

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

Cu titlu de manuscris

C.Z.U 573.6.086.83 : 663.1

VALUȚA ANA

BIOTEHNOLOGIA CULTIVĂRII SURSEI
DE ANTIOXIDANȚI – CIANOBACTERIEA *NOSTOC LINCKIA*

167.01 - BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

Cepoi Liliana, doctor în științe
biologice, conferențiar cercetător

Autor:

Valuța Ana

CHIȘINĂU, 2015

© Ana Valuța, 2015

CUPRINS

ADNOTĂRI	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. ANTIOXIDANȚI DIN CIANOBACTERII – TEHNOLOGII DE OBȚINERE ȘI PERSPECTIVE DE UTILIZARE.....	17
1.1. Tehnologii de cultivare a cianobacteriilor.....	18
1.1.1. Izolarea și selecția culturilor de producători.....	19
1.1.2. Optimizarea mediilor de cultură și parametrilor de cultivare.....	19
1.1.3. Sistemele și principiile biologice de cultivare industrială a microalgelor...	24
1.2. Cianobacteriile – surse de antioxidanți.....	31
1.2.1. Antioxidanții macromoleculari ai cianobacteriilor.....	33
1.2.2. Antioxidanții cu masa moleculară joasă ai cianobacteriilor.....	36
1.3. Tehnologii de obținere a antioxidanților din cianobacterii.....	39
1.4. Utilizarea antioxidanților din cianobacterii.....	43
1.5. Concluzii la capitolul 1	45
2. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI COMPONENTA BIOCHIMICĂ A BIOMASEI DE <i>NOSTOC LINCKIA</i> PE DURATA CICLULUI VITAL.....	47
2.1. Materiale și metode de cercetare.....	49
2.2. Modificarea cantității și calității biomasei de <i>Nostoc linckia</i> pe durata ciclului vital în condiții de producere și de laborator	54
2.3. Modificarea activității antioxidante a extractelor din biomasa de <i>Nostoc linckia</i> pe durata ciclului vital.....	60
2.4. Concluzii la capitolul 2.....	68
3. EXTRAGEREA ȘI PĂSTRAREA COMPONENTELOR CU EFECT ANTIOXIDANT DIN BIOMASA DE <i>NOSTOC LINCKIA</i>.....	69
3.1. Materiale și metode de studiu.....	70
3.2. Selectarea solventului optimal pentru obținerea complexelor antioxidante din biomasa de <i>Nostoc linckia</i>	71
3.3. Stabilirea condițiilor de conservare a proprietăților antioxidante ale extractelor hidro-etanolice obținute în baza biomasei de <i>Nostoc linckia</i>	70
3.3. Concluzii la capitolul 3.....	90
4. ELABORAREA TEHNOLOGIILOR COMPLEXE NONPOLUANTE DE CULTIVARE A <i>NOSTOC LINCKIA</i> ȘI DE OBȚINERE A PREPARATELOR ANTIOXIDANTE.....	91
4.1. Modificarea activității antioxidante la <i>Nostoc linckia</i> sub influența compușilor coordinați ai fierului (III) cu bazele Schiff și cu aminoacizi.....	92

4.1.1. Influența compușilor coordinativi ai Fe(III) cu aminoacizi asupra parametrilor biotehnologici la <i>Nostoc linckia</i>	93
4.1.2. Influența compușilor coordinativi ai Fe(III) cu bazele Schiff asupra parametrilor biotehnologici la <i>Nostoc linckia</i>	98
4.1.3. Utilizarea compusilor noi cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic pentru sporirea activității antioxidante la <i>Nostoc linckia</i>	103
4.2. Utilizarea reziduului de biomasă de <i>Nostoc linckia</i> după extragerea antioxidantilor pentru sinteza nanoparticulelor de argint.....	105
4.3. Utilizarea biomasei reziduale de <i>Nostoc linckia</i> în calitate de biosorbent.....	110
4.3.1. Utilizarea biomasei reziduale de nostoc în calitate de biosorbent pentru purificarea apelor reziduale contaminate cu crom și nichel.....	113
4.3.2. Bioacumularea microcomponentelor metalice din soluții polimetalice...	116
4.4. Tehnologia complexă de cultivare a cianobacteriei <i>Nostoc linckia</i> , de obținere a preparatelor antioxidante și de utilizare a reziduului de biomasă.....	121
4.5. Concluzii la capitolul 4.....	128
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	130
BIBLIOGRAFIE	132
ANEXE	148
Anexa 1. Brevete de invenție MD 4253, MD 4326, MD 4327.....	149
Anexa 2. Act de implementare a tehnologiei de obținere a preparatului antioxidant NostocAntiOx.....	152
Anexa 3. Diplome la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale.....	154
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	158
CV-ul AUTORULUI	159

ADNOTARE

Valuța Ana „Biotehnologia cultivării sursei de antioxidanți – cianobacteria *Nostoc linckia*”. Teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2015.

Teza conține introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 292 titluri, 3 anexe, 131 pag text de bază, 49 figuri, 10 tabele. Rezultatele sunt publicate în 24 lucrări.

Cuvintele cheie: Tehnologie de cultivare, cianobacterii, *Nostoc linckia*, extracte hidrice și etanolice, preparate antioxidante, biosorbent, bionanosinteză.

Domeniul de studiu: 167.01 - Biotehnologie, bionanotehnologie .

Scopul lucrării: elaborarea tehnologiei complexe nonpoluante de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia*, de obținere a preparatelor cu efect antioxidant și de valorificare a reziduului de biomasă.

Obiectivele lucrării: Monitorizarea modificărilor biochimice și a activității antioxidante a biomasei și extractelor din ea pe durata dezvoltării culturii statice de *Nostoc linckia*; Evidențierea indicatorilor biotehnologici cu tangență la ciclul vital, utili pentru obținerea preparatelor antioxidante din biomasa de *N. linckia*; Stabilirea parametrilor biotehnologici optimi de extragere și păstrare pe termen lung a componentelor cu efect antioxidant din biomasa de nostoc; Elucidarea particularităților modificării conținutului componentelor antioxidante în biomasa cianobacteriei *N. linckia* în condiții de stres oxidativ indus prin acțiunea compușilor Fe(III); Studiul posibilității valorificării reziduului de biomasă de *N. linckia* după extragerea componentelor antioxidante; Elaborarea tehnologiei complexe de cultivare a *N. linckia*, de obținere a preparatelor cu efect antioxidant și de utilizare a reziduului de biomasă în calitate de matrice pentru bionanosinteză și în calitate de biosorbent în purificarea mediului.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată este pusă problema elaborării unei tehnologii complexe de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* ca sursă pentru obținerea preparatelor cu efect antioxidant. Pentru prima dată a fost demonstrată eficiența biomasei reziduale de nostoc în calitate de matrice pentru sinteza nanoparticulelor de argint. Pentru prima dată a fost elaborată o tehnologie de cultivare a *Nostoc linckia*, care include etapa de valorificare a reziduului de biomasă după extragerea antioxidanților în calitate de biosorbent eficient pentru metalele grele.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în identificarea elementelor-cheie a procesului biotehnologic de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu scopul producerii preparatelor cu efect antioxidant și valorificării reziduului de biomasă.

Semnificația teoretică. Au fost acumulate și expuse rezultate noi despre importanța monitorizării modificărilor biochimice și a statutului antioxidant ale biomasei de *Nostoc linckia* pe durata ciclului culturii statice. A fost evidențiat pragul înalt de sensibilitate a culturii de *Nostoc linckia* față de compușii chimici cu metale în ceea ce privește modificarea statutului antioxidant al biomasei. A fost demonstrată eficiența biomasei de nostoc în calitate de matrice pentru bionanosinteză și în calitate de biosorbent în sistemele multimetalice poluate.

Valoarea aplicativă a lucrării. În cadrul acestei lucrări au fost elaborate părțile componente ale unei tehnologii complexe de cultivare a *Nostoc linckia* și utilizare eficientă a biomasei obținute, care pot fi aplicate atât într-un ansamblu, cât și în calitate de unități autonome: procedee de obținere a biomasei de nostoc cu activitate antioxidantă înaltă; procedee de extragere eficientă a componentelor cu efect antioxidant din biomasa de nostoc; procedee de obținere a biomasei de nostoc cu nanoparticule de Ag; procedee de utilizare a reziduului de biomasă de nostoc după obținerea preparatelor antioxidante în calitate de biosorbent eficient.

Implementarea rezultatelor științifice. Tehnologia de obținere a preparatului antioxidant NostocAntiOx a fost implementată la SRL „Ficotehfarm” (Act Nr.03/11 din 20.11.2014).

АННОТАЦИЯ

Валуца Анна “Биотехнология культивирования источника антиоксидантов - цианобактерии *Nostoc linckia*”. Диссертация кандидата биологических наук, Кишинев, 2015 .

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и рекомендаций, библиографического списка из 292 наименований, 3 приложения, 131 страниц основного текста, 49 рисунков, 10 таблиц. Результаты исследований опубликованы в 24 работах.

Ключевые слова: технология культивирования, цианобактерии, *Nostoc linckia*, водные и спиртовые экстракты, антиоксидантные препараты, биосорбент, бионаносинтез.

Область исследования: 167.01 – Биотехнология, бионанотехнология.

Цель: Разработка комплексной экологически чистой технологии выращивания цианобактерии *Nostoc linckia*, получения препаратов, обладающих антиоксидантным эффектом и переработки отходов биомассы.

Задачи работы: мониторинг биохимического состава и изменений антиоксидантной активности экстрактов биомассы на протяжении цикла развития статической культуры *Nostoc linckia*; выявление биотехнологических показателей, имеющих отношение к жизненному циклу, важных для получения антиоксидантных препаратов из биомассы *Nostoc linckia*; оценка изменения содержания антиоксидантных веществ в биомассе цианобактерии в условиях окислительного стресса, вызванного координационными соединениями Fe(III); изучение возможности использования отходов биомассы после экстракции антиоксидантов; разработка комплексной биотехнологии культивирования *Nostoc linckia* и получения антиоксидантных препаратов, а также использования отходов биомассы в качестве матрицы для биосинтеза наночастиц серебра и в качестве эффективного биосорбента металлов для очистки окружающей среды.

Научная новизна и оригинальность. Впервые поставлена задача разработки технологии культивирования цианобактерии *Nostoc linckia* в качестве сырья для получения комплексных антиоксидантных препаратов. Впервые была доказана возможность использования отходов биомассы ностока в качестве матрицы для бионаносинтеза. Впервые была разработана технология культивирования ностока, которая включает также и этап использования отходов биомассы в качестве эффективного биосорбента.

Важная научная задача, решенная в данной работе, состоит в том, что были выявлены основные составляющие биотехнологического процесса культивирования цианобактерии *Nostoc linckia* в целях получения антиоксидантных препаратов и переработки отходов биомассы.

Теоретическое значение. Были накоплены новые данные о значении мониторинга биохимических изменений и изменений антиоксидантного статуса биомассы ностока на протяжении жизненного цикла. Был выявлен высокий порог чувствительности культуры *Nostoc linckia* по отношению к химическим соединениям, содержащим металлы. Была доказана эффективность использования отходов биомассы ностока в качестве сорбента.

Практическое значение. Были разработаны способы получения биомассы ностока с высокой антиоксидантной активностью; способы экстракции антиоксидантов из биомассы ностока; способы получения биомассы ностока с наночастицами серебра и с высокой антиоксидантной активностью; способы использования остатка биомассы в качестве биосорбента и матрицы для биосинтеза наночастиц серебра.

