is opmerkelijk lager dan van de andere bassins, terwijl de beginwaarde van bassin 3 (9,7) opmerkelijk hoger is. Tijdens de eerste uren en nacht daalt de pH waarde van bassin 1 en 2 ongeveer een halve eenheid waarna deze voor de rest van de proef ongeveer constant blijft. Ook de pH van bassin 3 daalt geleidelijk maar blijft gedurende de volledige proef hoger dan de pH van de andere bassins. De pH van bassin 4 stijgt gedurende de hele proef, na 10 metingen wordt het pH niveau van bassin 1 en 2 bereikt (7,8) (Figuur 24).



Figuur 24 pH verloop in de vier bassins gedurende proef 1. De pH werd gemeten op welbepaalde tijdstippen waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 2 de tweede meting, 4 de vierde meting enz.

- Concentratie

Een toename in de secchi waarde weerspiegelt een daling in de spirulina concentratie. Na de eerste nacht (meting 2) stijgt de secchi waarde een halve tot een volledige eenheid waarna deze een periode constant blijft. Na het constant blijven van de concentratie treedt er opnieuw een grote stijging in secchi waarde op (Figuur 25). Gelijktijdig met de secchi stijging, dus concentratie daling, komt er een rottende geur vrij uit alle vier de bassins.



Figuur 25 Het verloop van de secchi waarde in de vier bassins gedurende proef 1. De Secchi waarde is omgekeerd evenredig met de concentratie. Een stijging in de grafiek duidt m.a.w. een daling in de concentratie aan. De waarde wordt op welbepaalde momenten gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 2 de tweede meting, 4 de vierde meting enz.

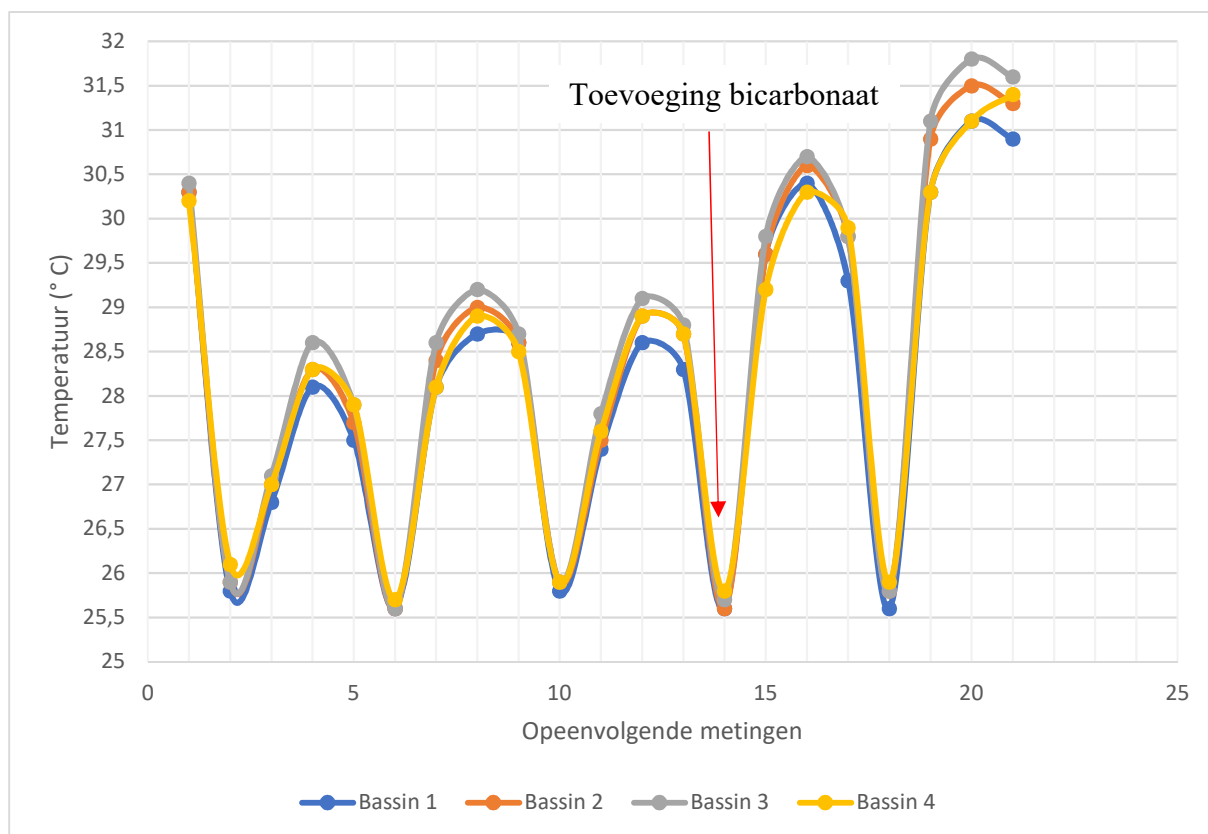
3.1.2 Proef 2

- Algemene waarnemingen

Er wordt tijdens het verloop van proef 2 geen ammoniakale of rottende geur waargenomen. Wel drijven er vlokken spirulina boven en vormt de spirulina massa aan het oppervlak een soort wolk, bij aanraking van die wolk trekt de spirulina cultuur samen. Het toegevoegde bicarbonaat lost moeilijk op, blijft wat drijven en vormt een schuim. Door de bloem aanwezig in de bicarbonaat bindt de spirulina hiermee en worden grote spirulina vlokken/schilfers gevormd.

- **Temperatuur**

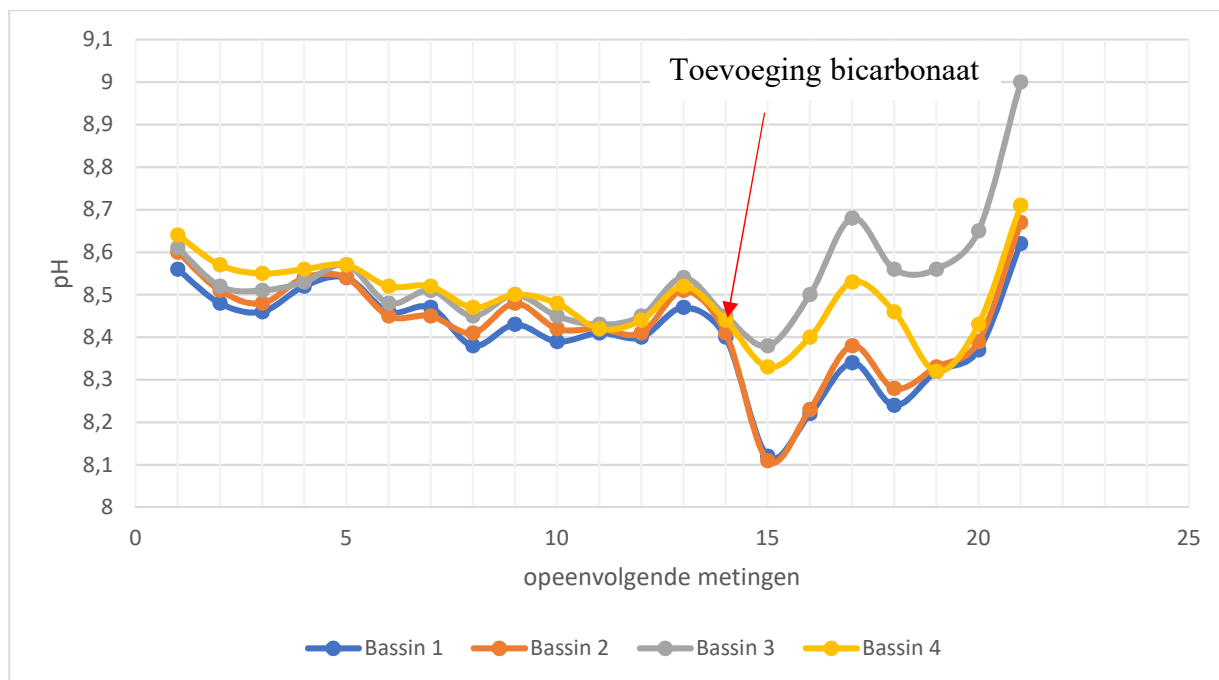
De temperatuur vertoont een duidelijk patroon van afkoeling tijdens de nachten en opwarming overdag met de hoogste temperatuur gemeten iedere dag om 15 u (meting 4, 8, 12,... Figuur 26). De temperatuur van de vier bassins vertoont het zelfde patroon met dezelfde waarden, waarbij bassin 3 op de warmste momenten wel telkens de hoogste temperatuur vertoont en bassin 1 de laagste temperatuur. Na de toevoeging van bicarbonaat worden hogere temperaturen waargenomen overdag, de pieken worden met andere woorden hoger maar de dalen blijven gelijk aan deze voor de bicarbonaat toevoeging.



Figuur 26 Temperatuurverloop in de vier bassins gedurende proef 2. De temperatuur werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 5 de vijfde meting, 10 de tiende meting enz. Bij de 14^{de} meting wordt er bicarbonaat toegevoegd aan de cultuur.

- pH

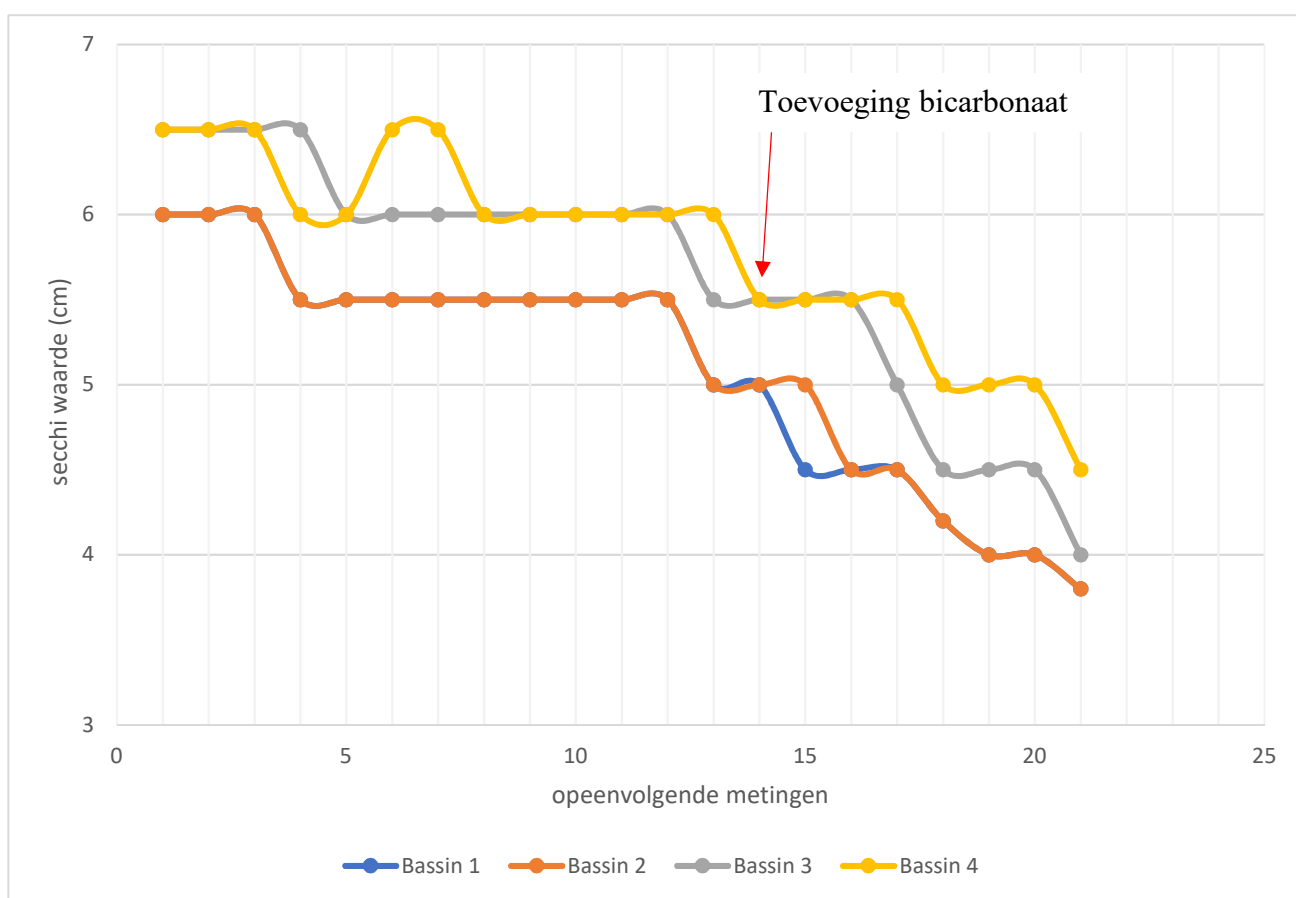
De startwaarde van de pH is bij alle bassins ongeveer gelijk en ook gedurende de eerste 14 metingen blijven de bassins in een gelijke pH-range. Na het toevoegen van bicarbonaat wordt in bassin 1 en 2 een pH-daling waargenomen. Na 3 metingen herstelt de pH zich echter en wordt in bassin 1 en 2 terug het niveau van bassin 4 bereikt. Bassin 3 blijft na de 14^{de} meting wel een hogere pH-waarde bezitten dan de andere bassins. Na de 19^{de} meting is er een zeer sterke pH-stijging (Figuur 27).



