



Feasibility Assessment Upon Applications of Bioenergy-steered Biorefinery with Supplementation of Extracts of Chinese Medicinal Herbs

Jia-hui Liao, Chung-Chuan Hsueh, Bor-Yann Chen*

Department of Chemical and Materials Engineering, National Ilan University, Ilan, Taiwan

Email address

lisa22684047@gmail.com (Jia-hui Liao), cchsueh88@gmail.com (Chung-Chuan Hsueh), boryannchen@yahoo.com.tw (Bor-Yann Chen)

*Corresponding author

To cite this article:

Jia-hui Liao, Chung-Chuan Hsueh, Bor-Yann Chen. Feasibility Assessment Upon Applications of Bioenergy-steered Biorefinery with Supplementation of Extracts of Chinese Medicinal Herbs. *Science Discovery*. Vol. 5, No. 3, 2017, pp. 179-185. doi: 10.11648/j.sd.20170503.14

Received: January 20, 2017; Accepted: May 6, 2017; Published: May 11, 2017

Abstract: For thousands of years, toxicity risk assessment on Chinese medicinal herbs showed that they are "generally regarded as safe" at appropriate dosages. Literature revealed that medical mechanism for human health could be associated with abundant compositions of antioxidants (e.g., polyphenolics and flavonoids). As a matter of fact, some studies disclosed such bioelectrochemical characteristics also strongly depended upon contents of antioxidants. That is, Chinese medicinal herbs contained significant amounts of electron transfer (ET)-associated antioxidants for myriads of uses. As prior studies revealed, decolorized intermediates owned promising ET capabilities; however, such intermediates were originally obtained from artificially synthesized chemicals and could not be considered as environmentally friendly. Thus, using edible medicinal herbs for bioenergy and/or biorefinery applications would be inevitable. This first-attempt study explored technical feasibility using microbial fuel cell-aided wastewater treatment (e.g., the association of antioxidants and dye decolorization and power generation) as evaluation platform. The findings indicated that some Chinese medicinal herbs apparently showed electrochemical capabilities not only antioxidant activities, but also ET characteristics for sustainable development. In addition, ET capabilities were strongly affected by pH, temperature, dosage and method of extraction. Moreover, extracts of medicinal herbs owned moderate ET capabilities relatively less than tea extracts for bioenergy applications not only in bioremediation, but also functional foods.

Keywords: Chinese medicinal herbs, Antioxidant, Electrochemistry, Electron shuttle, Biodecolorization

以中草藥萃液添加促進生物能源啟動生物精煉之可行性研究

廖家輝, 薛仲娟, 陳博彥*

化學工程與材料工程學系, 宜蘭大學, 宜蘭市, 台灣

邮箱

lisa22684047@gmail.com (廖家輝), cchsueh88@gmail.com (薛仲娟), boryannchen@yahoo.com.tw (陳博彥)

摘要: 中國人歷久運用之中草藥, 其臨床安全已經數千年試驗證實, 加上先進方法研究其藥理機制, 發現中草藥富含具備有益人體健康之抗氧化物成分, 大多為多酚和類黃酮化合物之抗氧化成分。事實上, 部分亦發現具有抗氧化成分亦具有生物電化學特性。先前研究中更揭示染料脫色中間物確實具可提升電子傳遞之能力, 並且發現其結構中苯環具有多個羥基(-OH)取代基, 並與多酚、類黃酮化合物結構類相似, 因此合理懷疑該性質可能與其抗氧化性等電子傳遞作用有所關聯。隨著環保意識的抬頭, 選擇天然植物萃取液以取代染料中間物, 不僅對環境更友善, 尚具有易生成中間物或本身即富含電子梭成份的諸多優點。因此本研究首次嘗試對多種常見天然中草藥進行生物電化學評估, 以及核對

抗氧化與生物脫色之相關研究，以利於後續深入評估應用於廢水處理及醫療保健食品之領域中。本研究證實多種中草藥萃液確實具有電化學活性，不僅具有抗氧化活性，亦可能具有電子梭作用，更可生生不息之綠色循環應用。此電子中介作用能力受pH、溫度、中草藥濃度及萃取方式等因素，影響甚鉅就電子轉移能力來看中草藥實屬溫和之生物能源資材，顯然與茶飲類有所不同。