Внедрение результатов. Технология получения антиоксидантного препарата NostocAntiOX была внедрена на ООО "Ficotehfarm " (Акт о внедрении № 01-10 от 20.10.2013).

ANNOTATION

Valuta Ana „Biotechnology for cultivation of the source of antioxidants – cyanobacterium *Nostoc linckia*” PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2015

The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 292 references. It comprises 131 pages of the main text, 49 figures, 10 tables and 3 annexes. The results were published in 24 scientific papers.

Keywords: Technology of cultivation, cyanobacteria, *Nostoc linckia*, aqueous and ethanolic extracts, antioxidant preparation, biosorbent, and bionanosynthesis.

Field of study: 167.01 – Biotechnology, Bionanotechnology.

Aim: To develop cultivation technologies of cyanobacteria *Nostoc linckia*, obtaining the antioxidant preparations and valorization of the biomass residue.

Objectives: Monitoring the biochemical changes and antioxidant activity of biomass and extracts during static culture of *Nostoc linckia* development; Highlighting the biotechnology indicators with tangency to vital cycle, useful for antioxidant preparations obtaining from biomass of *Nostoc linckia*; Determining the optimal biotechnological parameters for extraction and long term storage of antioxidant components from *Nostoc* biomass; Elucidation of the peculiarities for modification of antioxidant content in the biomass of cyanobacteria *Nostoc linckia* under oxidative stress induced by Fe(III) compounds; Study the possibility of recovery of biomass residue after extraction of *Nostoc linckia* antioxidant components; Development of complex technology of *Nostoc linckia* cultivation, antioxidant preparations obtaining; use of biomass residue as an effective biosorbent in the environmental purification technologies and for silver nanoparticles biosynthesis.

Scientific novelty of research. For the first time the problem of developing the cultivation technology of cyanobacteria *Nostoc linckia* as a source for obtaining the antioxidant complex preparations was stated.

Important scientific problem, solved in this research work, is to identify the key-elements of the biotechnology process of *Nostoc linckia* cultivation in order to use biomass for production of antioxidant preparations.

Theoretical signification. There were collected and exposed new results about the importance of monitoring the changes in biochemical and antioxidant status of *Nostoc linckia* biomass during static culture cycle. It was revealed high sensitivity threshold of the culture of *Nostoc linckia* to chemical compounds with metals in terms of modifying the antioxidant status of biomass. It was demonstrated effectiveness of *Nostoc* biomass as biosorbent in polluted multimetallic systems and as matrix for bionanosynthesis.

Practical value. In this paper were making the parts of complex technology of *Nostoc linckia* cultivation and efficient use of biomass, which can be applied as a whole and as autonomous units: procedures for *Nostoc* biomass with high antioxidant activity; efficient extraction procedures of antioxidant components from *Nostoc* biomass; procedures for obtaining the biomass with silver nanoparticles; procedures for the use of biomass residue after obtaining the antioxidant preparations as effective biosorbent.

Implementation of scientific results. Technology of obtaining the antioxidant preparation AON was implemented at LTD "Ficotehfarm" (Implementation Act Nr. 03/11 from 20.11.2014).

LISTA ABREVIERILOR

ABTS	2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolina-6- acidului sulfonic
APX	ascorbat peroxidaza
BAU	biomasă absolut uscată
CNM-CB	Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene –Cianobacterii
CRFC	capacitatea de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu
CRFM	capacitatea de reducere a reagentului fosfo-molibdenic
CT	catalaza
DAM	dialdehida malonică
DPPH	1,1 difenil-2-picril hidrazil
EAM	extragere asistată de microunde
EAU	extragere asistată de ultrasunet
EFP	extragere în fluide presurizate
EFS	extragere în fluide supercritice
FBR	fotobioreactor
GPX	glutation peroxidaza
LDL	Low-density lipoprotein (lipide cu densitatea joasă)
POx	peroxidazele
SOD	superoxiddismutaza
SRO	specii reactive ale oxigenului
TEAC	echivalentul trolox al activității antiradicalice

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor. În ultima perioadă interesul în ceea ce privește alternativa naturală în schimbul a tot ceea ce este obținut prin sinteză chimică este tot mai mare. Substanțele naturale cu proprietăți antioxidante și antiradicalice capătă o aplicare tot mai largă în industria alimentară, cosmetică, și, în special, în cea farmaceutică în calitate de remedii eficiente în contracararea acțiunii nefaste a radicalilor liberi și în stoparea proceselor prooxidante, care generează diferite stări patologice [143, 167, 188, 218]. Remarcăm că utilizarea antioxidantilor sintetici este tot mai limitată datorită activității lor suspectate ca și promotori de carcinogenează, precum și de o respingere certă de către consumatori a aditivilor alimentari sintetici. Astfel, administrarea de antioxidanți naturali are o importanță majoră și perspective benefice pronunțate în menținerea statutului redox normal al organismului. Cianobacteriile, printre care și speciile genului *Nostoc*, de rând cu faptul că sunt cunoscute ca biofertilizatori, posedă un potențial imens în calitate de surse pentru producerea de antioxidanți care însumează enzime antioxidante, pigmenți, polizaharide funcționale, vitamine, compuși fenolici, etc. [58, 76, 94; 118, 142; 179]. Valoarea cianobacteriilor ca sursă de antioxidanți naturali este în continuare consolidată prin ușurința relativă de purificare a compușilor țintă. Totodată, activitatea antioxidantă pronunțată a cianobacteriilor este datorată și distribuției lor cosmopolite, de unde evolutiv au fost înzestrate cu mult mai multe mecanisme de menținere a viabilității decât orice alte organisme biologice. Intensitatea sintezei componentelor cu acțiune antioxidantă și antiradicalice se modifică esențial pe parcursul ciclului de dezvoltare a culturilor, dar și sub acțiunea unor factori externi. Raportul cantitativ al acestor principii biologic active determină caracterul acțiunii antioxidante a biomasei și respectiv a extractelor sau a preparatelor complexe obținute în baza acestei biomase. Tehnologiile de cultivare a cianobacteriilor și în particular a tulpinilor de *Nostoc linckia* în scopul de a obține diferiți antioxidanți urmează a fi axate atât pe respectarea necesităților fiziologice ale culturii pe durata fluxului tehnologic, cât și pe utilizarea rațională a posibilităților de modificare a statutului antioxidant al biomasei.

Necesitatea în antioxidanți naturali este argumentată atât din punct de vedere științific, cât și din punct de vedere al cerinței pieții acestor produse. Produsele naturale, inclusiv cele cu efect antioxidant, sunt mai atractive datorită acceptării de către marea majoritate a populației instruite a modului sănătos de viață, unul dintre componentele căruia este utilizarea produselor de origine naturală în schimbul celor obținute prin diferite tipuri de sinteză [64]. Motivele expuse au dat un impuls simțitor cercetărilor orientate spre identificarea noilor surse de antioxidanți naturali, precum și a procedeele de obținere a preparatelor eficiente, standardizate și sigure pentru utilizarea de către om. Printre obiectele ce prezintă interes în acest sens sunt cianobacteriile.

Biomasa acestora conține numeroase componente care asigură protecția celulelor de acțiunea dăunătoare a speciilor reactive de oxigen, acționând ca antioxidanți preventivi, care blochează procesele de formare a radicalilor liberi; prevenind peroxidarea lipidelor și formarea radicalilor lipidici; stingând reacțiile de autooxidare și oxigenul singlet; acționând ca factori de chelare a metalelor cu valența variabilă, inhibând acțiunea enzimelor prooxidante [33, 123, 189]. La moment este stabilit, că biomasa cianobacteriilor din genul *Nostoc*, inclusiv specia *Nostoc linckia*, conține un șir de substanțe cu efect antioxidant și antiradicalic, așa ca pigmentii ficobilinici și cei carotenoizi, enzime antioxidante, polizaharide, inclusiv cele sulfatate ș.a. [98, 99, 119, 171]. Sumând aici și faptul, că printre reprezentanții cianofitelor *Nostoc linckia* este lipsit de efecte toxice asupra organismelor vii, fiind utilizat în hrană peste 2000 mii ani, considerăm oportune cercetările orientate spre elaborarea tehnologiilor de cultivare a acestei culturi biotehnologice în calitate de sursă de produse bioactive.

Scopul lucrării constă în elaborarea tehnologiei complexe nonpoluante de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia*, de obținere a preparatelor cu efect antioxidant și de valorificare a reziduului de biomasă.

Obiectivele lucrării:

- Monitorizarea modificărilor biochimice și a activității antioxidante a biomasei și extractelor din ea pe durata dezvoltării culturii statice de *Nostoc linckia*;
- Evidențierea indicatorilor biotehnologici cu tangență la ciclul vital, utili pentru obținerea preparatelor antioxidante din biomasa de *Nostoc linckia*;
- Stabilirea parametrilor biotehnologici optimi de extragere și păstrare pe termen lung a componentelor cu efect antioxidant din biomasa de *Nostoc*;
- Elucidarea particularităților modificării conținutului de componente antioxidante în biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia* în condiții de stres oxidativ indus prin acțiunea compușilor Fe(III);
- Studiul posibilității valorificării reziduului de biomasă de *Nostoc linckia* după extragerea componentelor cu efect antioxidant;
- Elaborarea tehnologiei complexe de cultivare a *Nostoc linckia*, de obținere a preparatelor cu efect antioxidant și de utilizare a reziduului de biomasă în calitate de biosorbent eficient în tehnologiile de purificare a mediului și în calitate de matrice pentru biosinteza nanoparticulelor de argint.

Noutatea științifică. Pentru prima dată este pusă problema elaborării unei tehnologii de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* ca sursă pentru obținerea preparatelor complexe cu

efect antioxidant. Pentru prima dată a fost elaborată o tehnologie de cultivare a *Nostoc linckia*, care include etapa de valorificare a reziduului de biomasă după extragerea antioxidantilor în calitate de biosorbent eficient pentru metalele grele și în calitate de matrice pentru biosinteza nanoparticulelor de argint.

Problema științifică importantă soluționată constă în identificarea elementelor-cheie a procesului biotehnologic de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu scopul producerii preparatelor cu efect antioxidant și valorificării reziduului de biomasă.

Semnificația teoretică. Au fost acumulate și expuse rezultate noi despre importanța monitorizării modificărilor biochimice și al statutului antioxidant ale biomasei de *Nostoc linckia* pe durata ciclului culturii statice. A fost evidențiat pragul înalt de sensibilitate a culturii de *Nostoc linckia* față de compușii chimici cu metale în ceea ce privește modificarea statutului antioxidant al biomasei. A fost demonstrată eficiența biomasei de nostoc în calitate de biosorbent în sistemele multimetalice poluate și matrice pentru biosinteza nanoparticulelor de argint.

Valoarea aplicativă a lucrării. În cadrul acestei lucrări au fost elaborate părțile componente ale unei tehnologii complexe de cultivare a *Nostoc linckia* și utilizare eficientă a biomasei obținute care pot fi aplicate atât într-un ansamblu, cât și în calitate de unități autonome: procedee de obținere a biomasei de nostoc cu activitate antioxidantă înaltă; procedee de extragere eficientă a componentelor cu efect antioxidant din biomasa de nostoc; procedee de obținere a biomasei de nostoc cu nanoparticule de Ag; procedee de utilizare a reziduului de biomasă de nostoc după obținerea preparatelor antioxidante în calitate de biosorbent eficient și în calitate de matrice pentru biosinteza nanoparticulelor de argint.