Figuur 27 pH-verloop in de vier bassins gedurende proef 2. De pH werd gemeten op welbepaalde tijdstippen waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 5 de vijfde meting, 10 de tiende meting enz. Bij de 14^{de} meting wordt er bicarbonaat toegevoegd aan de cultuur.

- Concentratie

Bassin 1 en 2 volgen tot de toevoeging van bicarbonaat hetzelfde concentratiepatroon, de secchi-waarde is een halve eenheid lager dan bassin 3 en 4 (Figuur 28). Tot dan blijft de concentratie min of meer constant, na de toevoeging wordt in alle vier de bassins een sterke daling in secchi-waarde en dus stijging in concentratie waargenomen. De concentratie in bassin 3 stijgt sneller en meer dan in bassin 4. De concentratiestijging wordt ook duidelijk uit de waarnemingen. Vanaf de 14^{de} meting blijft er spirulina kleven aan de wanden van de bassins, de cultuur heeft het uitzicht van groene verf. Vanaf meting 18 wordt, wanneer het roeren even gestaakt wordt, een dikke laag spirulina drijvend aan het oppervlak waargenomen.

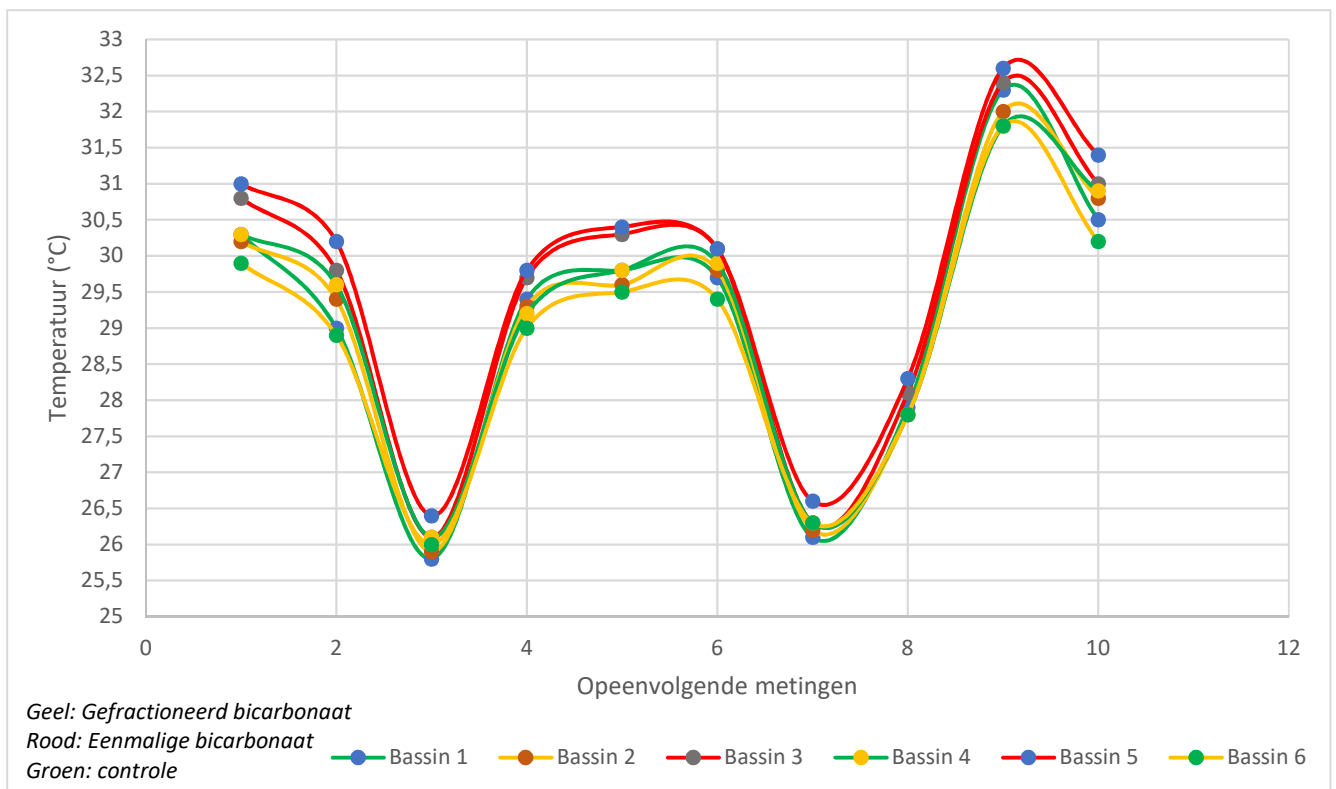


Figuur 28 Het verloop van de secchi waarde in de vier bassins gedurende proef 2. De Secchi waarde is omgekeerd evenredig met de concentratie. Een stijging in de grafiek duidt m.a.w. een daling in de concentratie aan. De waarde wordt op welbepaalde momenten gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 2 de tweede meting, 4 de vierde meting enz. Bij de 14^{de} meting wordt er bicarbonaat toegevoegd aan de cultuur.

3.1.3 Proef 3

- Temperatuur

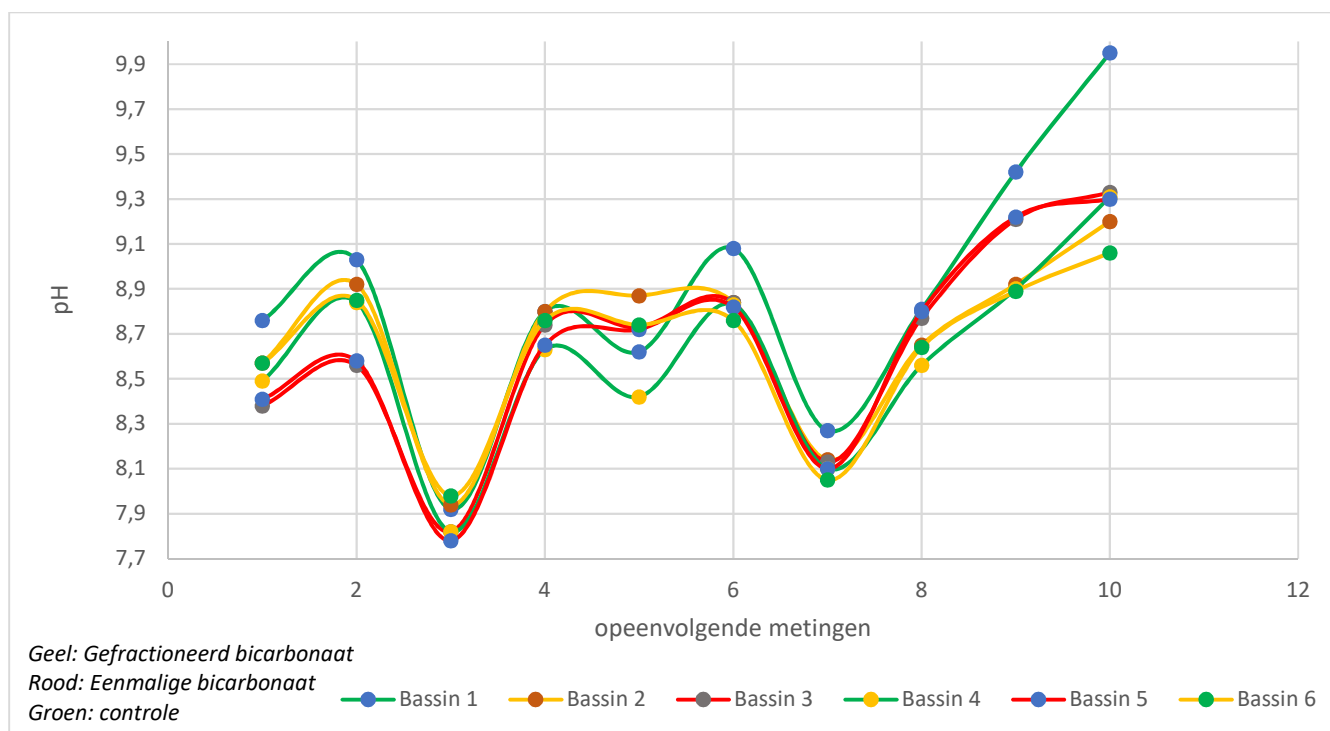
De starttemperatuur is voor de bassins met een gelijke behandeling ongeveer gelijk. Tijdens het verloop van de proef wordt in de bassins een gelijk patroon in het temperatuurverloop gezien. Daarbij hebben bassin 3 en 5 wel telkens een iets hogere temperatuur dan de andere bassins. De dalen representeren opnieuw de metingen 's morgens terwijl de pieken de temperaturen 's middags gemeten weergeven. De temperatuur overdag neemt waarden aan tussen de 29,5 en 32 °C, terwijl 's morgens de temperatuur schommelt tussen de 26 en 27 °C (Figuur 29).



Figuur 29 Temperatuurverloop in de zes bassins gedurende proef 3. Twee verschillende behandelingen worden vergeleken: gefractioneerde toevoeging van bicarbonaat en eenmalige toevoeging van bicarbonaat. De temperatuur werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 2 de tweede meting, 4 de vierde meting enz.