關鍵詞：中草藥材，抗氧化，電化學，電子梭，生物脫色

1. 引言

先前文獻[1]中提出化學物質之抗氧化功能與電子梭能力可能皆是電子轉移相關之電化學特性。而且在先前研究[1]發現染料生物脫色代謝物更具有能促進脫色及生物產電之電子梭能力，但是由於化學染料可能具有生物毒性，且不具生態友善應用之疑慮。因此基於環境友善性之考慮，自天然可食用之植物中篩選出具有類似電子梭特性以資利用之成分，確實已是目前綠色環境生物技術上極重要之研究課題。再者，文獻指出中草藥(例如：丁香、金銀花)含有多酚及類黃酮類抗氧化物成分[3, 4]，具有電化學活性存在。文獻更指出電化學分析研究中發現含兒茶素之茶葉，可能亦具有氧化還原峰之電子梭特性[5, 6, 7]，因此合理懷疑天然中草藥中富含的色素，可能亦是電子移轉之發色基團，而且存在著人體需要的營養物質或可能具有豐富的藥膳作用，例如：金銀花(*Lonicera japonica*)、丁香(*Syzygium aromaticum*)等常見中草藥，由於其富含天然多酚類黃酮化合物被認為可能是促進健康的植物化學物質，主因其(1)具有優良的抗氧化活性，抗病毒，抗癌，抗發炎的特性，和(2)優異之清除自由基能力[3, 4]。因此合理推論可用此電化學特性來同時提升微生物產電及脫色效能，所以亦會推論運用到染料廢水處理之可行性。本研究尤其對天然深色中草藥進行相關脫色研究，並篩選可能具有抗氧化能力的生物能量藥材進行後續應用評價，以利於未來應用於廢水處理及保健及醫療食品之相當領域中。就以丁香、金銀花等中草藥萃液進行評估發現，其電子轉移能效率($n^e \ll 1$)較低，主因是中草藥乃複雜混合物，其電子轉移能力較為溫和所致，在未來應用上可能要優先此點才行，本研究並對相關影響因子(如：pH、溫度、萃取方式及濃度)來深入比較分析，以利後續應用。

2. 材料與方法

2.1. 中草藥萃取液

中草藥廢棄物由於歷經數千年中醫學臨床應用，確認在適量下，屬安全無生物毒性之天然植物，因此評估其回收再利用之可行性更加重要。首先模擬廢棄物取定金銀花(*Lonicera japonica*)、丁香(*Syzygium aromaticum*)、麻黃(*Ephedra sinica*)、乾薑(*Zingiber officinale*)、葛根(*Pueraria montana*)等22種常見之中草藥來評估，為求可行之再現性，先以新鮮2.5g 切碎磨細，溶於50mL的50%乙醇溶液中(酒萃)，浸泡30分鐘，再以減壓濃縮在攝氏65℃下煮沸2小時，進行抽氣過濾，取其藥萃液，再以去離子水將其定量至50mL，以利後續評估分析。

2.2. 循環伏安法

再將中草藥汁液以氮氣去氧曝氣15分鐘，後掃描1.5V到-1.5V，速率為 $10\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 。由於中草藥本是多元複雜之混合物，因此以六次掃描觀察是否具有穩定氧化還原峰，再將具有此特性之樣品，再進行循環伏安100圈，以觀察其峰隨時間之可逆性穩定變化趨勢。之後再比較微生物脫色前後之生物電化學特性變化差異分析。

2.3. 菌株前培養及脫色

本研究取定自行篩選之脫色菌株 *Shewanella haliotis* WLP72, *Aeromonas* sp NIU01，加入經滅菌後LB培養基配成之培養液(25g/L)，再將菌株分別加入培養液中，進行兩次活化12小時之搖瓶前培養，以利後續染料脫色使用。為檢測其天然植物脫色代謝物是否具促進脫色之能力，將活化後的菌株菌液取1ml及篩選出的有色植物汁液50ml，加入含50 ml，兩倍之LB (1:1 V:V)稀釋後搖瓶培養，再以30 °C、125 rpm條件下搖瓶培養12小時後，開始靜置脫色20 hr以上，分別量測不同時間下菌體密度及染料濃度，由時間曲線估算出微生物生長及脫色效能。