Aprobarea rezultatelor științifice. Materialele expuse în teza de doctorat au fost comunicate la: Conferința a V-a internațională "Actual Problems in Modern Phycology", Chișinău, 2014; cea de-a VI-a conferință internațională a tinerilor cercetători "Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution", Odessa; Ucraina, 2013; Conferința științifică internațională interdisciplinară "Biologically active substances and materials: Fundamental and Applied Problems", Novii Svet, Ucraina, 2013; Conferința științifico-practică internațională a tinerilor cercetători "Pontus Euxinus"; Sevastopol, Ucraina, 2013; Cea de-a doua conferință internațională în Nanotehnologie și Inginerie biomedicală, Chișinău, Moldova, 2014; Conferința internațională dedicată celei de-a 55-a aniversare de la fondarea Institutului de Chimie al AȘM; Chișinău, Moldova, 2014; cel de-al III-lea simpozion național cu participare internațională "Biotehnologii avansate – realizări și perspective, Chișinău, Moldova, 2013.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele sunt reflectate în 24 publicații științifice: 9 articole în reviste recenzate (2 – în reviste cu factor de impact; 2 - în monoautorat), 12 rezumate ale

comunicărilor științifice, 3 brevete de invenție.

Volumul și structura tezei. Teza constă din 4 capitole; are un volum de bază de 131 pagini, conține 10 tabele și 49 figuri. Lista surselor bibliografice citate include 292 titluri.

Cuvintele cheie: Tehnologie de cultivare, cianobacterii, *Nostoc linckia*, extracte hidrice și etanolice, preparate antioxidante, biosorbent, bionanosinteză.

Sumarul compartimentelor tezei. Teza constă din 4 capitole, primul dintre care prezintă analiza situației din domeniu, iar următoarele trei reflectă contribuțiile metodice și rezultatele propriilor cercetări.

Capitolul 1 „Antioxidanți din cianobacterii – tehnologii de obținere și perspective de utilizare”. Capitolul cuprinde analiză amplă a tehnologiilor contemporane de cultivare a cianobacteriilor. Sunt comparate sistemele deschise și închise în care are loc creșterea diferitor tulpini valoroase de cianobacterii, evidențiate avantajele și dezavantajele cultivatoarelor contemporane. Sunt analizați factorii de bază care influențează rezultatul procesului biotehnologic de obținere a biomasei cianobacteriene. Se atrage, de asemenea, atenție la cheltuielile energetice și de resurse, necesare pentru realizarea procesului tehnologic. Este prezentată o amplă caracteristică a substanțelor cu efect antioxidant, care au fost depistate în biomasa cianobacteriilor de către diferiți cercetători. Se pune accent pe faptul, că biomasa cianobacteriilor include componente, care acoperă toată gama de mecanisme ale protecției antioxidante (de prevenire a formării radicalilor liberi; de stingere a radicalilor cu ajutorul componentelor enzimatică și non-enzimatică și de reparare a deteriorărilor, apărute ca rezultat al interacțiunii radicalilor liberi cu macromoleculele biologice). Datorită acestei diversități cianobacteriile pot fi considerate surse universale pentru elaborarea preparatelor complexe de antioxidanți, care ar asigura protecția pe toate liniile de acțiune a radicalilor în sistemele vii. În acest compartiment mai este analizat și aspectul posibilității modificării cantitative și calitative a complexului de antioxidanți (ori a fiecărui component în parte) prin aplicarea diferitor factori fizici și chimici. Sunt aduse exemple de răspuns prompt al cianobacteriilor la stresul oxidativ prin modificări în conținutul antioxidantilor cu masa moleculară mică.

Capitolul include o caracteristică comparativă a tehnologiilor contemporane, care sunt utilizate în prezent pentru extragerea componentelor cu efect antioxidant din biomasa cianobacteriană. Este demonstrat că actualmente există cerere pronunțată din partea diferitor companii în ceea ce ține de tehnologiile simple, ieftine și eficiente de obținere a preparatelor antioxidante. După o analiză a domeniilor de utilizare a antioxidantilor, se ajunge la concluzia, că *Nostoc linckia*, care și-a avut întrebuințare doar în calitate de biofertilizator, ori ca produs alimentar în zone geografice foarte mici poate deveni un obiect ficobiotehnologic de valoare

pentru obținerea produselor antioxidante, atât datorită componenței biomasei, cât și cerințelor minime în procesul de cultivare industrială. În final este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia, sunt definite scopul și obiectivele prezentei lucrări.

Capitolul 2 „Activitatea antioxidantă și componența biochimică a biomasei de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital”

Capitolul este dedicat cercetărilor orientate spre elucidarea aspectelor specifice de dezvoltare a culturii statice de nostoc. Este făcută o paralelă între parametrii monitorizați la creșterea *Nostoc linckia* în condiții de laborator și în condiții de producere. Au fost stabilite modificările în conținutul de proteine totale, ficobiliproteine, lipide, polizaharide, fenoli pe durata ciclului vital. Au fost monitorizate modificările activității antiradicalice în extracțele hidrice și hidro-etanolice obținute din biomasa de nostoc la diferite etape ale ciclului vital. În scopul aprecierii nivelului de siguranță a biomasei de nostoc, a fost monitorizat nivelul de acumulare în biomasă a produselor peroxidării lipidelor (dialdehida malonică). A fost stabilit, că atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere ciclul vital al culturii statice de *Nostoc linckia* relevă un model de creștere caracteristică, iar durata optimă din punct de vedere biotehnologic este de 12 zile în condiții de producere, și 10 zile în condiții de laborator. În condiții de laborator, datorită transferului de cultură în condiții similare cu cele pentru obținerea inoculului, faza de latență este practic imperceptibilă, iar în condiții de producere are aspect clasic cu lipsa completă a creșterii culturii. Pe durata ciclului vital modificările cantitative ale principalelor componente ale biomasei de nostoc au limite destul de restrânse, ceea ce caracterizează cultura de *Nostoc linckia* ca una cu grad ridicat al homeostaziei. Aceasta ușurează semnificativ manipularea culturii în condiții industriale și simplifică procedurile din cadrul tehnologiilor aplicate. Rezultatele testelor DPPH, ABTS și CRRM demonstrează, că cultura de nostoc în condiții de laborator manifestă un comportament mai variat în ceea ce ține de acumularea componentelor antioxidante hidro- și etanol solubile. Astfel, prin fluctuații valorice se manifestă perioada de latență, începutul și mijlocul fazei de creștere exponențială, perioada de declin. În condiții de producere este evidentă o singură variație a capacității de reducere a radicalilor liberi la începutul ciclului vital. Cei mai stabili parametri pentru cultura de nostoc în condiții de laborator se obțin la ziua a 10-11-a de cultivare, ce corespunde fazei staționare. Această perioadă se caracterizează prin cel mai înalt nivel al biomasei și cea mai stabilă activitate antiradicalică și antioxidantă. În condiții de producere, perioada de recoltare a biomasei în aceleași scopuri poate fi extinsă. Nivelul scăzut al DAM în biomasa de *Nostoc*

linckia la etapele recomandate pentru cultivarea biomasei confirmă siguranța acestei biomase, precum și a produselor, care ulterior pot fi obținute din ea.

Capitolul 3 „Extragerea și păstrarea componentelor cu efect antioxidant din biomasa de *Nostoc linckia*”

Capitolul este dedicat cercetărilor care au avut drept scop de a scoate în evidență principalii factori ce intervin în procesul de extragere a componentelor bioactive cu activitate antioxidantă din biomasa de *Nostoc* și asigurarea unor parametri optimali ai procesului de obținere a unui produs calitativ, activ și sigur pentru consumul uman și animal.

Cercetările orientate spre elaborarea unor tehnologii de obținere a preparatelor antioxidante în baza biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia* au permis determinarea componentelor care stau la baza cercetărilor efectuate. Au fost determinate condițiile de obținere a extractelor antioxidante din biomasa nativă de *Nostoc linckia*. A fost determinat solventul optimal, concentrațiile lui și durata procesului de extragere. Prin compararea rezultatelor obținute la extragerea principiilor antioxidante cu etanol și metanol de diferite concentrații a fost demonstrată posibilitatea aplicării etanolului la toate etapele de obținere a preparatelor cu efect antioxidant și antiradicalic.

Extractele hidrice, hidro-etanolice și etanolice din biomasa de *Nostoc* se caracterizează prin activitate antioxidantă determinată de diferite componente. Degradarea în timp a extractelor din biomasa de *Nostoc* poate fi încetinită prin suplimentarea unor cantități extrem de mici de antioxidanți sintetici. Au fost aplicați antioxidanții: tocoferol, soluție etanolică; acid ascorbic, soluție hidrică și trolox, soluție etanolică. A fost specificat antioxidantul propus spre suplimentare în dependență de tipul extractului obținut.

A fost demonstrată capacitatea complexului antioxidant, obținut din biomasa nativă de *Nostoc* de a proteja uleiurile vegetale de oxidare agresivă, indusă de condițiile de păstrare. Implicarea componentelor antioxidante din biomasa de *Nostoc* în procesul de protecție oxidativă este susținută de testele antioxidante nespecifice care au demonstrat creșterea activității antioxidante a uleiurilor vegetale suplimentate cu complex antioxidant din *Nostoc*.

Extractele hidrice, etanolice și hidro-etanolice din biomasa de *Nostoc* posedă un nivel diferit de activitate antioxidantă și de stabilitate, care pot fi modificate prin aplicarea dozelor minimale de stabilizatori.

Capitolul 4 „Elaborarea tehnologiilor complexe nonpoluante de cultivare a *Nostoc linckia* și de obținere a preparatelor antioxidante”

În acest capitol sunt descrise rezultatele studiului posibilității modificării statutului antioxidant al biomasei de *Nostoc* prin acțiunea diferitor compuși chimici (compuși coordinativi

cu diferiți liganzi). Spre deosebire de alte culturi ficologice așa ca *Dunaliella salina* și *Porphyridium cruentum*, care au răspuns prompt la aceste acțiuni, *Nostoc linckia* s-a dovedit a fi destul de inert. Astfel, cu toate că pentru anumiți compuși au fost stabilite efecte de sporire a anumitor componente ale biomasei, activitatea antioxidantă a extractelor complexe rămânea în limitele normei, iar în unele cazuri a fost înregistrată o creștere semnificativă a procesului de acumulare a produselor peroxidării lipidice. Din toată gama de compuși testați doar patru au dus la creștere vizibilă a activității antioxidante a biomasei de nostoc. Aceștia sunt N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil-amino) carbazolul, 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazolul, compusul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (unde L1 - hidrazida acidului izonicotinic) și compusul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (unde L2 - hidrazida acidului inicotinic). Primii doi compuși asigură creșterea activității antioxidante a extractului etanolic de 70% alcool etilic cu concentrația de 1 mg/ml substanța activă, obținut în baza biomasei de nostoc de 2,11-2,73 ori față de varianta martor, iar compușii fierului cu bazele Shiff sporesc activitatea antiradicalică a extractelor hidrice din biomasa de nostoc până la 95% inhibiție ABTS^{•+}. Odată cu creșterea activității antioxidante a extractului etanolic crește și valoarea biomasei de nostoc în calitate de producător de substanțe antioxidante.

Proprietățile compușilor 1-($\Delta^{8,13}$ -Biciclohomo-farnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazolul și N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil-amino)carbazolului prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulatori al activității antioxidante al biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*. Aceste rezultate au stat la baza elaborării și obținerii a două brevete de invenție în colaborare cu colegii chimiști care au realizat sinteza compușilor (Brevet MD 4326, Brevet MD 4327) [1,2].