- pH

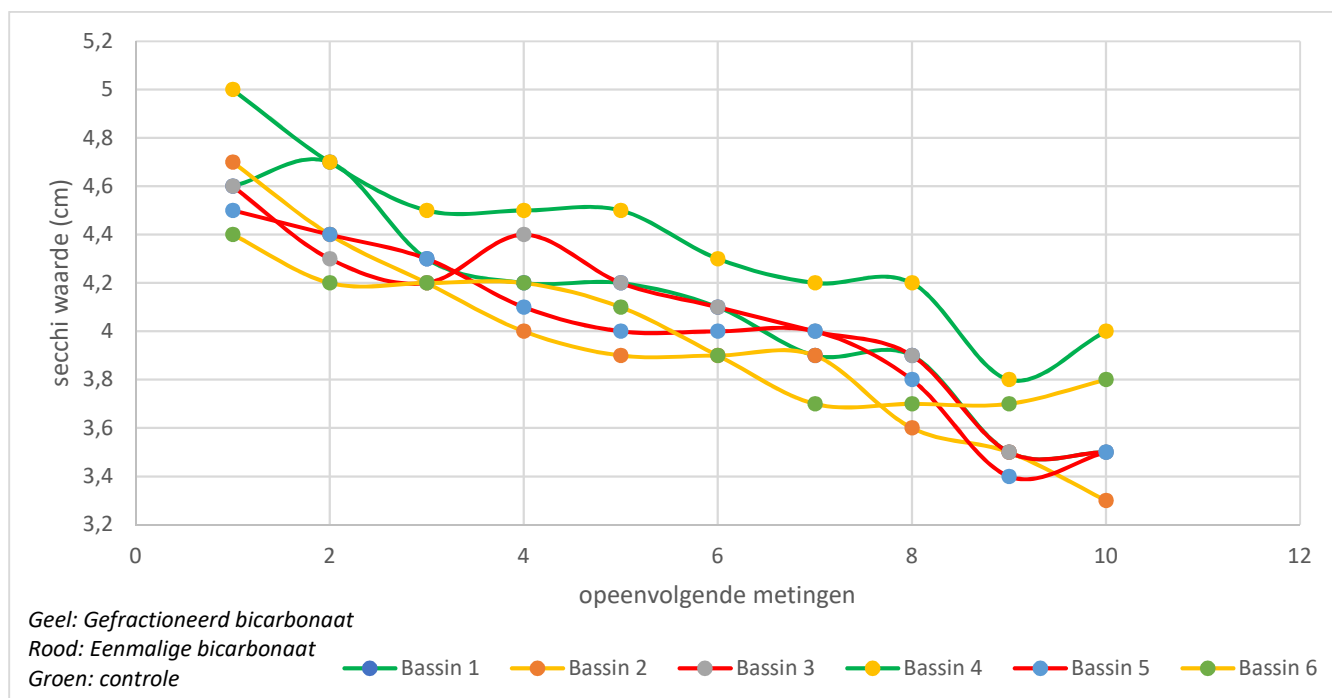
Het pH-verloop vertoont een gelijkaardig patroon met dat van de temperatuur, namelijk een daling bij de metingen 's morgens en pieken bij de metingen 's middags. De pH van controle bassin 1 is op het einde van de proef een stuk hoger dan de pH van de andere bassins. De pH van bassin 3 en 5 (eenmalige toediening van bicarbonaat bij begin van proef) is in het begin van de proef lager dan de pH van de andere bassins maar herstelt na de 5^{de} meting. De pH-waarden van de gefractioneerde behandeling en de controle lopen behoorlijk gelijk (Figuur 30).



Figuur 30 pH verloop in de zes bassins gedurende proef 3. Twee verschillende behandelingen worden vergeleken: gefractioneerde toevoeging van bicarbonaat en eenmalige toevoeging van bicarbonaat. De pH werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 2 de tweede meting, 4 de vierde meting enz.

- Concentratie

Uit de grafiek (Figuur 31) valt af te leiden dat er in elk bassin een daling van secchi-waarde en dus een concentratiestijging optreedt gedurende de proef. Bassin 4 heeft de hoogste beginwaarde na starten van de verschillende behandelingen. Afgezien van de waarde van bassin 4 die gedurende de hele proef hoger blijft dan die van de andere waarden is er geen groot verschil tussen de bassins merkbaar. De concentratie van bassin 3 en 5 (eenmalige toevoeging) lopen gelijk met de waardes van bassin 1, terwijl de concentratie in bassin 2 en 6 tussen meting 2 en 8 wel de hoogste is.



Figuur 31 Het verloop van de secchi-waarde in de zes bassins gedurende proef 3. De Secchi-waarde is omgekeerd evenredig met de concentratie. Een stijging in de grafiek duidt m.a.w. een daling in de concentratie aan. Twee verschillende behandelingen worden vergeleken: gefractioneerde toevoeging van bicarbonaat (geel) en eenmalige toevoeging van bicarbonaat (rood). De secchi-waarde werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 2 de tweede meting, 4 de vierde meting enz.

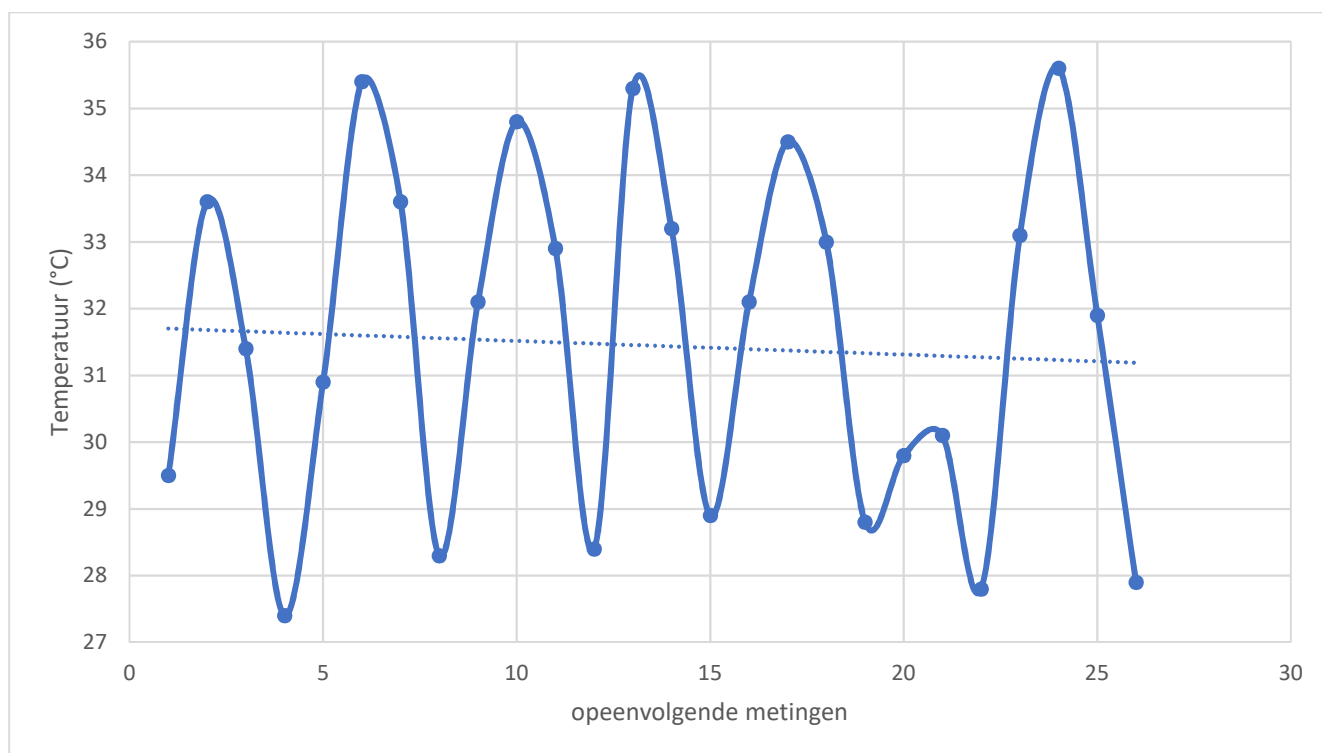
3.1.4 Proef 4

- Algemene waarnemingen

Bij het begin van proef 4 vertoont de cultuur een gele kleur met dwarrelende vlokken. Bij het vorderen van de proef wordt geleidelijk aan een meer groene kleur verkregen, vooral na een aantal dagen zonlicht afgewisseld met wolken.

- **Temperatuur**

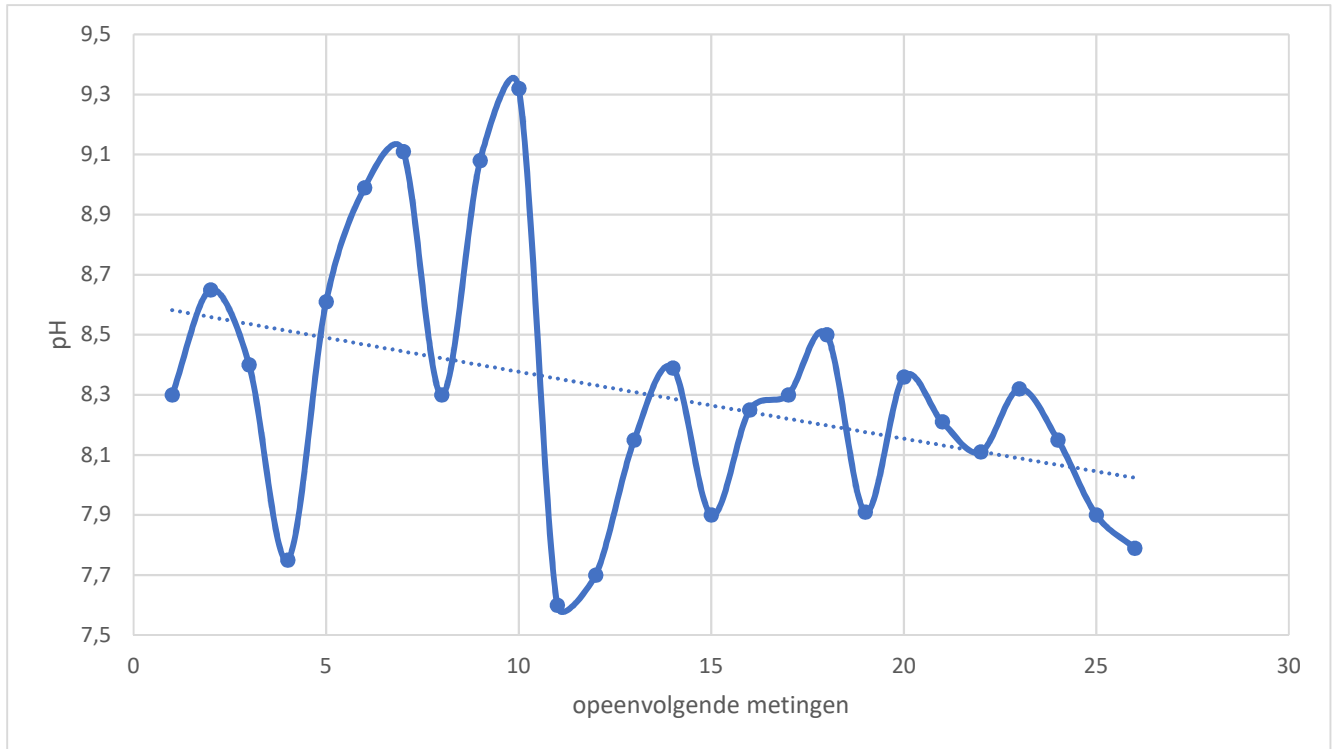
Het temperatuurverloop toont net als in de andere proeven duidelijke schommelingen tussen de temperatuur ‘s morgens gemeten en ‘s middags gemeten respectievelijk de dalen en de pieken. Uit de trendlijn kan afgeleid worden dat de temperatuur over het verloop van de proef gemiddeld nagenoeg constant blijft tussen de 31 en 32 °C hoewel de trendlijn toch ook een lichte daling vertoont, waarschijnlijk te wijten aan de lage waarden bij de 20^{ste} en 21^{ste} meting (Figuur 32).