2.4. 微生物電池-交流阻抗與極化曲線

為了評價電池產電之效率，使用線性掃描伏安法(LSV)測量MFC的功率密度(P)和電流密度(I)，並使用萬用表記錄相應的電壓。通過公式 $P = V^2 / (A \times R)$ 和 $I = V / (A \times R)$ 分別計算功率密度(P)和電流密度(I)，電化學阻抗譜(EIS)(HIOKI 3522-50, Japan)測量。EIS)，以二極法MFCs陽極為工作電極，陰極為參考電極與輔助電極，在穩定電壓，擾動振幅為10.0 mV，頻率範圍為 $10^4 \sim 5 \times 10^{-3} \text{Hz}$ 。阻抗圖(EIS curve)與x軸的截距則為實際阻抗(real impedance, Z_{re})，可作為電解質電阻(electrolyte resistance, R_{ele})；而阻抗圖中的曲線在x軸交點後的曲線投影長度是反應動力電阻(kinetic resistance)與質傳電阻(diffusion resistance)之和($R_{kin} + R_{diff}$)將三者總和值則為電池內阻 R_{in} ($R_{ele} + R_{kin} + R_{diff}$)，使用Nyquist圖軟件(Zview 2.6b, Jiehan Tech)收集數據和分析估算電化學特性[2]。

3. 結果與討論

3.1. 新鮮中草藥萃取液之電化學評估

為評估有關各種中草藥有否具有可逆性且穩定電子轉移的特性，再推論是否具有抗氧化及自由基清除的電子

轉移效果，先將中草藥萃取汁液分別進行循環伏安法測試，來初步觀察是否具有促進電子轉移的氧化還原峰。結果發現出許多中草藥在未經過生物處理前，即已具有氧化還原峰(圖1)。文獻指出，氧化還原峰與其抗氧化性可能有關

[2]，故取定具有顯著氧化還原峰之中草藥，來做後續舔化學上電子轉移能力之評估。(註：未能呈現氧化還原峰亦可能是掃描速率不相配及劑量不足問題，並不能完全排除仍可能具有電化學特性之可能，特此說明)