În legătură cu creșterea interesului științific și practic față de biosinteza diferitor nanoparticule, în lucrare sunt aduse argumente în susținerea afirmației, că biomasa reziduală de *Nostoc linckia* este o matrice eficientă pentru biosinteza nanoparticulelor de argint. Sinteza nanoparticulelor a fost monitorizată timp de 72 ore. În cazul nanoparticulelor de argint importanța acestui studiu revine din destinația acestora. Nanoparticulele de sinteză biologică sunt precăutate în calitate de preparate anticancerigene, iar în acest caz asocierea cu o înaltă activitate antioxidantă ar oferi remedii eficiente care au mari perspective de valorificare în viitor. Rezultatele demonstrează, că la 24 ore de la declanșarea bionanosintezei biomasa de nostoc poate fi considerată sursă atât de nanoparticule, cât și de antioxidanți.

A fost studiată posibilitatea de utilizare a biomasei reziduale după extragerea componentelor antioxidante în calitate de biosorbent eficient pentru metalele grele. A fost demonstrat, că reziduul de biomasă poate acumula cantități considerabile de Ni, Cr, Fe, Zn ș.a. A

fost studiată posibilitatea de utilizare a biomasei de nostoc pentru acumularea cromului și nichelului din apele reziduale ale industriei galvanice. După un contact de 30 min între apele reziduale cu conținut înalt de crom și biomasa de nostoc are loc acumularea a 84% din ionii acestui metal. Paralel cu aceasta biomasa mai acumulează și ionii de fier și zinc, iar concentrația acestora în biomasă după 30 min crește de 6 și 8 ori respectiv. De asemenea are loc o acumulare activă a cobaltului, cuprului care sunt prezenți în apele reziduale respective. În cazul apelor reziduale cu conținut înalt de nichel biomasa de nostoc timp de 30 min de contact acumulează până la 50% din ionii prezenți.

Biomasa de nostoc rămasă după extragerea componentelor antioxidante a fost testată și în sisteme multicomponente ce simulează componența metalică a apelor reziduale de la solubilizarea alcalină a uraniului din minereu. A fost demonstrat, că biomasa de nostoc asigură recuperarea eficientă a fierului, zincului, cromului și cuprului. Cromul din această sistemă se acumulează în proporție de 69 %, zincul – de 72%, fierul de 61%. Cel mai înalt nivel de retenție a fost înregistrat pentru Cu(II). Pentru acest element nostocul asigură acumularea a 86% din cantitatea prezentă în soluția de cercetat. Astfel, biomasa de *Nostoc linckia* după extragerea componentelor antioxidante se transformă în produs deosebit de prețios cu proprietăți de biosorbent de performanță.

A fost elaborată schema realizării tehnologiei complexe de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* și de obținere a preparatelor antioxidante, care include nu numai procedeele de cultivare a cianobacteriei în condiții controlate și cele de obținere a preparatelor antioxidante eficiente în anihilarea radicalilor liberi, ci și procedeele de utilizare a reziduului de biomasă, rămas după extragerea componentelor antioxidante în bionanosinteză ori în procesul de purificare a apelor reziduale ce conțin metale.

1. ANTIOXIDANȚI DIN CIANOBACTERII – TEHNOLOGII DE OBȚINERE ȘI PERSPECTIVE DE UTILIZARE

Creșterea spectaculoasă a interesului față de antioxidanți în ultimul timp este determinată în mare măsură de faptul, că multe stări patologice, maladii complicate, procese de îmbătrânire a organismelor sunt asociate cu stresul oxidativ. Generarea speciilor reactive ale oxigenului (SRO), speciilor reactive ale azotului (SRN) și ale clorului este o consecință inevitabilă a vieții în mediul cu conținut de oxigen. Celulele produc SRO în procesele metabolice normale, acestea având funcții fiziologice importante de protecție antimicrobiană și antifungică, de transducție de semnal. SRO sunt derivate ale oxigenului caracterizate prin reactivitate chimică înaltă și abilitate de a acționa în calitate de oxidanți. La această categorie se referă radicalii liberi - specii ce conțin electroni necuplați cu reactivitate înaltă, așa ca superoxidul O_2^- și hidroxilul $\text{OH}^\cdot$ și molecule așa ca peroxidul de hidrogen H_2O_2 și peroxinitritul $\text{ONOO}^\cdot$ care nu sunt radicali, dar pot fi de asemenea agenți oxidanți în sistemele biologice. În condiții fiziologice normale există un echilibru între generarea SRO și activitatea sistemelor antioxidante care diminuează cantitatea speciilor reactive [23, 31, 97, 191, 289, 291]. Producerea excesivă de SRO ori diminuarea activității sistemelor antioxidante duce la starea de stres oxidativ. Stresul oxidativ duce la deteriorarea lipidelor, ADN-ului și proteinelor, ceea ce se asociază cu diferite stări patologice, inclusiv maladia Alzheimer, artrita reumatoidă, astma, diabetul, și în special maladiile cardiovasculare [105, 176].

Atunci când sistemul antioxidant propriu nu face față cantității de radicali liberi, este necesar de a suplini aportul de substanțe cu efect antiradicalic din exterior, fiind prezente două alternative posibile – utilizarea antioxidanților sintetici sau a celor naturali. Consumatorul în cele mai multe cazuri pledează pentru produsele naturale din această cauză, cercetările orientate spre evidențierea noilor surse și a noilor tehnologii de obținere a produselor cu efect antioxidant rămân a fi deosebit de actuale. Astfel de cercetări, în cazul că au drept scop obținerea unui produs finit, trebuie să includă mai multe componente: elaborarea și optimizarea tehnologiilor destinate obținerii materiei prime – a biomasei - din care vor fi obținute preparatele; elaborarea metodelor de apreciere a calității biomasei, adică a conținutului de compuși de interes și a nivelului de inofensivitate și siguranță durabilă pentru consumator; elaborarea procedeelelor eficiente de extragere și procesare ulterioară a componentelor active din biomasă; elaborarea procedeelelor de păstrare în timp a proprietăților antioxidante a preparatelor elaborate și evidențierea domeniilor de utilizare a produselor finite.

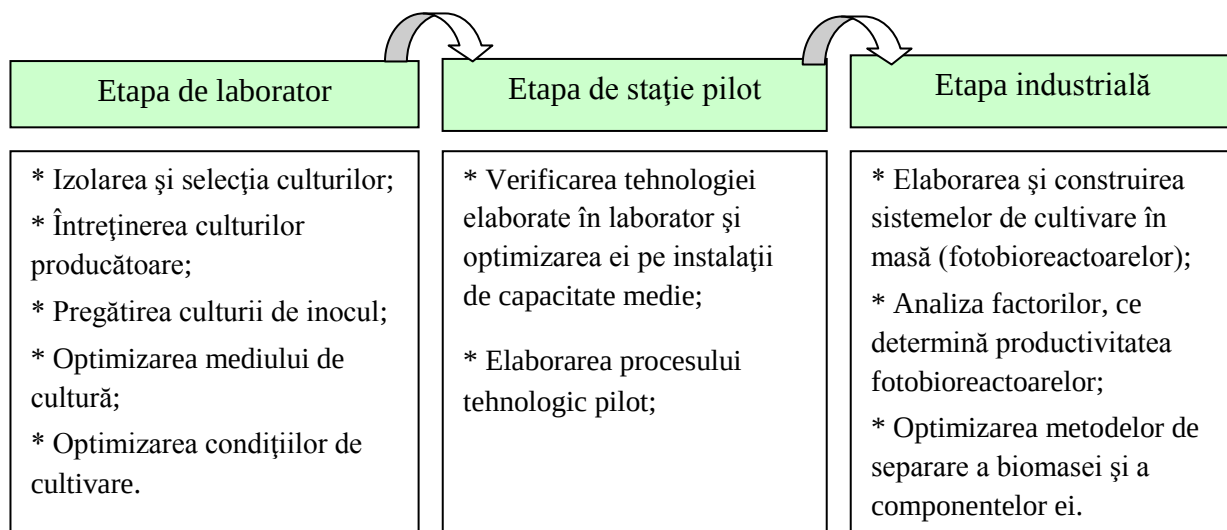
1.1. Tehnologii de cultivare a cianobacteriilor

Cianobacteriile reprezintă una dintre cele mai vechi și cele mai de succes forme de viață pe Pământ. Lunga istorie evolutivă și modul de viață fotoautotrof le-a permis să colonizeze diverse habitate, fiind în prezent cel mai important grup de organisme din punct de vedere numeric [177, 219]. Biomasa globală a cianobacteriilor se estimează la mii de milioane tone, însă exploatarea acestor surse de către om este insuficientă, chiar dacă potențialul lor biotehnologic este înalt apreciat la nivel global.

Cea mai mare parte din biomasa microalgă utilizată în scopuri biotehnologice este produsă industrial, fie prin cultivare extensivă cu asigurarea unei iluminări și a unui schimb suficient de gaze (cultivare autotrofă), fie prin cultivare alternativă cu utilizarea substraturilor organice în calitate de sursă de carbon și energie (cultivare mixotrofă sau heterotrofă). Chiar dacă de la apariția sa în anii 1940 ficologia aplicată a marcat realizări importante în cultivarea și valorificarea microalgelor ca obiecte biotehnologice, nivelul producției globale a biomasei algale este încă jos (9.000 -10.000 t substanță uscată pe an), iar prețul biomasei este înalt, variind de la 10 la 300 EUR kg⁻¹ [67]. Varietatea și valoarea produselor obținute din biomasa algă, precum și utilizarea largă a microalgelor în procesul de prelucrare a apelor reziduale, fertilizare a solului, obținerea de biocombustibil etc. dictează necesitatea perfecționării continue a tehnologiilor de cultivare [56, 66, 93, 101, 224, 228, 265].

Elaborarea și industrializarea tehnologiilor de cultivare în masă a microalgelor, inclusiv a cianobacteriilor, presupune parcurgerea mai multor etape în cercetări la nivel de laborator, pilot și industrial, conform schemei ce urmează.

În continuare vom analiza cele mai importante etape ale acestui proces prin prisma cercetărilor realizate până în prezent din momentul când cultivarea în masă a microalgelor a devenit o realitate.



1.1.1. Izolarea și selecția culturilor de producători

Principiile de bază ale culturii microbiene sunt, în linii generale, aplicabile și în cazul cianobacteriilor. Totuși, aceste obiecte de studiu posedă o capacitate unică, ce le deosebește de alte microorganisme și anume fotosinteza. De aceea iluminarea este o condiție obligatorie pentru izolarea, cultivarea și menținerea culturilor fotoautotrofe și mixotrofe.

Izolarea microalgelor începe prin *selectarea surselor* (probele de sol sau apă sunt colectate din diverse habitate), urmată de *îmbogățirea culturii* pe medii și în condiții specifice obiectului dat, *izolarea propriu-zisă* prin transferarea celulelor pe medii sterile și *producerea culturii axenice* prin tehnicile cunoscute în practica biotehnologică.

Screening-ul tulpinilor izolate în vederea identificării moleculelor bioactive se efectuează prin *metode directe* (determinarea produsului-țintă specific) sau *indirecte* (determinarea activității biologice a produsului dorit). Aici trebuie să menționăm progresele importante în elaborarea metodelor și aparaturii de înaltă performanță ce permit o detectare rapidă, selectivă și exactă a produselor metabolice microalgale. Astăzi pentru identificarea produselor algale de importanță biotehnologică (pigmenți, acizi grași, lipide, polizaharide etc.) se utilizează pe larg cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), gaz cromatografia (GC), spectrometria de masă (MS) și spectrometria de rezonanță magnetică nucleară (NMR) [88, 243]. La fel, și testele biologice indirecte cunosc o dezvoltare și perfecționare continuă, fiind aplicate în cazul determinării activității antibiotice și antitumorale a metaboliților algali [212].