Figuur 32 Temperatuurverloop in het bassin gedurende proef 4. De temperatuur werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 5 de vijfde meting, 10 de tiende meting enz. De stippellijn geeft de trendlijn weer die het gemiddelde verloop schetst.

- pH

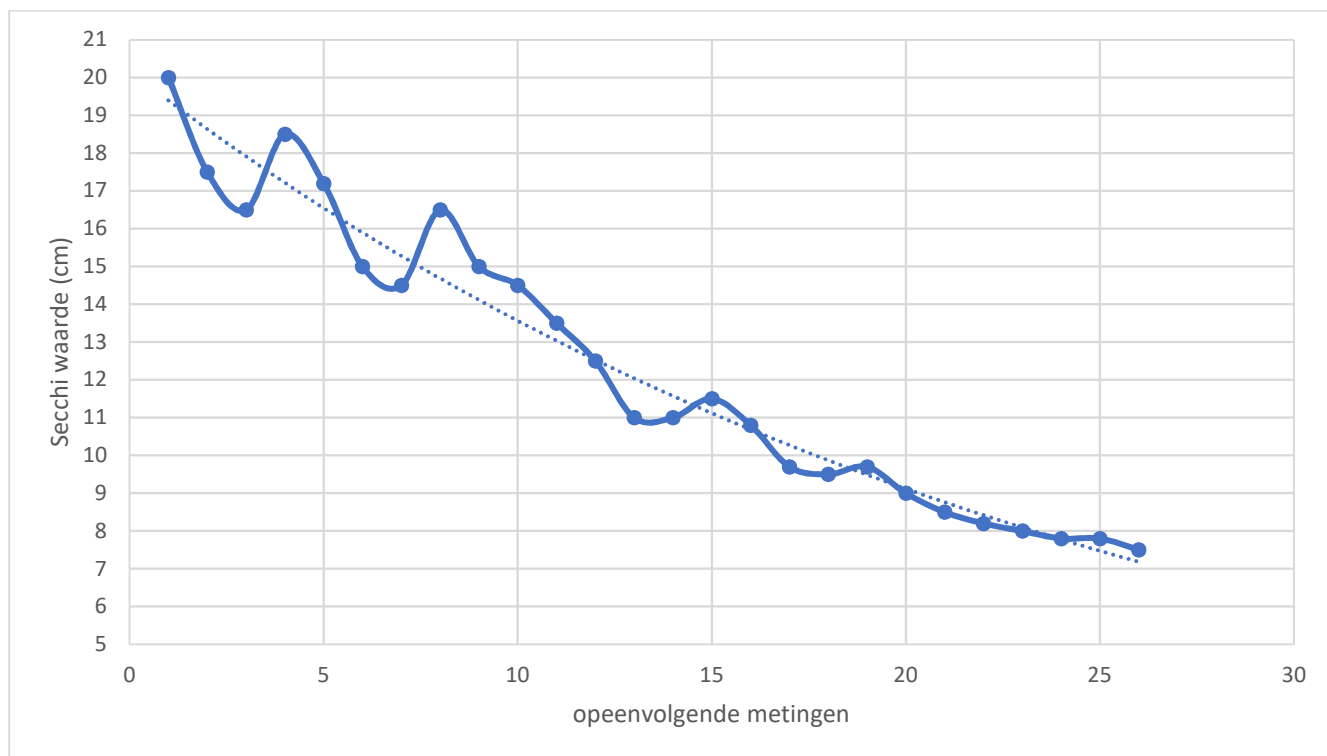
De pH waarden tijdens de proef zijn behoorlijk onregelmatig maar de laagste waarden worden telkens 's morgens gemeten. Uit de trendlijn blijkt een lichte daling van de pH (Figuur 33).



Figuur 33 pH-verloop in het bassin gedurende proef 4. De pH werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 5 de vijfde meting, 10 de tiende meting enz. De stippellijn geeft de trendlijn weer die het gemiddelde verloop schetst.

- Concentratie

De startwaarde is een hele hoge secchi-waarde wat een zeer lage concentratie spirulina aangeeft. Over het verloop van de proef is een duidelijke daling in secchi-waarde te zien (trendlijn) (Figuur 34). De eerste dagen is er 's morgens telkens een hogere secchi-waarde gemeten wat dus een lagere concentratie aangeeft. Naarmate de concentratie meer daalt krijgt de cultuur ook een fellere groene kleur en worden drijvende vlokjes spirulina zichtbaar.



Figuur 34 Het verloop van de secchi-waarde in het bassins gedurende proef 4. De Secchi-waarde is omgekeerd evenredig met de concentratie een stijging in de grafiek duidt m.a.w. een daling in de concentratie aan. De waarde werd op welbepaalde tijdstippen gemeten waarbij 0 de start van de proef aanduidt, 5 de vijfde meting, 10 de tiende meting enz. De stippellijn geeft de trendlijn weer die het gemiddelde verloop schetst.

- Oogst

Bij het uitvoeren van de eerste oogst werden een aantal waarnemingen gedaan. De geoogste spirulina was donkergroen van kleur en nog niet heel erg plakkerig. Bij het zondrogen werd een groen/blauwe kleur waargenomen, vooral van de zones rechtstreeks blootgesteld aan het zonlicht.

3.2 Resultaten nutritionele analyse

De analyse resultaten van de spirulina monsters zijn weergegeven in Tabel 11. De belangrijkste bevindingen uit de analyse zijn dat het ruw eiwitgehalte (weergegeven als N gemeten * 6.25) van het geogste staal in lijn ligt met de eiwitgehaltenes van de aangekochte stalen. Ook de aminozuur samenstelling komt overeen. De calciumwaarde van het geogste staal is vier tot zeven maal hoger dan de waarde van de aangekochte stalen. Daarnaast is ook het fosfor gehalte van het geogste staal meer dan het dubbele dan bij de aangekochte stalen. Opmerkelijk is ook het natrium gehalte in het staal uit Pahou, de waarde is in dit staal zo'n 3.5-4.5 keer hoger dan het natriumgehalte in de andere stalen.

Tabel 11 Resultaten van de nutritionele analyse van de spirulina monsters

	Staal Pahou <i>etiket</i>	Staal Pahou <i>analyse</i>	Staal Amerika <i>analyse</i>	Eigen staal <i>analyse</i>
Ruw vet (%)		1,32 ± 0, 2	0,509 ± 0, 2	< 0,5 ± 0,2
Ruw eiwit (mg/kg)		10,4 ± 0,2	10,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2
Ca (mg/kg)	1.200	1.640	918	7.250
Fe (mg/kg)	1.100	765	918	515
K (mg/kg)		17.500	12.000	14.800
Mg (mg/kg)	2.500	2.760	2.970	4.660
Na (mg/kg)		19.300	3.730	5.300
P (mg/kg)	8.000	8.500	9.280	21.000
Zn (mg/kg)	19	18,8	30,3	46,5
Asparaginezuur (g/kg)		26,13	29,6	24,66
Glutaminezuur (g/kg)		29,99	34,87	25,92
Serine (g/kg)		11,98	13,07	9,38
Histidine (g/kg)		5,61	5,76	4,53
Glycine (g/kg)		12,94	14,47	11,33
Theorine (g/kg)		10,14	11,23	8,41
Arginine (g/kg)		19,19	23,4	20,51
Alanine (g/kg)		18,65	21,31	14,07
Tyrosine (g/kg)		9,93	11,09	7,51
Valine (g/kg)		16,02	18,61	13,74
Fenylalanine (g/kg)		11,94	13,89	9,52
Isoleucine (g/kg)		14,91	17,36	12,26
Leucine (g/kg)		23,83	27,06	19,08
Lysine (g/kg)		11,54	12,86	9,7

4 Discussie

4.1 Proeven Benin

4.1.1 Proef 1

In de eerste plaats was de proef niet uniform, de watergehalten werden op hoogte afgestemd terwijl de bassins niet allemaal exact dezelfde afmetingen hadden, bijgevolg waren de volumes water en dus ook de concentraties niet gelijk. Als bassin 3 in die omstandigheden een groter volume water heeft met dezelfde hoeveelheid toegevoegde NPK kan dit de hogere pH van bassin 3 gedurende de proef verklaren.

Op het einde van proef 1 wordt een rottingsgeur waargenomen, kleuren de bassins bruin en is er een duidelijke concentratiedaling. Dit wijst op een afsterving van de spirulina. Hoogstwaarschijnlijk is een te hoog gehalte stikstof de oorzaak. Uit de literatuur blijkt dat ureum toxische effecten kan veroorzaken wanneer de concentratie hoger wordt dan 1,5 g/l (Vieira Costa et al., 2003). Aangezien een grote hoeveelheid NPK toegevoegd werd in proef 1 en stikstof bij die berekeningen niet als limiterend element werd gebruikt is het zeer waarschijnlijk dat die toxiciteit leidde tot het afsterven van de spirulina. Daarbij komt dat de eerste dag de bassins in de volle zon geplaatst werden zonder bescherming van de tentjes, wat ook de hoge temperatuurwaarden van die metingen verklaart. Een tweede oorzaak van de afsterving zou dus ook het fenomeen van foto-inhibitie kunnen zijn door een te felle zon, waarbij de fotosynthetische capaciteit van de spirulina wegvalt en deze dus uiteindelijk afsterft (Vonshak, 2002) (Sili et al., 2012).

4.1.2 Proef 2

Vanaf proef 2 wordt de uniformiteit meer gewaarborgd en wordt gewerkt met volumes water in plaats van de hoogte van het water. Een opmerking daarbij is echter dat de wanden boven de waterkolommen niet bij elke bassin even hoog zijn. Dit kan zorgen voor een verschil in het bieden van extra bescherming tegen de zon. De wanden van bassin 4 zijn het hoogst, maar dit effect is niet terug te vinden in de resultaten.

De vlokken die waargenomen worden in de bassins kunnen te wijten zijn aan enerzijds de toevoeging van het bloemig bicarbonaat wat zorgt voor een samenklontering van de spirulina en anderzijds door EPS (exopolysacharide). EPS treedt op bij een pH lager dan 10, wat hier duidelijk het geval is (Jourdan, 2001).

De toevoeging van bicarbonaat blijkt weinig invloed te hebben op de concentratie. Na de toevoeging is er wel een stijging van de temperatuur en een verandering in pH. De vraag is echter of de veranderingen het gevolg zijn van warmere dagen volgend op de toevoeging of effectief het gevolg zijn van de bicarbonaat.

4.1.3 Proef 3

De invloed van de gefractioneerde toediening van het bicarbonaat is gering. Bij zowel het pH- als het temperatuur verloop is er nauwelijks een verschil merkbaar tussen de gefractioneerde behandeling en de controle. Ook op de concentratie had het bicarbonaat weinig effect. Na de start van de proef volgden een aantal dagen waarbij er niet veel zonlicht was, wat een verklaring kan zijn voor de weinige invloed van het bicarbonaat (zie verder 4.1.5 – invloed bicarbonaat) .

4.1.4 Proef 4

Tijdens proef 4 wordt gedurende langere periodes de optimale temperatuur bereikt. Dit blijkt duidelijk uit de grafiek (Figuur 32) waarbij de pieken schommelen tussen de 34 en 36 °C . Een mogelijke oorzaak hiervan is dat de spirulina voor proef 4 werd overgebracht naar een groot bassin in beton. Doordat beton goed warmte kan opvangen en snel opwarmt heeft dit ook zijn weerslag op de warmte van het water met de spirulina. De waterkolom is ook meer uitgespreid en met een lagere diepte kan het water sneller opwarmen.