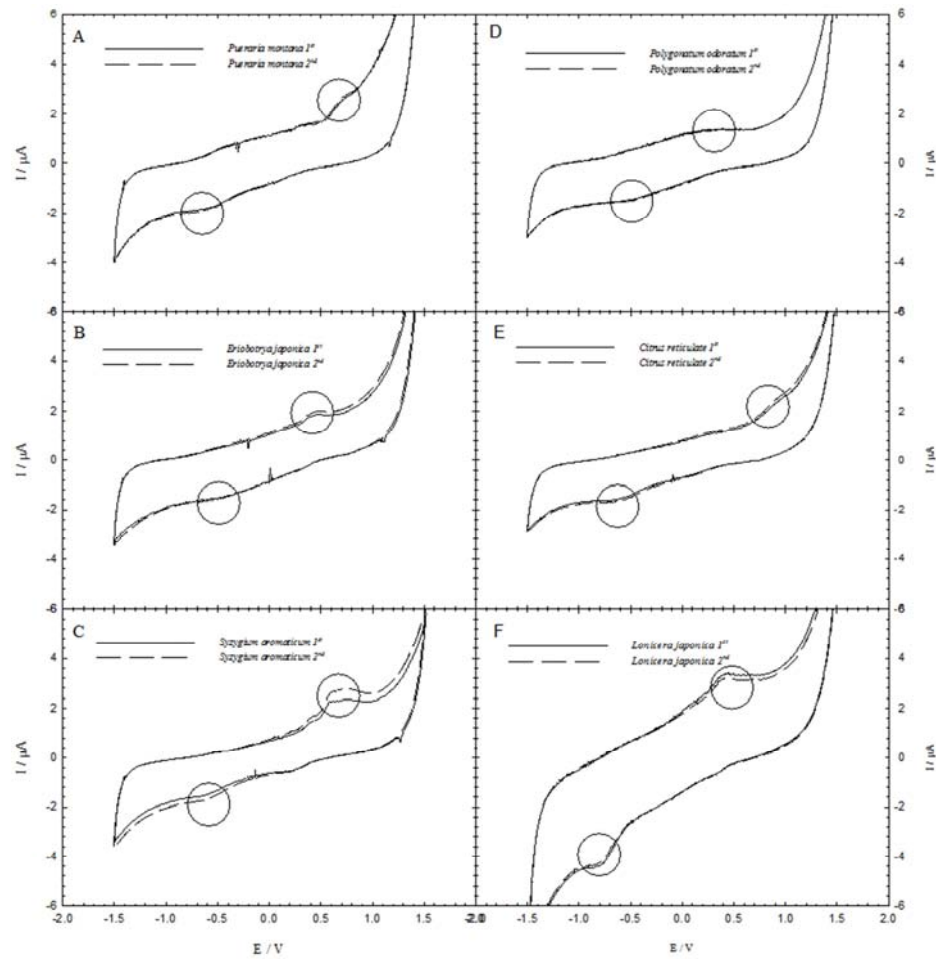


圖1 各種中草藥在未微生物脫色前之循環伏安比較圖譜(圈處代表可能具有氧化還原活性之峰值位置)。

表1 各種中草藥依據氧化還原峰之檢測值估算電子轉移量化之電化學特性比較。

藥材名	藿香	杏仁	紫蘇	葛根	苦參	地黃
	Pogostemon cablin	Prunus armeniaca L	Perilla frutesces	Pueraria montana	Sophora flavescens	Rehmannia glutinosa
nc	-	-	-	0.041	-	-
藥材名	陳皮	枇杷葉	益母草	乾薑	豬苓	麻黃
	Citrus reticulata	Eriobotrya japonica	Leonurus japonicus	Zingiber officinale	Polyporus umbellatus	Ephedra sinica
nc	0.042	0.061	-	0.031	0.055	0.070
藥材名	青皮	柴胡	烏藥	防風	荊芥	薄荷
	Citrus reticulata	Bupleurum chinens	Lindera aggregata	Saposhnikovia divaricata	Schizonepeta tenuifolia	Mentha arvensis
nc	0.050	-	-	0.034	0.052	-
藥材名	玉竹	獨活	地黃	麻黃	薄荷	懷牛藤
	Polygonatum odoratum	Angelica pubescens	Rehmannia glutinosa	Ephedra sinica	Mentha arvensis	Achyranthes bidentata Bl.
nc	0.043	X	-	0.070	-	-
藥材名	金銀花	丁香				
	Lonicera japonica	Syzygium aromaticum				
nc	0.054	0.061				

電子轉移數目 n° : $n^{\circ}=57mV/|E_{pa}-E_{pc}|$, E_{pa} : 氧化峰電位 E_{pc} : 還原峰電位[8]

依據圖1來估算電子轉移數目進行比較(表1)。顯然可知,電子轉移數目(n°)值皆小於1,比先前研究之純化學物孔雀石綠、硫堇等[8]小甚多,亦代表其電子轉移較溫和,亦可能是其萃取藥液雜質甚多,致使其氧化還原峰較為分開,且被稀釋開,因此峰值亦較一般純化合物為不顯著。

事實上,本研究中諸多中草藥已被研究過,其CV圖氧化還原峰位置,與本研究近似相同[3, 9],並且已被證實其氧化還原能力與其所含之多酚和黃酮總量成正相關性(例如:丁香、乾薑)[3],因此推測具明顯氧化還原峰之樣本,更可能亦與其多酚、黃酮含量較高有關。因此以微生物燃料電池來評價各種標的中草藥之生物抑制性及能量效率,實有其必要性存在。此點在後續會進行深入分析評估以利於生物能源相關之精煉應用。

3.2. 溫度對萃液之影響

事實上,既然萃取液即使是具有電化學特性,仍受萃取條件影響甚大。例如:溫度越高理論上萃取效果越好,但有可能會使其部份成份熱分解,而使其氧化還原能力降低,因此需要有利找出最佳適合之溫度,以利後續之研究。

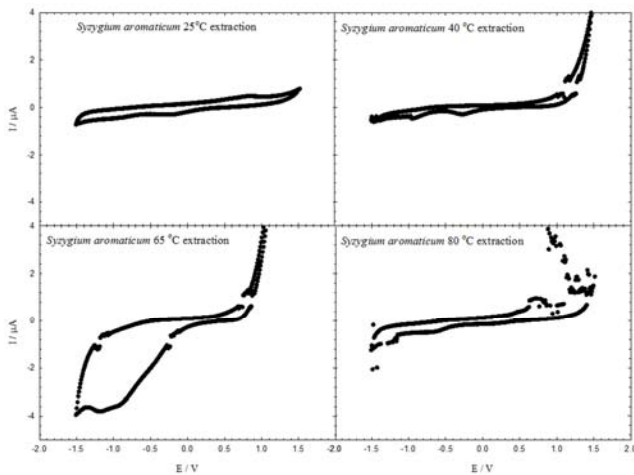


圖2 丁香不同溫度萃取之循環伏安圖譜比較(25°C、40°C、65°C、80°C萃取)

由圖2可看出丁香之萃取溫度取在65°C時,顯然有最佳之電化學特性表現效果,而且由於50%酒精水溶液之沸點約在81°C,在接近沸點時,可能有些抗氧化物質會被破壞干擾,使得循環伏安圖產生許多之雜訊,故後續研究分析實驗皆取定萃取溫度65°C來進行評估分析。