Mii de culturi algale au fost izolate din habitatele lor naturale, dar numai câteva din ele au ajuns să fie cultivate pe scară largă în scopuri industriale. Procesul de identificare a tulpinilor de interes biotehnologic este unul de lungă durată, fiind dependent de mai mulți parametri. Unul din parametrii puțin studiați, dar foarte importanți pentru cultivarea mai ales în sistemele deschise, este specificitatea ecologică a tulpinilor izolate de cianobacterii. Mai multe studii efectuate asupra diferitor tulpini de *Athrospira (Spirulina)* izolate din diverse medii, au demonstrat un răspuns variabil la acțiunea factorilor mediului. Această variabilitate ar trebui să stea la baza selectării culturilor de interes biotehnologic: de exemplu, tulpini foto-, termo- sau osmotolerante. Utilizarea de către producătorii industriali a culturii de inocul mixte este o cale de a compensa lipsa unor tulpini producătoare adaptate la anumiți factori ai mediului [30, 120].

1.1.2. Optimizarea mediilor de cultură și parametrilor de cultivare

Alegerea mediului de cultură reprezintă o etapă cheie în cultivarea microalgelor ce a fost întotdeauna printre preocupările majore ale specialiștilor, deoarece poate influența aspectele economice ale procesului de producție.

În linii generale, exigențele nutritive ale microalgelor sunt legate de modul de nutriție predominant fotoautotrof. A.Vonshak a sistematizat factorii nutritivi de importanță majoră pentru elaborarea rețetelor mediilor de nutriție, după cum urmează [249]: conținutul total de săruri minerale, care este determinat de habitatul de proveniență a tulpinii; - compoziția celulară în ce privește componentele ionice majore: K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^- , Cl^- ; sursele de azot (nitrat, amoniu, uree); sursa de carbon (CO_2 sau HCO_3^-); pH-ul; microelementele și agenții de chelare (de exemplu EDTA); vitaminele.

De obicei formulele mediilor de cultură sunt calculate în așa fel, încât aportul nutrienților să fie în exces ca să nu devină un factor limitativ. Însă e important de a ține cont de scopul cultivării tulpinii respective: menținerea culturii în colecție, cultivarea ei pentru obținerea unei cantități optime de biomasă, sau cultivarea ei în condiții de stres pentru biosinteza produselor valoroase vor necesita diferite formule ale mediilor nutritive. În scopuri aplicative nutrienții pot fi intenționat administrați în concentrații limitative. De exemplu, la cultivarea *Dunaliella salina* excesul de azot și salinitatea joasă contribuie la obținerea unei cantități optime de biomasă, pe când salinitatea înaltă și conținutul redus de azot contribuie la sporirea carotenogenezei.

Conform rezultatelor multiplelor cercetări, pentru creșterea și dezvoltarea organismelor fotoautotrofe sunt necesare aproximativ 30 elemente nutritive. Majoritatea din aceste macroelemente (în g/l) și microelemente (în mg/l) se regăsesc în mediile nutritive cunoscute în practica ficobiotehnologică: mediile BG-1, Allen modificat, Bold, Gromov - utilizate pentru cultivarea algelor verzi și cianobacteriilor; mediile Sorokin și Krauss elaborate special pentru *Chlorella*; mediul Zaroukk - pentru *Spirulina*; mediul Ben-Amotz și Avron elaborat pentru *Dunaliella* [91]. Cei mai importanți nutrienți pentru creșterea autotrofă sunt carbonul, azotul și fosforul.

Carbonul. Aprovizionarea cu CO_2 și HCO_3^- este cea mai importantă condiție pentru asigurarea unei rate înalte a producției autotrofe. Spre deosebire de plantele de cultură, bioxidul de carbon din atmosferă nu poate satisface necesitățile sistemelor de biosinteză de randament înalt ale algelor autotrofe. De exemplu, difuzia CO_2 în sistemele deschise de cultivare pot susține o productivitate de maximum $10 \text{ g/m}^2/\text{zi}$. Sistemul $CO_2 - H_2CO_3 - HCO_3^- - CO_3^{2-}$ este cel mai bun mod de control și menținere a nivelului pH-ului optimal pentru speciile cultivate de microalge [68, 81, 91, 235]. Pentru cultivarea mixotrofă a unor specii de microalge se folosesc și alte surse de carbon, cum ar fi glucidele, acizii organici sau alcoolul. De exemplu, acidul acetic este utilizat pentru controlul pH-ului la cultivarea culturilor mixotrofe de *Chlorella* și *Chlamydomonas reinhardtii*, iar pentru majorarea productivității microalgei *Porphiridium cruentum* se folosesc cu succes alcoolii [12, p.297-320].

Azotul este un alt nutrient important ce contribuie la producerea de biomasă. Conținutul său în biomasa algală variază de la 1% la 10% (în dependență de specie, nivelul de aprovizionare și disponibilitatea sa în mediu), constituind elementul de bază al tuturor proteinelor structurale și funcționale din celula algală. Mai mulți compuși sunt utilizați de către alge în calitate de sursă de azot, dar cel mai des în mediile nutritive acest element este adăugat sub forma de nitrat (NO_3), amoniu (NH_4) sau uree. Unele cianobacterii au o particularitate specifică de a fixa azotul atmosferic, adică a reduce N_2 în NH_4 , proces catalizat de către enzima nitrogenaza [213]. În general, în condițiile suplinirii suficiente cu azot, microalgele au o capacitate redusă de producere a compușilor de stocare a azotului. O excepție de la această regulă sunt cianoficina și ficocianina, compuși de stocare a azotului din celulele numeroaselor tulpini de cianobacterii [12, p.173-227]. De aceea primul răspuns al acestor organisme la epuizarea sursei de azot este reducerea cantității de ficobilisomi. Un alt răspuns tipic la insuficiența de azot este acumularea componentelor organice, cum ar fi polizaharidele și lipidele. De fapt, până la atingerea pragului limită a conținutului de azot din celulă, procesul de fotosinteză continuă (fie chiar și la o rată scăzută). În acest caz fluxul de carbon este redirecționat de la calea de sinteză a proteinei spre căile de sinteză fie a lipidelor, fie a polizaharidelor. Numeroase studii confirmă acest fapt pentru diferite grupe taxonomice. O altă reacție vizibilă a celulelor algale la insuficiența de azot este decolorarea celulelor (reducerea cantitativă a clorofilelor și sporirea cantității de carotenoizi). Această reacție caracteristică multor specii de alge este utilizată în scopul stimulării sintezei bunăoară a β -carotenului la *Dunaliella salina* sau astaxantinei la *Haematococcus pluvialis*. Cercetările efectuate de Zhekisheva ș.a. [262] arată interdependența, în cazul epuizării rezervelor de azot, a proceselor de sinteză a astaxantinei și a acidului oleic la *Haematococcus pluvialis*, fapt ce contribuie la menținerea conținutului înalt al esterilor astaxantinei în celulă. Deci, suplinirea adecvată a acestui important nutrient este un factor ce nu trebuie neglijat în procesul optimizării mediilor de cultură pentru biotehnologia algală.

Fosforul este un element esențial pentru creșterea microalgelor, având un rol important în astfel de procese metabolice cum ar fi transferul de energie, sinteza acizilor nucleici etc. Sursa preferată de fosfor pentru microalge este ortofosfatul (PO_4^{2-}), incorporat în componentele organice prin intermediul diferitor tipuri de fosforilare, iar asimilarea sa este dependentă de energie. Deși conținutul său în biomasă nu depășește 1%, fosforul este deseori factorul limitativ principal în biotehnologia algală, datorită proprietății sale de a se lega ușor cu alți ioni formând precipitat și devenind neasimilabil. O capacitate importantă a algelor este cea de a depozita excesul de fosfor sub formă de granule polifosfatice în timpul așa zisei „asimilări de lux”. Aceste rezerve pot fi utilizate ulterior în cazul deficienței de fosfați.

La fel ca și azotul, fosforul influențează compoziția biomasei, mai ales conținutul de lipide și carbohidrați. Insuficiența de fosfor de asemenea duce la acumularea β -carotenului și astaxantinei, însă într-o măsură mai mică decât în cazul azotului. Spre deosebire de azot, insuficiența fosforului duce la degradarea neesențială a ficobilisomilor, fapt care poate fi explicat prin multiplicarea mai rapidă a celulelor ce conțin noi ficobilisomi. Și în sfârșit menționăm importanța raportului N:P în mediile nutritive, care nu numai că determină potențialul productiv, dar și influențează menținerea dominanței speciei cultivate [91].

Alte elemente, agenți de chelare. Majoritatea microelementelor (Fe, Cu, Mn, Zn, Mo, Co) din formulele mediilor nutritive sunt indispensabile pentru funcționarea enzimelor și sinteza compușilor de importanță biotehnologică. Printre elementele prezente obligatoriu în mediile de cultură, un rol important îi revine fierului datorită proprietăților sale redox și implicării în astfel de procese metabolice fundamentale, cum ar fi fotosinteza, respirația, azotfixarea și sinteza ADN. Pe de o parte, insuficiența Fe duce la degradarea c-ficocianinei și clorofilei a în celulă, iar pe de altă parte, excesul de Fe (II) în culturile algale poate provoca un stres oxidativ cu multiple schimbări fiziologice [144, 168]. Cercetările efectuate în acest domeniu atestă o influență de stimulare înaltă a compușilor coordinativi ai fierului asupra sintezei ficobilinelor la *Nostoc linckia* (de 3-3,5 ori) și ficocianinelor, carotenoizilor, activității SOD la *Spirulina platensis* [12, 173-227]. Sinteza acetat-indusă a astaxantinei la *Haematococcus pluvialis* este semnificativ îmbunătățită în prezența Fe (II), iar influența stimuloare a compușilor coordinativi ai Fe (III) cu aminoacizi a stat la baza elaborării unor tehnologii de sinteză dirijată a acestui compus prețios [9].

Ca și în cazul fosforului, asimilarea microelementelor este limitată de capacitatea lor de a se lega cu alți constituenți nutritivi, sedimentându-se. Adăugarea în mediul nutritiv a agenților de chelare, EDTA de exemplu, atenuează aceasta problemă.

Condițiile de cultivare. De rând cu parametrii chimici (factorii nutritivi), parametrii fizici (condițiile de cultivare) au un rol important în modelarea metabolismului, deci și a compoziției biochimice a celulelor algale. Sensibilitatea celulelor algale la influența factorilor mediului (iluminare, temperatură, turbulență, salinitate) este pe larg folosită în biotehnologie pentru obținerea componentei celulare prognozate.