De secchi-startwaarde is heel hoog wat een zeer lage concentratie spirulina aangeeft. Dit is het gevolg van felle regenbuien net na het overbrengen van de spirulina in het grote bassin. Hierdoor kwam een grote hoeveelheid regenwater in de spirulina cultuur terecht wat zorgde voor een sterk verdunningseffect. Mogelijks kan dit regenwater ook een invloed gehad hebben op de kwaliteit en samenstelling van het geogste spirulina (zie verder).

Wanneer spirulina gedroogd wordt in direct zonlicht is het aangeraden dat het droogproces snel gebeurt omdat anders het chlorofyl vernietigd wordt en het gedroogde product een blauwe schijn kan krijgen (Soni et al., 2017). De dag van de oogst werden niet echt heel hoge temperaturen gehaald maar was er wel fel zonlicht. De stelling beschreven in de literatuur zou dus met grote waarschijnlijkheid de oorzaak kunnen zijn van de blauwere kleur van de gedroogde spirulina.

4.1.5 Algemeen

In de literatuur wordt vermeld dat er tijdens de piekmomenten in de fotosynthese vaak een pH stijging kan worden waargenomen (Chisti, 2016). Aangezien piekmomenten in de fotosynthese samenvallen met een maximum aan zonlicht kan dit de pieken en dalen die respectievelijk 's middags en 's morgens optreden in het pH verloop verklaren. In proef 1 is dit patroon niet terug te vinden (Figuur 24) wat kan wijzen op een niet actieve of zeer lage fotosynthese, wat op het einde van de proef ook duidelijk is wanneer de spirulina afgestorven blijkt te zijn.

Een streefwaarde voor een gezonde cultuur is een pH tussen de 9 en 11 spirulina (Usharani et al., 2012) (Soni et al., 2017). In elke proef is de pH dus te laag, waarschijnlijk het gevolg van de NPK toevoeging i.p.v. het gebalanceerd toevoegen van afzonderlijke nutriënten (zoals weergegeven in bijlage) en het bicarbonaat. De lage pH zorgt voor een mindere groei dan maximaal met een goede pH kan gehaald worden.

Door de toevoeging van bicarbonaat wordt extra koolstof toegevoegd wat zou moeten zorgen voor een extra inbouw tijdens de fotosynthese en dus een stijging van de productiviteit. Vaak zorgt het bicarbonaat voor een tijdelijk overschot aan CO₂ dat niet direct kan worden verbruikt, wat zorgt voor een tijdelijke daling van de pH (Chisti, 2016). Dit is in proef 2 duidelijk te zien wanneer na de toevoeging van het bicarbonaat de pH in bassin 1 en 2 een daling vertoont. Echter herstelt deze daling snel wat verklaard kan worden door het deels toch opnemen van de overige CO₂ en deels door de verdamping van de overschot. Ideaal zou zijn wanneer de bicarbonaat toevoeging gecombineerd wordt met een piekmoment in de fotosynthese d.i. bij een maximum aan zonlicht. Het verwachte effect van de toevoeging van bicarbonaat op de concentratie (extra koolstof toediening, extra fotosynthetische inbouw van organisch materiaal, extra groei) blijft, zoals te zien in de resultaten van proef 2 en 3, uit. Wanneer de limiterende factor van de fotosynthese na de toevoeging van bicarbonaat zonne-energie is, dan gaat het meerwaarde-effect van de bicarbonaat verloren en verdampt de overige CO₂ in plaats van te zorgen voor een concentratiestijging (Ding et al., 2017).

De temperatuur volgt, zoals verwacht, een dag/nacht patroon. Uit de literatuur blijkt dat een maximale groei bereikt wordt tussen de 30 en 35 °C (Usharani et al., 2012). In de proeven uitgevoerd in Benin zijn dit waarden die zelden bereikt worden, de temperatuur ligt er gedurende een groot deel van de dag onder het optimale niveau. Er kan dan ook gesteld worden dat de temperatuur hier één van de meest limiterende factoren is bij het behalen van een hoge spirulinabiomassa. Zoals reeds vermeld in 2.1.2 lijkt het klimaat (vooral in het zuiden) van Benin niet helemaal optimaal voor de kweek van spirulina. De twee regenseizoenen aan de kuststreek en het onvoorspelbare karakter kunnen van invloed zijn (<https://climateknowledgeportal.worldbank.org/country/benin>). Zoals in proef 4 gebeurd is, kunnen onverwachte regenbuien zorgen voor een grote concentratiedaling en kunnen deze ook een invloed hebben op de kwaliteit van het eindproduct.

Tijdens proef 1,2 en 3 werd het mengen van de spirulina cultuur gedaan door handmatig te roeren met een stok. Deze manier van roeren is niet de ideale manier aangezien er op die manier geen constante turbulente stroming aanwezig is. Hierdoor kan de zuurstof geproduceerd in de cultuur opgehoopt worden en leiden tot een totaal verlies van de cultuur (Vonshak, 2002), dit kan dus ook een oorzaak zijn van het falen van proef 1.

Door het grote bassin waarin proef 4 werd uitgevoerd te construeren zoals weergegeven in verschillende literatuurbronnen en zoals ook in Figuur 12 (Chisti, 2016), werd een vrijwel constante stroming bekomen. Echter waren er nog een aantal dode hoek punten waarin er spirulina werd opgehoopt. Deze werden vooral gevonden langs de centrale wand en de keerschotten.

4.2 Nutritionele analyse

De bevinding uit de analyses dat het eiwitgehalte van de spirulina afkomstig uit de proeven in lijn ligt met het gehalte in de aangekochte stalen kan grotendeels verklaard worden door het feit dat vanaf proef 2 bij de toevoeging van NPK stikstof als limiterend element werd beschouwd. Op die manier werd, zonder rekening te houden met de andere elementen, gewaarborgd dat de concentratie stikstof in het eindproduct juist was. Aangezien spirulina in derdewereldlanden in de eerste plaats als eiwitbron gebruikt wordt (Falquet & Hurni, 2006) is dit wel een belangrijke bevinding. Door de keuze om vooral de focus te leggen op de juiste stikstof hoeveelheid is wellicht de fosforconcentratie niet in de juiste hoeveelheden gevolgd. Dit is te wijten aan het gebruik van een NPK meststof waarbij de verhoudingen N/P vastliggen en deze niet individueel gewijzigd kunnen worden waardoor, wanneer gekozen wordt om één nutriënt juist te stellen, de andere vaak in overmaat of te kort aanwezig zijn. In het geval van fosfor is dit duidelijk een teveel. Een optimale hoeveelheid is (zie bijlage 1) 0,12 g/ l DAP terwijl bij het toevoegen van de NPK 1 g/l NPK werd toegevoegd met 20% P₂O₅.

Element	Gehalte	Verklaring
Calcium	Veel hoger dan aangekochte stalen maar binnen gemiddelde	Samenstelling water?
Magnesium	Hoger dan gemiddeld	Samenstelling water?
Ijzer	Lager dan gemiddeld	Geen aanrijking
Natrium	Hoger dan gemiddeld	Aanrijking zout
Zink	Hoger dan gemiddeld	Regenwater aanrijking

De verhoogde waarden aan calcium zijn geen negatieve bevinding. Bovendien is het gehalte in het staal van de geoogste spirulina wel hoger dan in de andere stalen maar valt de waarde wel nog binnen de gemiddelde biochemische samenstelling zoals gevonden in de literatuur (Tabel 4). Spirulina kan door het hoge calcium gehalte een zeer goed alternatief zijn voor melk (Tabel 5) en is daardoor zeker interessant voor de ontwikkeling van jonge kinderen (den Hartog et al., 1988; Ekantari et al., 2017).

Als voordeel van spirulina wordt vaak ook de hoge K/Na verhouding aangehaald, aangezien de lage verhouding die in veel Westerse voeding aanwezig is als negatief wordt beschouwd (Falquet & Hurni, 2006). Uit de resultaten van de gekweekte spirulina blijkt er echter een hogere hoeveelheid natrium aanwezig te zijn (terwijl het kaliumgehalte ongeveer gelijk is) wat zou kunnen leiden tot een lage verhouding.

Verder wordt aangehaald dat de gehalten Ca, Mg en P in spirulina allemaal in evenwicht zijn (Briend, 1998). Uit de analyse van de gekweekte spirulina blijkt dat deze elementen allemaal een verhoging kennen, wat ze dus weer in evenwicht brengt.

Tot slot geeft de analyse een te laag ijzergehalte van de gekweekte spirulina weer. Dit gehalte is dus minder dan gemiddeld maar nog altijd zeer hoog in vergelijking met andere ijzerbronnen (zoals bv. granen) en dus zeker interessant (Falquet & Hurni, 2006). In de literatuur wordt vermeld dat natuurlijke spirulina vaak een lager ijzergehalte bevat en er bij gekweekte spirulina vaak een aanrijking van ijzer in de spirulina plaatsvindt door toevoeging van ijzerzouten (Falquet & Hurni, 2006). Aangezien dit in de uitgevoerde proeven niet het geval was kan dit het relatief lage gehalte aan ijzer verklaren.

Een verklaring voor de verhoogde calcium- en magnesiumwaarden kan gezocht worden in de kwaliteit en de samenstelling van het gebruikte water voor de proeven. Helaas zijn daar geen gegevens over beschikbaar.

5 Conclusie

- Bevindingen uit de literatuur

Spirulina is een microalg met een kenmerkende en onder de microscoop duidelijk zichtbare helixvorm. Spirulina is de verzamelnaam waaronder onderzoek is gedaan maar bestaat eigenlijk uit twee aparte genera, *Spirulina* en *Arthrospira*. Deze laatste classificeert de species met de uitzonderlijke gezondheidseigenschappen die in deze masterproef beschreven werden. Spirulina groeit natuurlijk in alkalische wateren van meren in warme gebieden. Het is dan ook rond dergelijke meren, in Tsjaad en Mexico; dat spirulina ontdekt werd en het al van ouds gebruikt werd als traditionele voedselbron door de volkeren die er leven.

Voor de commerciële teelt van spirulina zijn twee grote mogelijkheden. Het gebruik van een gesloten fotobioreactor (beter gecontroleerde condities, nog niet erg efficiënt), een open raceways (meer afhankelijk van omgeving en klimaat maar eenvoudig) of een hybride systeem dat de twee combineert. Het grote concept van de cultivatie van spirulina is eigenlijk sterk gelijkend op die van de conventionele landbouw namelijk het aanwenden van het systeem van fotosynthese voor de productie van biomassa die dan gebruikt kan worden al bron van voedsel, chemicaliën en energie.

Bij de cultivatie zijn enkele principes en groeifactoren belangrijk voor het behalen van een maximale productiviteit. Ten eerste is een adequate menging noodzakelijk, het zorgt immers voor een uniforme distributie van CO₂, een verwijdering van het opgehoopte O₂ gas en voorziet een optimaal lichtregime. Het meest effectieve en minst duur blijkt voor deze menging het schoepenrad te zijn, naast een specifieke constructie van het open bassin. Daarnaast is ook licht een belangrijke groeifactor via fotosynthese. Ideaal daarbij is dat er geen direct licht voorzien wordt maar slechts 30%. Ook de regeling van de temperatuur op of nabij de optimumtemperatuur voor het gecultiveerde organisme is belangrijk. Optimaal is daarbij een temperatuur van 30 tot 35 °C. Deze optimum temperatuur blijkt vooral van belang wanneer spirulina voor nutritionele doeleinden gekweekt wordt. In vele systemen blijkt temperatuur de meest limiterende factor te zijn. Vervolgens dient de pH op een niveau van 9 tot 11 gehouden te worden, dit om een gezonde cultuur en goeie groei te handhaven. Tot slot zijn ook de nutriënten en nutriëntenconcentratie van belang. Koolstof blijkt daarbij het belangrijkste nutriënt voor de groei te zijn. Deze kan toegediend worden als CO₂ -beluchting of er kan ook bicarbonaat gebruikt worden. Ook stikstof speelt een belangrijke rol, maar hierbij dient opgelet te worden voor toxische effecten. Nutriënten worden samengevoegd in cultuurmedia in verschillende concentraties waarbij Zarrouk's medium het eerst ontwikkelde is en ook meest gebruikt wordt.