3.3. 萃取液氧化還原峰變化

為瞭解氧化還原峰之電子梭能力是否具只有可逆性,且特性上表現穩定,因此經百次循環掃描(圖3)亦可看出隨著循環伏安掃描次數的增加,氧化還原峰亦逐漸隨之遞減,甚至於在初期遞減最為顯著,到第80圈後幾乎沒有變化,代表在氧化還原過程可能部分產生不可逆的化學物種累積使然。電化學特性之衰減,事實上亦可能代表抗氧化活性可能占優勢之結果,電子梭特性由於是觸媒特性,因

此在百次掃描中會逐漸呈現穩定可逆之表現特性,更代表具有更高電子梭特性之應用可行性。但是在衰減情況來看,由於殘留電子梭成份有限,因此如何有效維持高電子梭能力,可能是後續研究之重點。

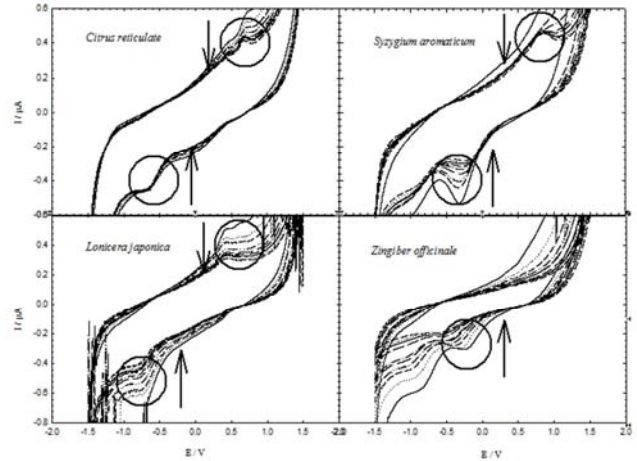
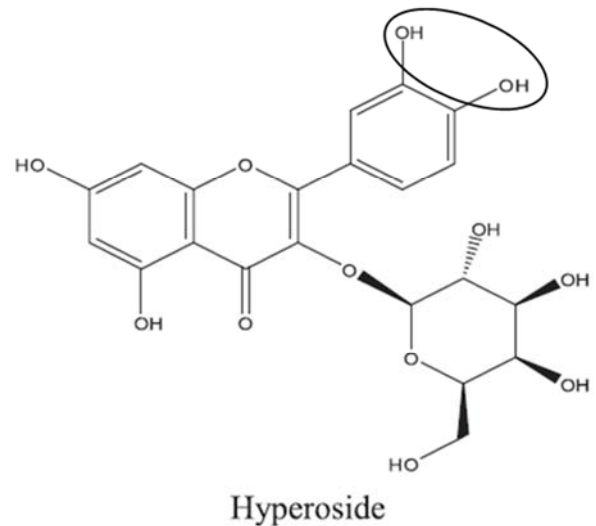


圖3 中草藥 100 圈循環伏安圖譜之變化

由上述的比較中遞減較不明顯之中草藥樣品,推測其電子梭成份仍可能具有相對穩定性,可能可增加促進染料降解及微生物產電。由於此種特性之天然中草藥,中草藥之廢棄物,不只是有機堆肥,極可能被運用到廢水處理以及在食物保鮮或醫療上之能量生物技術上之精煉應用上,後續將進行微生物脫色,以比較其間的能量萃取上之程度差異,定義出工程應用上之效率。

3.4. 抗氧化成份分析

由於文獻中指出抗氧化性可能與其多酚和類黃酮化合物含量統計相關[3],並且已有諸多文獻亦指出多種中草藥富含多酚、類黃酮化合物(例如:金銀花)[4],另外多酚和類黃酮化合物亦已被證實其循環伏安圖譜具有氧化還原峰[5, 6, 7],故合理推論出,中草藥之抗氧化特性與其多酚、類黃酮化合物之成分存在有關。