Iluminarea. Influența iluminării asupra componentelor biochimice ale algelor fotosintetizante este pe larg controlată de procesul de fotoadaptare, când celulele algale suferă schimbări biochimice, fiziologice, biofizice și structurale pentru a intensifica procesul de fotosinteză și creștere [170]. O tendință comună a răspunsului celular la diminuarea intensității luminii este de a mări cantitatea pigmenților fotosintetici: clorofila a, clorofila b, clorofila c,

ficobiliproteinele, carotenoizii primari. Intensificarea iluminării induce diminuarea cantitativă a pigmentilor implicați în procesul de fotosinteză și sporirea cantității carotenoizilor secundari cu rol fotoprotector (β -carotenul, zeaxantina, astaxantina). Intensitatea înaltă a luminii duce la mărirea cantității de polizaharide în celulele algale. Pentru cultura *Porphyridium aerugineum* a fost înregistrată o triplare a conținutului de polizaharide la triplarea iluminării. La cultivarea în bazine deschise a spirulinei, sinteza carbohidraților este mult mai înaltă în zile cu soare. Numeroase studii atestă o dependență invers proporțională a conținutului de lipide, în special a acizilor grași polinesaturați, de intensitatea luminii [42].

Temperatura. Influența temperaturii asupra reacțiilor biochimice determină rolul ei important în dirijarea compoziției biochimice a microalgelor. Este bine studiată acțiunea temperaturii asupra conținutului cantitativ și calitativ al lipidelor membranare. Temperaturile mai joase decât cele optime sporesc gradul de nesaturare a lipidelor din sistemele membranare, ceea ce duce la o stabilitate și fluiditate mai mare a membranelor celulare și prin urmare, asigură protecția aparatului fotosintetic contra fotoinhibării la temperaturi joase. De asemenea s-a constatat, ca temperaturile mai joase decât cele optime pot duce la un nivel sporit de sinteză a enzimelor în calitate de mecanism adaptiv de menținere a fotosintezei și respirației [163]. Temperaturile joase induc acumularea polioliilor și aminoacizilor în calitate de solutanți compatibili, ceea ce poate spori toleranța microalgelor la răcire [62]. Temperaturile înalte au un efect stimulator asupra sintezei carotenoizilor: mărirea temperaturii de la 20° C la 30° C duce la dublarea cantității totale de carotenoizi sau triplarea cantității de astaxantină la *Haematococcus* și *Chlorococcum* sp. [141].

Salinitatea. Importanța acestui factor pentru biotehnologie este determinată de perspectiva utilizării apelor sărate pentru cultivarea industrială a microalgelor. Fiind prezente în biotopurile cu variații semnificative ale salinității, microalgele și cianobacteriile pot servi drept model pentru studiul răspunsului organismelor fotosintetizante la stresul osmotic. Diferite aspecte ale adaptării cianobacteriilor la salinitate înaltă au fost studiate și trecute în revistă [44, 122, 175, 177]. Ca răspuns la stresul salin microalgele sunt capabile să acumuleze molecule mici în calitate de substanțe osmoreglatoare (glicerol, manitol, galactitol, sorbitol, sucroză, trehaloză). De exemplu, capacitatea fenomenală a microalgei *Dunaliella salina* de a se adapta la modificarea bruscă a condițiilor osmotice se datorează capacității de a-și schimba concentrația intracelulară de glicerol, care poate atinge până la 50% din biomasa uscată [27].

Turbulența. Acest factor este foarte important mai ales pentru cultivarea în masă a microalgelor. În condițiile când aportul de nutrienți este constant și condițiile de cultivare nu limitează creșterea culturii, agitarea cu scopul creării turbulenței devine factorul decisiv al

productivității înalte. Acest proces este important nu numai pentru asigurarea schimbului de nutrienți și metaboliți dintre cultură și mediu, dar și pentru mărirea frecvenței ciclului fazelor de lumină și întuneric, ducând prin urmare la sporirea eficienței fotosintezei [90].

Efectul sinergic al combinării factorilor chimici și fizici asupra compoziției celulare. Asimilarea nutrienților depinde de toți factorii fizici ce influențează creșterea algală. Pe parcursul fazei luminoase a fotosintezei asimilarea nutrienților va fi constantă în condițiile unei iluminări satisfăcătoare. Și mai importantă este sinergia dintre intensitatea luminoasă și temperatură asupra asimilării nutrienților. Unele cercetări atestă influența razelor ultraviolete asupra asimilării azotului de către fitoplancton: excluderea razelor ultraviolete duce la sporirea asimilării azotului, care în cazul ureei a înregistrat o creștere de la 17% la 130% [65]. A fost demonstrat efectul combinat al mai multor factori fizici asupra conținutului de pigmenți la *Dunaliella*. La modificarea salinității mediului de cultivare de la 1-30% NaCl pentru cele 9 tulpini în studiu s-a observat că raportul dintre carotenoizi și clorofilă rămâne neschimbat egal cu 1. În același timp, combinarea salinității înalte cu temperatură înaltă și iluminare intensă duce la sporirea cantității de β -caroten [48]. O influență cumulativă stimulatorie a stresului salin și a compușilor coordinativi ai Fe(III) s-a observat și în cazul acumulării biomasei și conținutului de lipide la *Dunaliella salina* [8]. Un alt exemplu elocvent al influenței sinergice a factorilor combinați a fost demonstrat de către Steinbrenner și Linden [230], care au studiat sinteza stres-indusă a astaxantinei la *Haematococcus pluvialis* și au observat că producerea astaxantinei a atins nivel maxim la aplicarea simultană a 3 factori: iluminare intensă, salinitate înaltă și prezența ferului. Combinarea a doi factori (iluminare excesivă și prezența compușilor coordinativi ai ferului sau zincului) au stat la baza elaborării unor tehnologii de producere a biomasei de hematococ cu un conținut sporit de astaxantină [9]. În cazul culturii de *Nostoc sp.* a fost stabilită legătura dintre toleranța la salinitate mărită și conținutul de exopolizaharide extracelulare, stresul salin provocând sporirea cantitativă a exopolizaharidelor capsulare până la 65% din biomasa uscată [257].

1.1.3. Sistemele și principiile biologice de cultivare industrială a microalgelor

În elaborarea sistemelor de cultivare în masă a cianobacteriilor, de rând cu totalitatea microalgelor de interes tehnologic, chiar de la început au fost aplicate două abordări principale:

1) cultivarea în rezervoare deschise: lacuri naturale și artificiale, cascade, bazine circulare sau bazine de tip pistă cu recirculare;

2) cultivarea în fotobioreactoare închise cu iluminare naturală sau artificială: tuburi transparente, panouri orizontale sau verticale aranjate în formă de bucle serpentine, bobine flexibile sau trepte, în interiorul cărora suspensia microalgă este în continuă circulație [195].

Sistemele de cultivare de tip deschis sunt utilizate pe larg în biotehnologia algală. Tabelul 1 prezintă o clasificare a sistemelor ce se referă la această categorie:

Tabelul 1.1. Clasificarea sistemelor deschise de cultivare

Tipul	Exemple	Destinația, parametrii de producere	Referințe bibliografice
Lacuri naturale	Lacurile alcaline din Chad	Recoltarea biomasei de <i>Arthrospira</i>	[18]
	Craterele vulcanice din Myanmar	Recoltarea biomasei de <i>Arthrospira</i> producția medie: 30 tone/an	[169]
Bazine naturale	Caracol în Mexic (compania Sosa Texcoco)	Cultivarea <i>Arthrospira maxima</i> pentru producerea biomasei, 40 ha, 300 tone/an	[25]
	Lagunele din Australia exploatare de: Western Biothechnology Ltd Henkel Co	Cultivarea <i>Dunaliella</i> pentru producerea de β -caroten 250 ha, 7 tone β -caroten/an 460 ha, 10 tone β -caroten/an	[27]
Sisteme înclinate (cascade)	Roupite (Bulgaria)	Cultivarea biomasei de <i>Arthrospira</i> și <i>Scenedesmus</i> , 2600 m ² , 18 g/m ² /zi	[70]
	Australia	Cultivarea biomasei de <i>Chlorella</i> 2600 m ² , 18 g/m ² /zi	[27]
Bazine circulare	Japonia, Taiwan, Indonezia	Cultivarea biomasei de <i>Chlorella</i>	[138]
Bazine de tip pistă cu recirculare	Cyanotech, Hawaii	Cultivarea biomasei de <i>Arthrospira</i> , 75.000 m ²	[137]
	Entreprise Farms, California	150.000 m ²	[137]
	Nature Beta Technologies, Israel	Cultivarea biomasei de <i>Dunaliella salina</i>	[239]

- *Lacurile și bazinele naturale* unde sunt asigurate condițiile necesare (de ex. pH-ul sau salinitatea) pentru dezvoltarea culturilor monospecifice. Unele din aceste lacuri (lacurile alcaline din Chad sau craterele vulcanice din Myanmar) reprezintă sisteme naturale de o productivitate

înalță, utilizate pentru obținerea de către populația autohtonă a biomasei de *Arthrospira* în scopuri alimentare. Altele, au fost adaptate de către producătorii industriali la cultivarea extensivă a microalgelor (de ex. *Arthrospira maxima* sau *Dunaliella salina*), cu utilizarea unui control minimal al parametrilor de cultivare. Aceste sisteme de cultivare sunt cost eficiente în cazul când condițiile de cultivare sunt favorabile cea mai mare perioadă a anului.

- *Sistemele înclinate* au fost încă puțin exploatate, chiar dacă încercările de a utiliza conceptul suprafețelor înclinate pentru cultivarea arthrospirei și clorelei la scară industrială au dat rezultate bune. Folosirea gravității suspensiei culturale ce alunecă de sus în jos pe suprafețele înclinate duce la crearea unei turbulențe înalte și a unui strat subțire a culturii - parametri importanți pentru asigurarea unei productivități înalte a sistemelor. Neajunsul principal al acestui tip de cultivare este sedimentarea culturii în locurile cu o turbulență mică, evaporarea excesivă și cheltuielile de energie pentru pomparea continuă a culturii de jos în sus [239].

- *Bazinele circulare* nu sunt favorizate în cultivarea industrială, din cauza că necesită o construcție costisitoare bine determinată și cheltuieli de energie pentru amestecarea culturii. Totuși ele sunt pe larg utilizate în Japonia, Taiwan și Indonezia pentru producerea biomasei de *Chlorella* [138].

- *Bazinele de tip pistă cu recirculare* au fost tradițional sistemele preferate pentru producerea industrială a biomasei algale, fiind și astăzi cele mai utilizate în cultivarea la scară largă a culturilor de *Arthrospira* și *Dunaliella*, dar și altor microalge [136, 161, 162, 198, 208] . Utilizarea exclusivă a acestor sisteme pentru cultivarea în masă a microalgelor se datorează simplității și costurilor mici pentru realizarea și manipularea lor (figura 1.1).

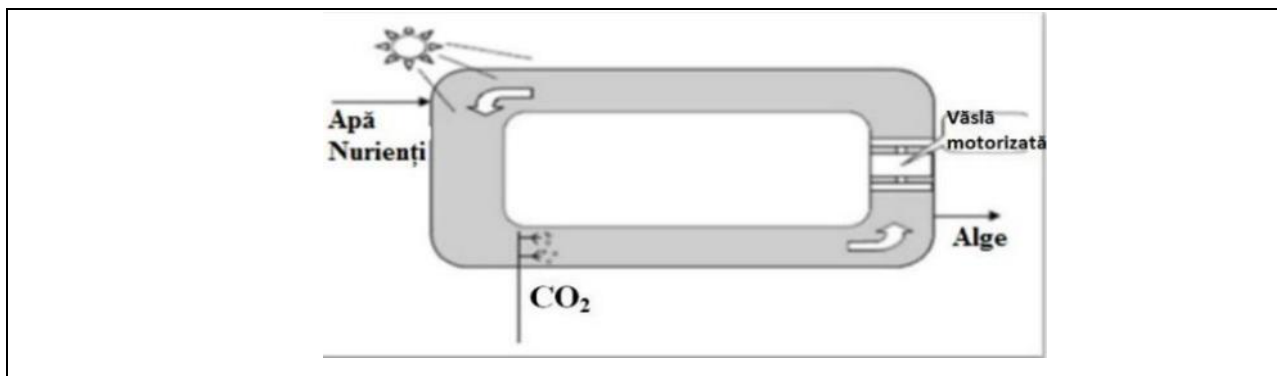


Fig. 1.1. Schema unui bioreactor de tip pistă cu recirculare [7].