Voor de verwerking van spirulina wordt de cultuur achtereenvolgens geogst, gefilterd (twee filters na elkaar) of gecentrifugeerd, gedroogd in de zon of industrieel in dunne strengen, vermalen, en tot slot verwerkt in pellets of poeder.

- Bevindingen uit de proeven

Uit de resultaten van de proeven kan geconcludeerd worden dat de spirulina gekweekt in de proeven nutritioneel gelijkaardig is aan industrieel gekweekte spirulina. Dit ondanks het feit dat niet de juiste nutriënten in de juiste hoeveelheden gebruikt werden. In de proeven werd enkel NPK gebruikt, waardoor vooral op de eiwitconcentratie gemikt werd, wat duidelijk te zien is in

de nutritionele analyse. De hoeveelheden en verhoudingen in de nutriënten blijken echter wel op een ander vlak een rol te spelen en zouden aldus kunnen zorgen voor vooral een betere groei en een optimalere pH (wat nu niet het geval was). De toevoeging van bicarbonaat toont geen meerwaarde in de proeven en bij uitbereiding kan gesteld worden dat het gebruik op kleine schaal niet opweegt tegen de kosten.

Uit de resultaten van de proeven kan verder nog geconcludeerd worden dat het klimaat in Benin, en dan vooral in het zuiden, niet optimaal geschikt is voor de kweek van spirulina. Het regenwater heeft zeker een effect gehad, in de eerste plaats als verdunning, maar hoogstwaarschijnlijk ook op de samenstelling. Daarbij komt dat de optimale temperatuur zelden wordt gehaald in de proeven, vooral door de daling in temperatuur 's nachts. In het bassin uit beton worden de hoogste temperaturen gehaald waardoor zeker moet rekening gehouden wordt met de materialen waaruit de bassins gemaakt worden voor de kweek. Ondanks het feit dat de optimale temperaturen niet gehaald worden is er wel een duidelijke groei in de proeven, waaruit afgeleid kan worden dat, als de waarden van de temperatuur boven de 25 °C blijven, de temperatuur geen al te grote invloed heeft op de spirulina-cultivatie. Een adequate menging is in alle omstandigheden wel een must om gevallen als foto-inhibitie te vermijden.

- Aanbevelingen en vervolg experimenten

De experimenten uitgevoerd in Benin zijn zeer praktische proeven. Aan de hand van deze masterproef (zie bv bijlages) zou een handleiding gemaakt kunnen worden voor de plaatselijke bevolking in Benin en andere derdewereldlanden. Met niet veel kosten en een minimaal aan kennis kan op die manier in elk huishouden spirulina gekweekt worden. Er zijn basiskosten maar deze zijn op de lange termijn lager dan de kosten voor het aankopen van spirulina in apotheken. Beschutting zou zeker een meerwaarde zijn mochten de proeven opnieuw uitgevoerd worden. Dit vooral om het regenwater en fel zonlicht tegen te houden en de proeven zo meer kans op slagen te geven.

Om de kennis omtrent spirulina verder uit te breiden en dan vooral de kennis omtrent de ideale groeifactoren kan ook nog heel wat labowerk verricht worden. Zo kan bijvoorbeeld nagegaan worden wat een echte ideale minimumtemperatuur is en kunnen lokale omstandigheden nagebootst worden op laboratoriumschaal, aangezien er dan toch een betere controle kan gehouden worden. Omdat het bicarbonaat-effect niet zo groot blijkt te zijn kan ook hier nog verder onderzoek naar verricht worden aangezien dit toch wel een behoorlijke kost is.

Een vervolg op de uitgevoerde proeven zou een verdere optimalisatie van de locatie kunnen zijn. Uit deze proeven bleek dat het zuidelijke klimaat niet optimaal was dus kan een trial in het noorden of centrum van het land opgezet worden.

- Spirulina als nutritioneel product

Spirulina bezit heel wat veelbelovende toepassingen in dierlijke voeding, biochemische industrie.... Naast deze toepassingen wordt het ook al decennialang als voedselbron van verschillende populaties gebruikt. Vooral voor ouderen, kinderen en sporters is er een duidelijke meerwaarde. Ook in derdewereldlanden, waar ondervoeding nog een groot probleem blijft, blijkt uit verschillende onderzoeken het hoog potentieel van spirulina. Een belangrijk bijkomend voordeel daarbij is dat spirulina ten opzichte van de meeste andere voedingsmiddelen ter plaatse kan worden geteeld en daardoor ook op langere termijn een oplossing biedt bij de ontwikkeling van voedingsstrategieën.

Uit de gegevens uit zowel literatuur als uit de uitgevoerde proeven blijkt het belang van het eiwitgehalte in spirulina. Zelfs met een minimum aan nutriënten, zoals in de uitgevoerde proeven, wordt nog steeds een hoogwaardig product verkregen waarin het hoge eiwitgehalte zeker in het oog springt. De combinatie van dit eiwitgehalte, het bezitten van vrijwel alle nutriënten die in het ideale complete voedsel zitten en het eenvoudig consumeerbaar en verteerbaar zijn, zorgt er voor dat spirulina omschreven wordt als supervoeding. Zonder twijfel kan gezegd worden dat spirulina de eiwitbron van de toekomst kan zijn, niet enkel in de derde wereld maar ook in de Westerse landen, zeker in het huidige klimaat. De vervuilende stempel die de vleessector krijgt, de import van soja als eiwitbron en dergelijke, zorgen voor het controversiële karakter met betrekking tot milieu die eiwitten vandaag krijgen. Daarbij komt ook dat de overconsumptie van vlees voor eiwitten in het westen heel wat gezondheidsproblemen veroorzaakt. In dat opzicht is spirulina dus een geschikt alternatief. Voor de kweek van spirulina is immers minder land nodig, is de kweek continu gedurende het jaar en kan spirulina ook in zeewater of afvalwaters gekweekt worden.

De eigenlijke opzet van deze masterproef was om de mogelijkheden te onderzoeken om spirulina op een industriële schaal te kweken. Omwille van omstandigheden, zoals beschikbaarheid van de nutriënten en toegang tot de markt, werd gekozen de experimenten in Cotonou uit te voeren. Uit de proeven blijkt nu wel duidelijk dat als er op industriële schaal gekweekt wil worden, de installaties goed uitgerust moeten zijn en dat het noordelijke of centrale klimaat van Benin meer geschikt is. Desondanks blijkt wel dat op zeer kleine schaal, zoals bv in een emmer of een klein vat, er in de huishoudens, zelfs in een minder geschikt klimaat, spirulina kan gekweekt worden. Met een minimum aan kennis en een minimum aan input (het gebruik van NPK zoals vrij op de Beninese markt verkregen kan worden i.p.v. dure en moeilijk te krijgen meststoffen) kan reeds een output gehaald worden die een meerwaarde kan zijn voor de lokale bevolking en als alternatief voor melk kan dienen of als aanvulling op het eiwitarme dieet.

Bijlagen

Bijlage 1 – Stappenplan opstart

- 1) Alle bassins op 1 horizontale lijn plaatsen zodat elk bassin evenveel en even lang zonlicht krijgt.
- 2) Emmers markeren zodat er telkens evenveel liter in zit en er een vast aantal emmers in elk bassins kunnen worden toegevoegd. Op die manier wordt exact evenveel liter in elke bassin verkregen.
- 3) Nutriënten toevoegen berekend op hoeveelheid water. Nutriënten eerst oplossen in een aparte emmer met een weinig water en dan pas in het bassin brengen. Goed mengen is noodzakelijk.

Ideaal:

- 8g/l Bicarbonaat
- 5g/l Zout
- 2g/l Kaliumnitraat
- 0.12g/l DAP (diammonium fosfaat)
- 0.2g/l Epsom zout
- 0.02g/l Ureum
- 0.005g/l IJzersulfaat.

Alternatief :

Als de verschillende meststoffen niet gevonden worden op de lokale markt kan NPK worden gebruikt, wat het geval was in Benin.

- 4) Spirulinabron toevoegen tot een secchi van 6 bereikt wordt (gemeten met de secchi disque)
- 5) Elk uur minstens 1 keer roeren.
's Nachts worden de bassins afgedekt met een plastic zeil en onder heel lage tentjes geplaatst. De bassins worden 's morgens om 6 u terug geopend en worden terug afgedekt om 19 u15.
Indien het regent worden de bassins ook afgedekt.
Indien er erg felle zon is worden de bassins onder de tentjes geplaatst
- 6) Meetprocedure: ongeveer elke 3 uur
 - pH en T : eerst roeren, stok in het midden plaatsen, na 10 seconden aflezen
 - Secchi: na roeren, recht boven de meetlat kijken om af te kunnen lezen..

Bijlage 2 – Stappenplan uniform maken + vermeerdering bassins

- Bij de start zit er 200 l in bassin 1, 2, 3 en 4
 - ➔ 100 l van 4 -> 5
 - ➔ 100 l van 3 -> 5
 - ➔ 100 l van 3 (= rest) -> 4
- Situatie ondertussen: 200 l 3+4 in bassin 5 en 200l 3+4 in 4
 - ➔ 100 l van 1 -> 6
 - ➔ 100 l van 2 -> 6
 - ➔ 100 l van 2 (= rest) -> 1
- Situatie ondertussen 200l 1+2 in bassin 6 en 200l 1+2 in bassin 1.
Bassin 3 en 2 zijn leeg. In bassin 1, 4 , 5 en 6 zit 200 liter.
 - ➔ 100 l van 5 -> 2
 - ➔ 100 l van 4 -> 3
 - ➔ 100 l van 6 -> 2
 - ➔ 100 l van 1 -> 3
- Situatie ondertussen:
 - 200 l van 1+2+3+4 in bassin 3
 - 200 l van 1+2+3+4 in bassin 2
 - 100 l van 1+2 in bassin 6
 - 100 l van 1+2 in bassin 1
 - 100 l van 3+4 in bassin 5
 - 100 l van 3+4 in bassin 4
 - ➔ 100 l van 6 (= rest) -> 1
 - ➔ 100 l van 1 (= rest) -> 4
- Situatie ondertussen:
 - 200 l van 1+2+3+4 in bassin 2, 3, 4 en 5
 - Bassin 1 en 6 zijn leeg
 - ➔ 100 l water toevoegen + 100 g NPK/0.5kg zout in bassins 2, 3, 4 en 5
 - ➔ 50 l van 2 -> 1
 - ➔ 50 l van 3 -> 1
 - ➔ 50 l van 4 ->1
 - ➔ 50 l van 5 -> 1
 - ➔ 50 l van 2 -> 6
 - ➔ 50 l van 3 -> 6
 - ➔ 50 l van 4 -> 6
 - ➔ 50 l van 5 -> 6

Bijlage 3 – Stappenplan oogst

- 1) Spirulina-water mengsel wordt op een eerste zeef gebracht: een houten frame met doek met grotere gaten (kaasdoeken). Dit dient om het grove vuil tegen te houden.
- 2) Het effluent van zeef 1 wordt op een tweede zeef gebracht: een houten frame met zeefdoek met heel kleine openingen. Het water sijpelt door de zeef rechtstreeks terug in het bassin, de spirulina blijft op de zeefdoek liggen.
- 3) Als er genoeg spirulina verzameld is op zeef 2 wordt het doek samengevouwen, dichtgeknoopt en uitgewrongen.
- 4) Doek met spirulina wordt in een emmer gebracht met gaatjes in onderzijde. Een andere emmer zonder gaatjes samen met een gewicht erin wordt erop geplaatst. Op die manier wordt het water uit de spirulina geperst.
- 5) Lage tafel wordt op een zwart plastic geplaatst op een plaats waar er niet te veel wind is.
- 6) De spirulina openwrijven tot dunne pannenkoek en laten drogen op de tafel.
- 7) Droge spirulina verzamelen en in de blender vermalen tot een fijn poeder.