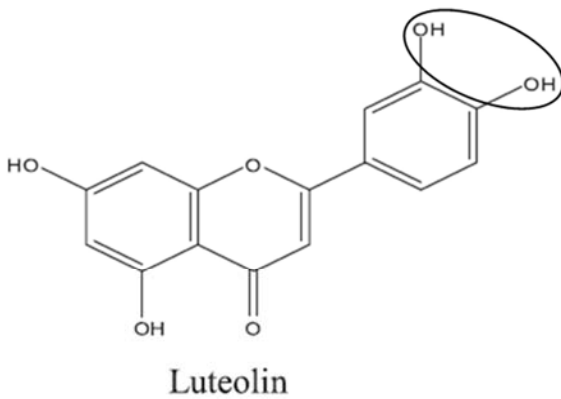


圖4 電子梭可能之多酚和黃酮化合物(引自文獻[4])。

先前研究[1]顯示若苯環上具有鄰位和對位之羥基(-OH)，則此化合物可能具有電子梭功效。本研究中富含多酚或類黃酮之中草藥，由於多是此類含-OH電子媒介特性之化學物種，因此不論是原液或是微生物分解殘液分析，後續將對具電子梭之中草藥萃液做LC/MS及MS/MS來找出確實具電子梭功效的可能化合物物種。

3.5. 劑量效應

即便是中草藥中可能含有具氧化還原峰之化學物質，但是其劑量仍需高於閾值才可有效顯現生物電化學特性之能力，否則其峰值仍無法顯現出來。因此在此對各中草藥作劑量分析探討如(圖5所示)。

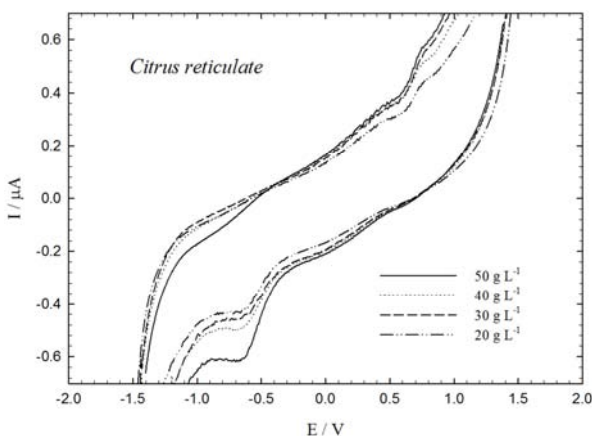


圖5 中草藥不同劑量的循環伏安圖譜變化(以陳皮為例)。

圖5即可明顯看出，陳皮在高劑量(大於 40 g L^{-1})時才具有較明顯之氧化還原峰，若低於其閾值，其氧化還原峰不易觀察，甚至有消失現象，若要使其有效發現電子梭之功效，必須提高劑量高於其閾值，才具有作用。因此除了考慮中草藥有效物種外，其劑量條件亦是必要條件才能起電子梭作用。但是中草藥既是藥，在過高劑量下，仍可能對生物體產生負面效果之抑制毒性，因此有必要進行後續毒性評估以利於優化評價分析。

3.6. 毒性測試

眾所皆知，藥物在閾值濃度以上且在生理上可接受濃度以下方為藥，在過高濃度反成“毒”。因此文獻[8, 9]

指出，中草藥雖然富含天然抗氧化成分，但可能具有抑菌之成份，隨著中草藥濃度的提高，其電子梭之功效雖然提高，但抑菌之能力亦隨之提高，抗菌能力亦可能是其生物抑制毒性所致，因此須找出菌體能承受之最佳電子梭劑量條件，因此進行生物抑制毒性測試，以觀察其生長變化情形。

由生長曲線(數據未列)中可看出隨著丁香濃度之增加，菌體生長飽和菌體最大值隨之降低，並且當劑量高於 6 g L^{-1} ，菌體之濃度無法隨著時間增長而增加，甚至減少。可推測菌體無法承受毒性已然被抑制。在0小時，濃度隨著丁香濃度增加而增加，因其受到丁香萃取液之顏色及其中雜質所影響，故與無添加丁香之值有顯著差異。後續會再以生物呼吸儀或是BOD/COD作為生物分解性指標來定義其毒性作用表徵。

3.7. 酸鹼值影響

由於文獻[10]中指出pH值可能會影響抗氧化物質(即多酚類)清除自由基之能力，而且[11]更顯示pH值會使循環伏安之氧化還原峰產生顯著改變，故需考量不同pH值下是否對中草藥產生之影響進行評價分析。