Cu toate acestea, ele permit un control limitat al parametrilor de cultivare și nu asigură condițiile necesare pentru a evita contaminarea culturii. Printre dezavantajele menționate de mai mulți autori [53, 93] este și imposibilitatea de a opera cu un strat al culturii mai subțire decât 15 cm, deci și o iluminare inefficientă a culturii în profunzime, precum și pierderi prin evaporare

considerabile. Deși a fost raportată o productivitate maximală a acestor sisteme egală cu 40 g/m²/dl, totuși cel mai des aceste bazine pot atinge 20-25 g/m²/dl pentru perioade scurte, iar productivitatea de lungă durată a bazinelor industriale rareori depășește 12-13 g/m²/dl. Costul biomasei produse în sistemele industriale variază între 9 și 17 € per kg [138]. Deși sistemele de cultivare de tip deschis domină în biotehnologia algală (atât după producția anuală, cât și după răspândire), tot mai multe sunt la ora actuală cercetările îndreptate spre dezvoltarea sistemelor de tip închis.

Sistemele de cultivare de tip închis - fotobioreactoarele (FBR) pot fi clasificate după mai multe criterii. După modul de operare FBR pot fi cu una sau două faze de cultivare; după construcție pot fi: 1) plate, tubulare sau cilindrice; 2) orizontale, înclinate, verticale sau în spirală; 3) cu colector sau în formă de serpentină. La fel, fotobioreactoarele pot fi din sticlă sau plastic, flexibile sau rigide [239]. Principalele avantaje ale fotobioreactoarelor de tip închis sunt: 1) pierderi minime de CO₂, 2) cheltuieli minime de apă, 3) risc de contaminare redus, 4) reglarea optimală a temperaturii, 5) hidrodinamica controlabilă, 6) condiții de cultivare reproductibile, 7) flexibilitate considerabilă față de influențele mediului, 8) economia spațiului ocupat [89]. Fotobioreactoarele de tip închis au fost cu succes testate pentru obținerea biomasei de *Porphyridium*, *Phaeodactylum*, *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Tetraselmis* ș.a. [19, 20, 78, 244]. Fotobioreactoarele tubulare sunt cele care satisfac cerințele tehnologice pentru obținerea preparatelor farmaceutice de rând cu preparatele alimentare și aditive. Recentele succese în domeniul elaborării și construcției fotobioreactoarelor țin de realizarea unor sisteme ce ar îmbina avantajele productive ale fotobioreactoarelor tubulare cu cheltuielile minime ale sistemelor deschise de cultivare [19]. Un pas important în această direcție îl constituie reactoarele în strat subțire sau panourile plate flexibile. [239]. Mai mulți autori au propus strategii de cultivare a microalgelor în etape, cu utilizarea combinată a diferitor tipuri de sisteme de cultivare. Ținând cont de specificul fiecărei tulpini și de scopul cultivării lor, au fost testate mai multe combinații: bazine deschise și fotobioreactor; fotobioreactor tubular și panou plat; panouri plate de grosime variabilă sau reactoare tubulare de diametru variabil; fotobioreactor și fermentator pentru cultivare heterotrofă. De exemplu, conceptul cultivării combinate a microalgelor în reactoare tubulare diminuează și circularea culturii prin bazine deschise după amiaza a fost propus pentru a evita supraîncălzirea culturii. Un al exemplu este sistemul pentru cultura *Haematococcus pluvialis*: la prima etapă cultivarea se efectua în panouri plate pentru a atinge o rată de creștere maximală, la etapa a doua suspensia culturală era trecută în reactor tubular pentru a spori carotenogeneza.

În Tabelul 1.2 sunt prezentate câteva exemple de utilizare industrială a fotobioreactoarelor.

Tabelul 1.2. Utilizarea practică a fotobioreactoarelor de tip închis

Tipul	Exemple de utilizare	Tulpinile cultivate și productivitatea lor	Referințe bibliografice
FBR tubular orizontal în formă de serpentină, volum 145 l.	Centrul de Studiu a Microorganismelor Autotrofe, Florența, Italia	<i>Arthrospira platensis</i> 27,8 g/m ² /zi	[238]
FBR tubular cu colector de tip α, volum 300 l.	Departamentul de Biotehologie al Universității din Singapore	<i>Chlorella</i> 72 g/m ² /zi	[139]
FBR tubular cu colector volum 1.200 l.	Departamentul de Biotehologie Agricolă al Universității din Florența	<i>Arthrospira platensis</i> 28 g/m ² /zi	[240]
FBR tubular în formă de serpentină, volum 20.000 l.	Aquasearch Inc (Hawai, USA)	<i>Haematococcus pluvialis</i> 9-13 g/m ² /zi	[172]
FBR tubular, volum total 85.000 l.	Uzina Salata GmbH, Rutschenhausen, Germania	<i>Arthrospira</i> 35-40 g/m ² /zi	[89]
FBR de tip panou alveolar plat, volum 10 - 6.000 l.	IGV Institute Germania	<i>Chlorella</i> 130 g/m ² /zi	[196]
FBR de tip panou plat din sticlă, volum 500 l.	Richmond A., Israel	<i>Nannochloropsis</i> 10-14,2 g/m ² /zi	[261]
FBR în plăci ultra subțiri	Uzina APS Red Hawk Power Plant, USA, cultivarea continuă a cianobacteriilor pentru sechestrarea CO ₂ -	<i>Arthrospira</i> 80-100 g/m ² /zi	[190]

Este îmbucurător faptul, că fotobioreactoarele moderne manifestă o productivitate stabil înaltă, chiar și pentru un volum de zeci de mii de litri.

Deși au fost înregistrate progrese evidente în evoluția sistemelor de cultivare în masă a microalgelor, nu există o unanimitate de păreri în ceea ce privește viitorul lor: unii specialiști afirmă că bazinele deschise de dimensiuni mari par să aibă un viitor mai bun decât sistemele închise de cultivare [197], alții leagă succesele biotehnologiei algale de perfecționarea continuă a fotobioreactoarelor [19, 93, 239]. De fapt, pentru a da dreptate unor sau altor opinii, este important de a ține cont de destinația biomasei algale cultivate: va fi utilizată în calitate de supliment alimentar sau sursă de biocombustibil, în scopul decontaminării apelor și fertilizării solurilor sau ca materie primă pentru obținerea componentelor valoroase. Un factor ce nu trebuie neglijat în acest demers sunt particularitățile specifice de cultivare a fiecărei tulpini în parte, precum și potențialul său de biosinteză.

Principiile biologice de cultivare în masă a microalgelor stau la baza proiectării sistemelor de cultivare și sunt în permanență în atenția cercetătorilor [53, 206, 207]. Nu există

sisteme universale de cultivare, fiecare din ele fiind adaptat tulpinii și scopului cultivării ei. Sistemele de cultivare a microalgelor, mai cu seamă cele de tip închis permit controlul și manipularea factorilor de creștere a culturii. Ținând cont de faptul, că scopul cultivării industriale a microalgelor este de a valorifica capacitatea acestor organisme fotoautotrofe de a converti radiația luminoasă într-o varietate de metaboliți, factorul limitativ principal al acestui proces este *iluminarea*. Cu scopul realizării unei iluminări calitative, care să asigure un randament înalt al fotosintezei și să diminueze fotoinhibarea, sunt calculați și adaptați mai mulți parametri ai sistemelor de cultivare: grosimea stratului suspensiei culturale, profunzimea optică, densitatea culturii, frecvența ciclului de lumină și întuneric, reglarea unghiului de iluminare etc.[93, 239]. După cum se vede din figura 2, productivitatea înaltă a sistemelor închise în strat ultrasubțire se datorează în mare parte unei iluminări mai uniforme.

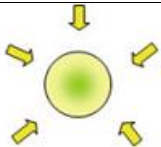
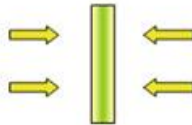
Sisteme deschise de tip pistă cu recirculare	Sisteme închise tubulare	Sisteme închise în strat ultra subțire (UTL)
Productivitatea: 10-20 g /m ² /zi	Productivitatea: 35-40 g /m ² /zi	Productivitatea: 80-100 g /m ² /zi
		
		
Grosimea stratului: 200-350 mm	Grosimea stratului: 30-50 mm	Grosimea stratului: 1-12 mm

Fig. 1.2. Suprafața productivă a diferitor sisteme de cultivare a microalgelor în dependență de grosimea stratului suspensiei algale [196].

Un alt parametru important al culturii de microalge este *pH-ul și asigurarea cu CO₂*, ambele variabile fiind controlate prin injectarea cu CO₂ [19]. *Acumularea oxigenului* este un factor toxic pentru majoritatea autotrofilor și trebuie să fie luat în considerare la proiectarea fotobioreactoarelor. FBR cu colector și reactoarele verticale oferă un avantaj important în acest

scop [239]. *Agitarea culturii* este necesară pentru a preveni sedimentarea celulelor și stratificarea lor termică, pentru distribuirea uniformă a nutrienților, eliminarea oxigenului și asigurarea unei iluminări uniforme [92]. O productivitate maximă a culturilor poate fi asigurată numai în cazul menținerii unei *temperaturi optime* pentru creșterea ei. Soluțiile tehnice în acest scop sunt: umbrirea (care duce la scăderea iluminării și deci a productivității); scufundarea în băi de apă (eficient, dar costisitor) și răcirea prin pulverizare cu apă (cost eficient în condițiile climaterice uscate) [239]. *Asigurarea cu nutrienți* este deseori considerată drept un parametru ușor controlabil în culturile algale. Dar aici este loc pentru discuție, dacă luăm în considerare viteza diferită de creștere în anumite condiții, flexibilitatea diferită a culturilor la concentrațiile nutrienților etc.[92].

Trecerea în revistă a tehnologiilor de cultivare a cianobacteriilor indică asupra faptului că cea mai populară, mai productivă, deci și cea mai bine studiată este cianobacteria *Arthrospira* (denumirea comercială *Spirulina*). Cu o productivitate net superioară față de alte obiecte biotehnologice este cel mai solicitat supliment alimentar și o sursă prețioasă de substanțe bioactive. Printre cianobacteriile de relevanță economică, de rând cu genul *Arthrospira*, specialiștii evidențiază și genurile *Nostoc* și *Aphanizomenon* datorită conținutului lor biochimic prețios: conținut înalt de proteine pentru *Arthrospira* și *Aphanizomenon*, conținut înalt de polizaharide la *Nostoc* (Tabelul 1.3).