BENODIGDHEDEN

- Filterdoek grof
- Filterdoek fijn
- 2x houten kader voor doek → kleine = 40*40 cm, grote = 70*70 cm
- Emmer met gaatjes
- Emmer zonder gaatjes + gewichten
- Zwarte plastic zeilen
- Lage tafel, houten plank.

Referentie lijst

- Abeliovich, A., & Azov, Y. (1976). Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(6), 801–806. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7192>.
- About algae and cyanobacteria - AlgaePARC. (n.d.). Retrieved February 21, 2019, from <http://www.algaeparc.com/aboutalga.asp>.
- Achour, H. Y., Doumandji, A., Bouras, N., Sabaou, N., & Assuncao, P. (2019). Isolation, molecular identification and the Carotenogenesis process of the microalgae *Dunaliella salina* strain DunaDZ1 isolated from an Algerian Salt Lake. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(5). https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_5_05.
- Adarme-Vega, T., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>.
- Amaro, H. M., Rato, A., Matias, D., Joaquim, S., Machado, J., Gonçalves, J. F. M., ... Catarina Guedes, A. (2019). Alga diet formulation – An attempt to reduce oxidative stress during broodstock conditioning of Pacific oysters. *Aquaculture*, 500, 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.060>.
- Anupama, & Ravindra, P. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, 18(6), 459–479. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00045-8).
- Apandi, N. M., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., & Kassim, A. H. M. (2019). Microalgal biomass production through phycoremediation of fresh market wastewater and potential applications as aquaculture feeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(4), 3226–3242. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3937-3>.
- Aysu, T., Feroso, J., & Sanna, A. (2018). Ceria on alumina support for catalytic pyrolysis of *Pavlova sp.* microalgae to high-quality bio-oils. *Journal of Energy Chemistry*, 27(3), 874–882. <https://doi.org/10.1016/J.JECHEM.2017.06.014>.
- Belkin, S., & Boussiba, S. (1991). High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina Platensis*. *Bioresource Technology*, 38(2–3), 167–169. Retrieved from https://www.academia.edu/35210088/High_internal_pH_conveys_ammonia_resistance_in_spirulina_platensis.
- Bharathiraja, B., Chakravarthy, M., Ranjith Kumar, R., Yogendran, D., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., ... Palani, S. (2015). Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 634–653. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.03.047>.
- Biospirulina. (2019). Retrieved June 2019, from <http://www.biospirulina.com/pdf/Spiron%2036gr.pdf>.
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3), 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8).
- Boussiba, S., & Gibson, J. (1991). Ammonia translocation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 88(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04953.x>.
- Briend, A (1998). La malnutrition de l'enfant. Des bases physiopathologiques à la prise en charge sur le terrain. 163 p. Institut Danone

<https://studylibfr.com/doc/6453860/lamalnutrition-de-l-enfant>.

- Bujard E, Braco U, Mauron J, Mottu F, Nabholz A, et al. (1970) Composition and nutritive value of blue-green algae (spirulina) and their possible use in Food Formulations 3rd International Congress of Food Science and Technology, Washington, USA.
- Cao, S., Zhang, P., Zou, T., Fei, S., Han, D., Jin, J., ... Xie, S. (2018). Replacement of fishmeal by spirulina *Arthrospira platensis* affects growth, immune related-gene expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III), and its challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 79(May), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.022>.
- Capelli, B., & Cysewski, G. R. (2012). Potential health benefits of spirulina microalgae*. *Nutrafoods*, 9(2), 19–26. <https://doi.org/10.1007/bf03223332>.
- Carboni, S., Vignier, J., Chiantore, M., Tocher, D. R., & Migaud, H. (2012). Effects of dietary microalgae on growth, survival and fatty acid composition of sea urchin *Paracentrotus lividus* throughout larval development. *Aquaculture*, 324–325, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.037>.
- Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musc, M., Anklam, E., Theobald, A., & von Holst, C. (2001). Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in Spirulina Pacifica algae: a chemometric approach. *Journal of Chromatography. A*, 912(1), 61–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307988>.
- Cembella, A. D., Antia, N. J., & Harrison, P. J. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1. *Critical Reviews in Microbiology*, 10(4), 317–391. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6321101>.
- Chacón-Lee, T. L., & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “Healthy” Foods- Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 655–675. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00132.x>.
- Challem-JJ, Passwater-RA, & Mindell-EM (1981), “Spirulina” Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut.
- Chen, Z., Wang, G., Zeng, C., & Wu, L. (2018). Comparative study on the effects of two diatoms as diets on planktonic calanoid and benthic harpacticoid copepods. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 329(3), 140–148. <https://doi.org/10.1002/jez.2215>.
- Chisti, Y. (2016). Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway ponds. *Algae Biotechnology*, (858), 9351. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9>.
- Ciferri, O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47(4), 551. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC283708/?page=1>.
- Clément, G., Giddey, C., & Menzi, R. (1967). Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(11), 497–501. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740181101>.
- Coherent Market Insights. (2017, October). Spirulina market, by form, composition, end-use industry, and region - Insights, size, share, opportunity analysis, and industry forecast till 2025. Retrieved June 2019, from <https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/spirulina-market-972> .
- Colla, L. M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C., & Costa, J. A. V. (2007). Production of biomass

- and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, 98(7), 1489–1493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.030>.
- Crisp, J. A., D'Souza, F. M. L., Tweedley, J. R., Partridge, G. J., & Moheimani, N. R. (2018). Performance of mixed species and mono-specific algal diets for culture of larval western school prawns, *Metapenaeus dalli*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(5), 845–856. <https://doi.org/10.1111/jwas.12484>.
- Danesi, E. D. ., de O. Rangel-Yagui, C., de Carvalho, J. C. ., & 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. Retrieved from https://www.academia.edu/26673552/An_investigation_of_effect_of_replacing_nitrate_by_urea_in_the_growth_and_production_of_chlorophyll_by_Spirulina_platensis.
- Dansou, D. K. (2002). Developpement de la culture de la Spiruline (*Spirulina platensis*) et valorisation de celle-ci au Burkina Faso, 1–74.
- de Cruz, C. R., Lubrano, A., & Gatlin, D. M. (2018). Evaluation of microalgae concentrates as partial fishmeal replacements for hybrid striped bass *Morone sp.* *Aquaculture*, 493, 130–136. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.04.060>.
- De groene belofte: Algen.* (2013). Retrieved from www.biomaatschappij.nl.
- de Vree, J. H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0400-2>.
- den Hartog, C., Hautvast, J. G. A. J., den Hartog, A. P., & Deurenberg, P. (1988). *Nieuwe voedingsleer* (Rev. ed.). Houten, The Netherlands: Spectrum.
- Diao, J., Song, X., Cui, J., Liu, L., Shi, M., Wang, F., & Zhang, W. (2019). Rewiring metabolic network by chemical modulator based laboratory evolution doubles lipid production in *Cryptocodinium cohnii*. *Metabolic Engineering*, 51, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.10.004>.
- Dineshkumar, R., Narendran, R., & Sampathkumar, P. (2016). Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 45(12), 1749–1754.
- Ding, Y., Li, X., Wang, Z., Li, Z., Yin, D., & Geng, Y. (2017). Ammonium bicarbonate supplementation as carbon source in alkaliphilic spirulina mass culture, 4886–4896. <https://doi.org/10.1111/are.13308>.
- Dyhrman, S. T., & Ruttenberg, K. C. (2006). Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1381–1390. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.3.1381>.
- Earthrise Farms Spirulina, (1986), “Product typical analysis”, San Rafael, USA.
- Ehteshami, F., Romano, N., Ramezani Fard, E., & Hoseinzadeh Sahafi, H. (2017). Effect of different dietary microalgae combinations on growth and survival of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) larvae and the feasibility of replacing microalgae with a dietary lipid emulsion. *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 671–680. <https://doi.org/10.1111/anu.12434>.
- Falquet, J., & Hurni, J.-P. (2006). Spiruline aspects nutritionnels. *Antenna Technologies*, 41. Retrieved from <https://www.antenna-france.org/wp-content/uploads/2014/06/spiruline-aspects-nutritionnels.pdf>.

- Grawish, M. E. (2008). Effects of *Spirulina platensis* extract on Syrian hamster cheek pouch mucosa painted with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Oral Oncology*, 44(10), 956–962. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.11.014>.
- Grobbelaar, J. U. (2007). Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds: what do the organisms tell us? *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 591–598. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9172-9>.
- Habib, M. A., Parvin, M., Huntington, T. C., & Hasan, M. R. (2008). FAO report: A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *Aquaculture* (Vol. 1034). [https://doi.org/ISBN 978-92-5-106106-0](https://doi.org/ISBN%20978-92-5-106106-0).
- Hau R, (1995), “Vitamin B12 in der Mikroalge *Spirulina platensis*” FIT fürs LEBEN 1, 29.
- Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., & Kojima, I. (1996). Calcium Spirulan, an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, 59(1), 83–87. <https://doi.org/10.1021/np960017o>.
- Hoekema, S., Bijmans, M., Janssen, M., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2002). A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1331–1338. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00106-4).
- Hoseini, S. M., Khosravi-Darani, K., & Mozafari, M. R. (2013). Nutritional and Medical Applications of spirulina microalgae. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(8), 1231–1237. <https://doi.org/10.2174/1389557511313080009>.
- Hudson, B. J. F., & Karis, I. G. (1974). The lipids of the alga spirulina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(7), 759–763. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740250703>.
- Jourdan, J. (2001). Grow your own spirulina. (1994).
- Juneja, A., Ceballos, R., Murthy, G., Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6(9), 4607–4638. <https://doi.org/10.3390/en6094607>.
- Kleinegris, D. M. M., Janssen, M., Brandenburg, W. A., & Wijffels, R. H. (2011). Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(3), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.005>.
- KMI. (2019). KMI - Klimaat in de wereld. Retrieved July 2019, from <https://www.meteo.be/nl/klimaat/klimaat-in-de-wereld>
- Lee, J. B., Hayashi, T., Hayashi, K., & Sankawa, U. (2000). Structural analysis of calcium spirulan (Ca-SP)-derived oligosaccharides using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Natural Products*, 63(1), 136–138. <https://doi.org/10.1021/np990348b>.
- Lee, J. B., Hayashi, T., Hayashi, K., Sankawa, U., Maeda, M., Nemoto, T., & Nakanishi, H. (1998). Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, 61(9), 1101–1104. <https://doi.org/10.1021/np980143n>.
- Lei, X., Zheng, W., Ding, H., Zhu, X., Chen, Q., Xu, H., ... Tian, Y. (2018). Effective harvesting of the marine microalga *Thalassiosira pseudonana* by Marinobacter sp. FL06. *Bioresource Technology*, 269, 127–133. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.08.077>.
- Liang, M.-H., Xue, L.-L., & Jiang, J.-G. (2018). Two-stage cultivation of *dunaliella tertiolecta*