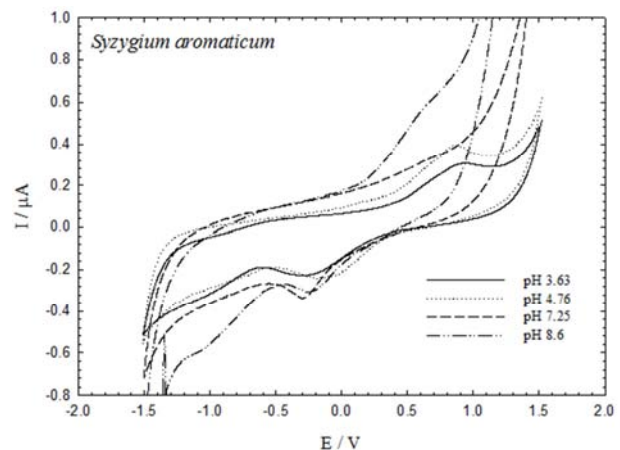


圖6 不同pH環境下丁香循環伏安圖譜之變化比較圖。

事實上，由圖6指出中草藥之萃液大多偏屬酸性，雖然此特性有利於生物體胃腸消化吸收，但在電化學活性表現上，似乎不偏好有利。尤其以丁香為例，其萃液未經處理之pH值約在3.63，因此不利微生物燃料電池的合適操作pH中性偏弱酸條件。圖6可知，抗氧化成分在接近中性偏鹼性時，其氧化還原峰變更為顯著，若將其加入MFCs中，有效pH調控對其氧化還原能力表現會有所增強可應用性提高。

3.8. 中草藥萃取液-交流阻抗與極化曲線(MFC)

為整體評估，經上述初步方法評估後之中草藥萃液添加進入微生物燃料電池中，來評價其產電之功率密度及交流阻抗之生物電化學變化，以利模擬在生物體反應器操作下之生物能源應用之精煉評估。

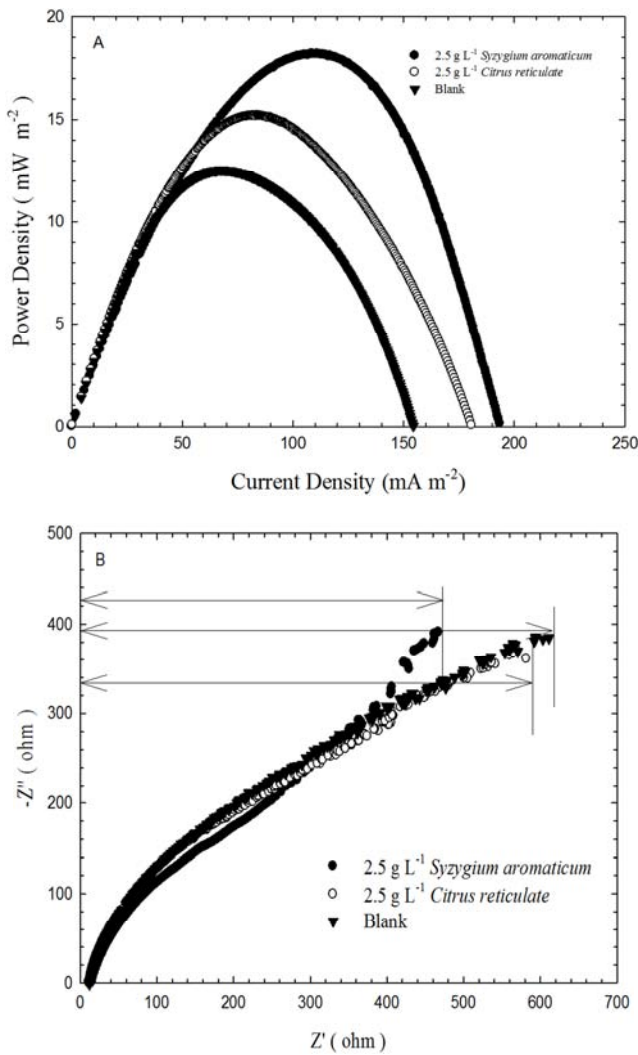


圖7 將中草藥萃液加入微生物燃料電池之 (A) 功率密度 (B) 交流阻抗。

圖7 (A) 可看出由電池功率密度圖來觀察，將丁香與陳皮萃取液分別添加進入MFCs中，其產電功率可由12.56 mW m⁻² 提升至18.21 mW m⁻² 和15.22 mW m⁻² 提升45.0 %和21.2 %的產電效率。圖7 (B) 交流阻抗圖經由換算後更可得表2，可看出添加中草藥萃液後，其電池內阻下降，可由621.74 Ω 下降到481.35 Ω 和593.30 Ω，下降比例22.6 %和4.57 %。因此可確定中草藥萃液確實具有能促進產電之電子梭功效，但如前述，中草藥之電子梭效應屬於較溫和者。值得一提的是，功率密度增加的比例與內阻減少的不甚平行，可能是因為萃液中存在著其他不具備電子梭功效雜質之結果，反可能被用作生長或生理代謝基質，因而導致電池電壓上升，內阻未相對顯著下降之結果。

表2 電池添加不同中草藥之交流阻抗比較表。

MFC condition	R _{elec} (Ω)	R _{kin} + R _{diff} (Ω)	Total R _{in} (Ω)
<i>Syzygium aromaticum</i>	14.079	467.27	481.35
<i>Citrus Reticulate</i>	11.45	581.8	593.30
Blank	10.65	611.09	621.74

4. 結論

本研究中發現大部分中草藥之循環伏安圖譜確實皆具有氧化還原峰。對無氧化還原峰之中草藥，有可能是其濃度仍未達其顯現特性之閾值，因此無法清楚呈現或者是可能由生物分解形成更多莫耳數之多酚化合物，而產生電子梭之效果。根據先前研究推測與其抗氧化成分(如：多酚、類黃酮)有關，並發現其具有高穩定活性，推測其能當作長期促進菌體脫色及產電之溫和作用電子梭，並且添加進微生物燃料電池後，其產電功率上升、內阻下降，確實具有電子梭能力，就其溫和電子中介作用，未來用於食補，能量飲料之可行性一屬可行，因此後續研究將再深入探討其抑制毒性與電子梭性質之交互關係，並且定義出具電子梭之功效成份，和觀察其對脫色促進之情況，來決定最佳化之應用條件及醫療保健方面之可能應用領域及產品上。

致謝

感謝科技部計畫：(MOST104-2622-E-197-006-CC3; MOST105-2622-E-197-012-CC3; MOST105-2221-E-197-022) 之經費補助。

参考文献

- [1] Chen, B.-Y. 2016. Deciphering Electron Shuttles for Bioremediation and Beyond. American Journal of Chemical Engineering, 4(5), 114.
- [2] Qin, L.-J., Han, K., Yueh, P.-L., Hsueh, C.-C., Chen, B.-Y. 2016. Interactive influences of decolorized metabolites on electron-transfer characteristics of microbial fuel cells. Biochemical Engineering Journal, 109, 297-304.
- [3] Przygodzka, M., Zielińska, D., Ciesarová, Z., Kukurová, K., Zieliński, H. 2014. Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. LWT - Food Science and Technology, 58(2), 321-326.
- [4] Shang, X., Pan, H., Li, M., Miao, X., Ding, H. 2011. Lonicera japonica Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. J Ethnopharmacol, 138(1), 1-21.
- [5] Masek, A., Zaborski, M., Chrzescijanska, E. 2011. Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. Food Chem, 127(2), 699-704.
- [6] Ferreira, R.d.Q., Greco, S.J., Delarmelina, M., Weber, K.C. 2015. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. Electrochimica Acta, 163, 161-166.

- [7] Makhotkina, O., Kilmartin, P.A. 2010. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Anal Chim Acta*, 668(2), 155-65.
- [8] Chen, B.-Y., Xu, B., Yueh, P.-L., Han, K., Qin, L.-J., Hsueh, C.-C. 2015. Deciphering electron-shuttling characteristics of thionine-based textile dyes in microbial fuel cells. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 51, 63-70.
- [9] Jabeen, E., Janjua, N.K., Ahmed, S., Murtaza, I., Ali, T., Hameed, S. 2017. Radical scavenging propensity of Cu^{2+} , Fe^{3+} complexes of flavonoids and in-vivo radical scavenging by Fe^{3+} -primuletin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 171, 432-438.
- [10] Cui, H., Ma, C., Lin, L. 2016. Synergetic antibacterial efficacy of cold nitrogen plasma and clove oil against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on lettuce. *Food Control*, 66, 8-16.
- [11] Min, K.Y., Kim, H.J., Lee, K.A., Kim, K.T., Paik, H.D. 2014. Antimicrobial activity of acid-hydrolyzed Citrus unshiu peel extract in milk. *J Dairy Sci*, 97(4), 1955-60.
- [12] Martinez, S., Valek, L., Petrović, Ž., Metikoš-Huković, M., Piljac, J. 2005. Catechin antioxidant action at various pH studied by cyclic voltammetry and PM3 semi-empirical calculations. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 584(2), 92-99.
- [13] Ismaiel, M.M., El-Ayouty, Y.M., Piercey-Normore, M. 2016. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Braz J Microbiol*, 47(2), 298-304.