- with glycerol and triethylamine for lipid accumulation: a viable way to alleviate the inhibitory effect of triethylamine on biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(4). <https://doi.org/10.1128/AEM.02614-18>.
- Lincoln, E. P., Hall, T. W., & Koopman, B. (1983). Zooplankton control in mass algal cultures. *Aquaculture*, 32(3–4), 331–337. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90230-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90230-2).
- Madkour, F. F., Kamil, A. E.-W., & Nasr, H. S. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.EJAR.2012.09.003>.
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389–3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>.
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>.
- Marquez, A., Lodeiros, C., Loor, A., Revilla, J., Da Costa, F., & Sonnenholzner, S. (2019). Microalgae diet for juveniles of *Spondylus limbatus*. *Aquaculture International*, 27(1), 323–335. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0327-2>.
- McCarty, M. F. (2007). Clinical potential of spirulina as a source of phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 566–570. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>.
- Moons, I., Barbarossa, C., & De Pelsmacker, P. (2018). The determinants of the adoption intention of eco-friendly functional food in different market segments. *Ecological Economics*, 151, 151–161. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLECON.2018.05.012>.
- Muys, M., Sui, Y., Schwaiger, B., Lesueur, C., Vandenheuvel, D., Vermeir, P., & Vlaeminck, S. E. (2019). High variability in nutritional value and safety of commercially available *Chlorella* and *spirulina* biomass indicates the need for smart production strategies. *Bioresource Technology*, 275, 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.059>.
- Nuhu, A. A. (2013). *Spirulina* (Arthrospira) : An important source of nutritional and medicinal compounds. *Journal of Marine Biology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/325636>.
- O'Shaughnessy, J. A., Kelloff, G. J., Gordon, G. B., Dannenberg, A. J., Hong, W. K., Fabian, C. J., ... Von Hoff, D. D. (2002). Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(2), 314–346. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839647>.
- Ogbonna, J. C., Soejima, T., & Tanaka, H. (1999). An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors. *Progress in Industrial Microbiology*, 35, 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80121-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80121-0).
- PAG : Protein Advisory Group of U.N. (1974). Recent developments in spirulina PAG Bulletin, 3(4), 4-7.
- Pandey, J. P., Tiwari, A., & Mishra, R. M. (2010). Evaluation of biomass production of *Spirulina maxima* on different reported media. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1(3), 70–81. <https://doi.org/10.1021/bp.070371k>.
- Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., Stramarkou, M., Tzovenis, I., & Krokida, M. (2017). Environmental assessment of industrially applied drying technologies for the treatment of *Spirulina platensis*. *IOSR Journal of Environmental Science*, 11(1), 41–46. <https://doi.org/10.9790/2402-1101014146>.
- Parages, M. L., Rico, R. M., Abdala-Díaz, R. T., Chabrillón, M., Sotiroudis, T. G., & Jiménez,

- C. (2012). Acidic polysaccharides of *Arthrospira (Spirulina) platensis* induce the synthesis of TNF- α in RAW macrophages. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1537–1546. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9814-4>.
- Parrish, C. C., French, V. M., & Whitticar, M. J. (2012). Lipid class and fatty acid composition of copepods (*Calanus finmarchicus*, *C. glacialis*, *Pseudocalanus sp.*, *Tisbe furcata* and *Nitokra lacustris*) fed various combinations of autotrophic and heterotrophic protists. *Journal of Plankton Research*, 34(5), 356–375. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs003>.
- Pascaud M. (1993), “The essential polyunsaturated fatty acids of spirulina and our immune response.” Bull. Inst. Océano, Monaco, n°spécial 12, 49-57.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>.
- Picard M.-E. (1993) Utilisation de la spiruline au Centre Nutritionnel Nutrition Santé Bangui, 49-50 Bd Van Iseghem, Nantes
- Planes, P., Rouanet, J.-M., Laurent, C., Baccou, J.-C., Besançon, P., & Caporiccio, B. (2002). Magnesium bioavailability from magnesium-fortified spirulina in cultured human intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 77(2), 213–218. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00341-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00341-7).
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 165–177. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>.
- Puyfoulhoux, G., Rouanet, J. M., Besançon, P., Baroux, B., Baccou, J. C., & Caporiccio, B. (2001). Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1625–1629. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312906>.
- Qi, S., Zhao, X., Zhang, W., Wang, C., He, M., Chang, Y., & Ding, J. (2018). The effects of 3 different microalgae species on the growth, metamorphosis and MYP gene expression of two sea urchins, *Strongylocentrotus intermedius* and *S. nudus*. *Aquaculture*, 492, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.007>.
- Quillet, M. (1975). Carbohydrates synthesized by the spirulines. *Annales de La Nutrition et de l'alimentation*, 29(6), 553–561. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/824997>.
- Rammuni, M. N., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Attalage, R. A. (2019). Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chemistry*, 277, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.066>.
- Rayner, T. A., & Hansen, B. W. (2019). Applying algal paste as food for copepod live feed-A growth study on *Acartia tonsa nauplii* using the microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture Research*, 50(2), 694–697. <https://doi.org/10.1111/are.13948>.
- Rijn, J. van, & Shilo, M. (1986). Nitrogen limitation in natural populations of Cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria spp.*) and its effect on macromolecular synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(2), 340. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203527/>.
- Romay, C., Armesto, J., Remirez, D., González, R., Ledon, N., & García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflammation Research*, 47(1), 36–41. <https://doi.org/10.1007/s000110050256>.

- Ronda, S. R., & Lele, S. S. (2008). Culture conditions stimulating high γ -linolenic acid accumulation by *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology* : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 39(4), 693–697. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080004000018>.
- Sachdeva, R., Kaur, R., & Sangha, J. (2004). Effect of supplementation of spirulina on the haematological profile and intellectual status of school girls (7-9 years). *Journal of Human Ecology*, 15(2), 105–108. Retrieved from <https://www.popline.org/node/264169>.
- Salatti-Dorado, J. A., García-Gómez, D., Rodríguez-Ruiz, V., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G., & Rubio, S. (2019). Multifunctional green supramolecular solvents for cost-effective production of highly stable astaxanthin-rich formulations from *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 279, 294–302. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.11.132>.
- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., & Rodríguez, I. (2003). *Spirulina (Arthrospira)*: an edible microorganism: a review. *Nº*, 8(1), 7–24.
- Sarada, R., Pillai, M. G., & Ravishankar, G. . (1999). Phycocyanin from spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 34(8), 795–801. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00153-8)
- Seshadri C.V. (1993), “Large scale nutritional supplementation with spirulina alga.” All India coordinated project on spirulina. Shri Amm Murugappa Chettiar Research Center (MCRC) Madras, India.
- Seshadri C.V., Umesh B.V. et Manoharan R. (1991) Beta-carotene studies in spirulina. *Society of Applied Algology*. International conference No5, vol. 38, no 2-3, pp. 111-113 .
- Sharma, N. K., Tiwari, S. P., Tripathi, K., & Rai, A. K. (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 1059–1081. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9626-3>.
- Sili, C., Torzillo, G., & Vonshak, A. (2012). *Arthrospira* (spirulina). In B.A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (Vol. 9789400738, pp. 677–705). Dordrecht, The Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_25.
- Simpore, J., Zongo, F., Kabore, F., Dansou, D., Bere, A., Nikiema, J.-B., ... Musumeci, S. (2005). Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing spirulina. <https://doi.org/10.1159/000088889>.
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 157–171. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.09.010>.
- Stanier, R., & Van Niel, C. B. (1962). The concept of a bacterium. *Archiv Fur Mikrobiologie*, 42, 17–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13916221>.
- Sukumaran, P., Nulit, R., Halimoon, N., Simoh, S., Omar, H., & Ismail, A. (2018). Formulation of cost-effective medium using urea as a nitrogen source for *Arthrospira platensis* cultivation under real environment, (January). <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/38182>.
- Sunda, W. G., & Huntsman, S. A. (1995). Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine Chemistry*, 50(1–4), 189–206. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00035-P](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00035-P).
- Tavanandi, H. A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira*

- platensis*. *Algal Research*, 31, 239–251. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.02.008>.
- The World Bank Group. (2019). World Bank Climate Change Knowledge Portal. Retrieved July 2019, from <https://climateknowledgeportal.worldbank.org/country/benin>.
- Thiruvankadam, S., Izhar, S., Hiroyuki, Y., & Harun, R. (2019). One-step microalgal biodiesel production from *Chlorella pyrenoidosa* using subcritical methanol extraction (SCM) technology. *Biomass and Bioenergy*, 120, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.11.037>.
- Torzillo, G., & Vonshak, A. (1994). Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 6(5), 399–403. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(94\)00076-6](https://doi.org/10.1016/0961-9534(94)00076-6).
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–4028. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.01.046>.
- Ugwu, C. U., Ogbonna, J. C., & Tanaka, H. (2005). Light/dark cyclic movement of algal culture (*Synechocystis aquatilis*) in outdoor inclined tubular photobioreactor equipped with static mixers for efficient production of biomass. *Biotechnology Letters*, 27(2), 75–78. <https://doi.org/10.1007/s10529-004-6931-4>.
- Usharani, G., Saranraj, P., & Kanchana, D. (2012). Spirulina cultivation: a review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(6), 1327–1341. Retrieved from <http://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/viewFile/894/607>.
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, 105, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.105>.
- Venkataraman, G. S. (1981). Blue-green algae for rice production. *FAO Soil Bulletin*, 16, 33–42. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-ar124e.pdf>.
- Venkataraman, L. V., Somasekaran, T., & Becker, E. W. (1994). Replacement value of blue-green alga (*Spirulina platensis*) for fishmeal and a vitamin-mineral premix for broiler chicks. *British Poultry Science*, 35(3), 373–381. <https://doi.org/10.1080/00071669408417702>.
- Vieira Costa, J. A., Colla, M., & Filho, P. D. (2003). *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Z. Naturforsch* (Vol. 58). Retrieved from www.znaturforsch.com.
- Vijayagopal, P. (2012). Development of live feed enrichment product for marine fish larviculture. *Indian Journal of Fisheries* (Vol. 59). Indian Council of Agricultural Research (ICAR). Retrieved from <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJF/article/view/14934>.
- Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Acién, F. G., & Alarcón, F. J. (2019). Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Research*, 37, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.018>.
- Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. Retrieved from <http://www.bashanfoundation.org/contributions/Vonshak-A/1997-.Vonshak-S.pdf>.
- Vonshak A, Guy R (1988) Photoinhibition as a limiting factor in outdoor cultivation of *Spirulina*

- platensis. In: Stadler T, Mollion J, Verdus MC, Karamanos Y, Morvan H, Christiaen D (eds), *Algal Biotechnology. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Essex, New York*, 365–370.
- Vonshak, A., & Richmond, A. (1988). Mass production of the blue-green alga spirulina: an overview, *15*(30), 233–247.
- Watanabe, F., Takenaka, S., Kittaka-Katsura, H., Ebara, S., & Miyamoto, E. (2002). Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *48*(5), 325–331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12656203>.
- Zeenat, R., & Sharma, V. K. (1990). Synergistic effect of cyanobacteria and DAP on tomato yield. *Science and Culture*, *56*(3), 129–131. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930323821>.
- Zhang, J., Guo, H., Ma, Z., Jiang, S., Wu, K., Li, Y., & Qin, J. G. (2015). Effects of prey color, wall color and water color on food ingestion of larval orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822). *Aquaculture International*, *23*(6), 1377–1386. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9890-y>.
- Zittelli, G. C., Rodolfi, L., Bassi, N., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2013). Photobioreactors for microalgal biofuel production. In *Algae for Biofuels and Energy* (pp. 115–131). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_7.