Tabelul 1.3. Conținutul de proteine, lipide și carbohidrați la cianobacteriile de relevanță comercială [52, 53, 215]

	Arthrospira spp.(%)	Nostoc spp.(%)	Aphanizomenon flos-aquae (%)
Proteine	58-73	10-23	60-75
Lipide	6-8	5-6	2-8
Carbohidrați	15-25	56-57	20-30

Biomasa de *Nostoc* de mai multe secole este utilizată în calitate de supliment alimentar, cu preponderență în Asia. Cantitatea medie anuală este de aproximativ 100 tone, colectate din habitatele naturale. Ținând cont de tendințele biotehnologiei de extragere și utilizare a fracțiilor valoroase ale biomasei (de ex. polizaharide, ficobiliproteine) și de cererea lor crescândă pe piață, în ultimele decenii au fost întreprinse tentative de cultivare în masă a acestei cianobacterii [53, 54, 211]. La cultivarea experimentală în reactoare tubulare verticale a fost obținută o productivitate 0,6 g/l/zi de biomasă de *Nostoc*. O productivitate de 16,4 mg/l/oră a fost obținută la cultivarea *Nostoc sp.* în fotobioreactoare în strat subțire. La cultivarea în fotobioreactoare

verticale de 20 L cu diferită rată de agitare, cea mai înaltă productivitate înregistrată a fost de 0,07 g/l/zi [231]. O altă abordare a cultivării, implicând condiții mixotrofe, a demonstrat o productivitate de până la 0,23 g/l/zi biomasă de *Nostoc* [258]. Cu toate că unele specii de *Nostoc* au fost cultivate cu succes în bioreactoare la etapa pilot, pentru comercializarea pe viitor vor fi depășite unele dificultăți tehnice, cum ar fi rata scăzută de creștere, pierderile de biomasă sau prețul înalt al fotobioreactoarelor.

Un lucru este cert: pentru optimizarea sistemelor de producere microalgă trebuie luate în considerare atât aspectele biologice cât și cele tehnologice.

1.2. Cianobacteriile – surse de antioxidanți

Cianobacteriile – unele dintre cele mai timpurii organisme apărute pe Pământ sunt practic omniprezente în toate habitatele terestre și acvatice. Acest lucru se datorează capacității lor de a supraviețui la temperaturi înalte și scăzute, la intensitate înaltă și joasă a luminii, la diferite concentrații de CO₂ – proprietăți datorită cărora cianobacteriile au radiat într-o gamă largă de zone geografice și nișe ecologice. Fiind astfel cosmopolite în distribuție, cianobacteriile formează o componentă importantă a populației microbiene în ecosistemele acvatice terestre. Ele joacă un rol central în procesele de succesiune, producția mondială de biomasă și în circuitele naturale ale elementelor. Posedând capacitatea de fixare a azotului, cianobacteriile constituie adesea microflora dominantă a solurilor umede, contribuind în mod semnificativ la fertilitatea acestora. Semnalizarea oxidativă constituie o funcție crucială asociată cu mecanismele prin care organismele percep modificările mediului și realizează ajustările necesare în expresia genelor, metabolism și procesele fiziologice [71].

Organismele fotosintetice tolerează nivelul ridicat de oxigen datorită mecanismelor endogene, care inhibă eficient și elimină produsele toxice, înainte ca acestea să producă daune. O serie de mecanisme de protecție și de reparare implicate în combaterea pericolului, pe care îl reprezintă prezența SRO au fost raportate în mai multe organisme, inclusiv în cianobacterii. Răspunsul diferitor organisme la stresul oxidativ poartă amprenta diferențelor interspecifice, dar în linii generale, pentru realizarea oricărui mecanism de protecție este necesară prezența antioxidanților.

Evoluția mecanismelor performante de fotosinteză și orientarea spre un mod de viață caracterizat prin mobilitate redusă au dus la aceea, că în mediul normal de viață al acestor organisme este prezentă în permanență o stare de stres, inclusiv stres oxidativ. Evoluția filogenetică a acestui grup de procariote fotosintetizante a asigurat formarea la ele a numeroaselor mecanisme de protecție antioxidantă și de reparare a daunelor provocate de

speciile reactive de oxigen (SRO). Aceste mecanisme includ antioxidanți enzimatici și non-enzimatici, care oferă celulelor adaptabilitate sporită și capacitatea de a supraviețui în condiții de stres endo- și exogen [21, 39, 46, 141, 221]. Astfel, cianobacteriile posedă potențial imens pentru a servi drept materie primă pentru producerea de antioxidanți, pe lângă faptul, că deja sunt pe larg utilizate în calitate de biofertilizatori și ca surse de enzime și pigmenți [84, 115, 124, 146, 164, 181, 209, 237]. Din punct de vedere fundamental, mecanismele de protecție utilizate de cianobacterii în stresul oxidativ pot fi puse în aplicare pentru elaborarea strategiilor de descifrare a imensei plasticități metabolice și genetice a acestor organisme precum și pentru dezvoltarea tehnologiilor de sporire a capacității de toleranță la stres a organismelor vii [128].

Studiul mecanismelor de protecție antioxidantă la cianobacterii a evidențiat mai multe căi, prin care aceste organisme își asigură securitatea în mediul oxigenic. Astfel, în biomasa cianobacteriilor sunt prezente substanțe, care acționează ca antioxidanți preventivi, care inhibă reacțiile de oxidare, și deci, previn procesul de formare a radicalilor liberi. O serie de compuși ai biomasei acționează prin blocarea formării radicalilor lipidici, protejând catenele acizilor grași contra rupturilor oxidative. Sunt de asemenea substanțe capabile de a rupe lanțul reacțiilor de autooxidare, ori de a ”stinge” oxigenul singlet care apare ca rezultat al proceselor fotosintetice. O serie de componente ale biomasei cianobacteriilor acționează ca sinergiste pentru alți antioxidanți celulari, ca agenți de reducere, ca factori de chelare a metalelor, ca inhibitori ai enzimelor prooxidante [33, 123, 189].

Există un număr mare de clasificări a antioxidanților, la bază fiind puse diferite principii de acțiune. În acest compartiment vom clasifica antioxidanții cianobacteriilor în dependență de masa lor moleculară. Astfel, în conformitate cu acest criteriu, există două clase de antioxidanți – macromoleculari și micromoleculari.

Din categoria antioxidanților macromoleculari fac parte atât antioxidanți enzimatici, cât și nonenzimatici. Antioxidanții enzimatici, la rândul lor formează două categorii: enzime antioxidante primare (peroxidazele, în special glutathion peroxidaza; catalaza și superoxid dismutaza) și enzime antioxidante secundare (reductazele și dehidrogenazele). Antioxidanții macromoleculari non-enzimatici la cianobacterii sunt prezentați prin proteinele de chelare a metalelor și grupul ficobiliproteinelor.

Din categoria antioxidanților micromoleculari fac parte grupurile carotenoizilor, clorofilelor, compușilor fenolici, aminoacizilor și peptidelor antioxidante (de exemplu glutathionul), precum și acidul ascorbic, vitaminele (A, E, C), cofactori ai enzimelor (Q10), minerale (zinc și selenium), compușii azotați (de exemplu acidul uric) ș.a. [33, 60, 192, 221].

1.2.1. Antioxidanții macromoleculari ai cianobacteriilor

Pigmenții ficobilinici (sau ficobiliproteinele) sunt cunoscuți în calitate de componente auxiliare ale structurilor ce asigură derularea normală a fotosintezei la cianobacterii, algele roșii și unele criptomonade. Fiind caracterizați prin culori deosebite de cea a clorofilei, aceștia sunt capabili să capteze lumina în diapazonul de lungimi de undă inaccesibile pentru pigmenții clorofilieni. Astfel, fiind reprezentanți preponderent al mediilor acvatice, organismele înzestrate cu ficobiliproteine au un randament mult mai înalt de utilizare a energiei solare. În același timp, a fost demonstrat, că în condiții de stres oxidativ acești compuși deosebiți au capacitatea de a stinge radicalii liberi formați în exces, astfel protejând membranele tilacoidale de procesul de peroxidaze, și deci, asigurând eficiența fotosintezei și supraviețuirii culturii.

Pigmenții ficobilinici se clasifică în baza culorii lor în două grupuri mari: ficoeritrinele (roșii) și ficocianinele (albastre). Maximul de absorbție al ficoeritrinelor se poziționează între 490 și 570 nm, iar cel al ficocianinelor – între 610 și 665 nm. Aceste grupuri mari se divizează la rândul lor, reflectând diferențele între proteine în anumite locații ale maximului de absorbție și forma specifică a spectrului de absorbție. La început, aceste grupuri definite prin litere în calitate de prefixe (de exemplu C-ficocianina, sau abreviat C-PC (C-phycoerythrin)) indică taxonul, la care se referă organismul, din care a fost izolat pigmentul dat. De exemplu R-ficoeritrina (R-PR) a fost izolată pentru prima dată din reprezentanții filumului *Rhodophyta*. Cercetările ulterioare au demonstrat, că tipul specific de pigment nu este obligatoriu restricționat doar în limitele taxonului respectiv.

Ficobiliproteinele sunt compuse dintr-un anumit număr de subunități, fiecare din ele având o axă proteică cu care cromoforul tetrapirolic linear formează legături covalente. Orice ficobiliproteină conține fie ficocianobilina, fie ficoeritrobilina, ori mai poate conține una din trei biline minore: ficourobilina, criptoviolina sau bilina 696 nm. Fiecare tip de biline are caracteristici spectrale unicate, care se pot modifica ca rezultat al interacțiunii dintre subunități sau dintre cromofor și apoproteină.

În majoritatea microalgelor ficobiliproteinele sunt aranjate în structuri subcelulare numite ficobilisomi. Aceste structuri permit pigmenților de a se aranja în structuri geometrice într-o manieră, care facilitează capturarea energiei și transferul ei. Toate ficobiliproteinele absorb lumina incidentă direct, iar în continuare participă într-un lanț transportor de energie în ficobilisomi: ficoeritrina – ficocianina – aloficocianina – clorofila a [51].

Interesul comercial față de ficobiline vine de la posibilitatea utilizării lor în calitate de marcheri fluorescenți ai anticorpilor în diagnostica precoce a stărilor canceroase, dar și în domenii legate de producerea de coloranți naturali pentru industria alimentară și cosmetică.

Ca antioxidanți eficienți ficobiliproteinele se manifestă în procesul de neutralizare a radicalilor liberi. Astfel, a fost stabilit, că acești compuși elimină radicalii alcoxil, hidroxil și peroxil. Efectul lor protector este exprimat prin protecția membranelor fiziologic active de procesul de peroxidare [216]. Oxidarea peroxidă a lipidelor se consideră una din cauzele principale a distrugerii membranelor celulare. S-a demonstrat că ficocianina supresează considerabil aceste procese în celulele organismelor vii. De asemenea, s-a constatat efectul inhibitor al ficocianinei obținută din spirulină asupra reacțiilor alergice în organism [202].

Cu toate că producerea de ficobiliproteine în cianobacterii și alte organisme este reglementată genetic, limitele fiziologice de variere a conținutului lor în biomasă sunt destul de largi. Modificarea conținutului de ficobiliproteine în componența celulelor microalgelor și cianobacteriilor este unul din mecanismele de rezistență a acestor organisme la acțiunea diferitor factori. Astfel, o modificare esențială a conținutului de ficocianină și aloficocianină la *Spirulina platensis*, *Porphyridium cruentum*, *Nostoc linckia* este înregistrată atât la acțiunea diferitor factor chimici, cum ar fi compușii coordinativi ai metalelor de tranziție, cât și la acțiunea factorilor fizici de mediu, cum sunt temperatura și intensitatea luminii. [5, 6; 12 (p p. 30-53, 173-215, 255-270), 14, 35].

Posibilitatea dirijării procesului de acumulare a ficobiliproteinelor în biomasa cianobacteriilor prin aplicarea unor procedee simplu de realizat și necostisitoare oferă avantaje importante pentru utilizarea acestor organisme în calitate de materie primă pentru obținerea preparatelor cu efecte antioxidante.

Un rol foarte important în protejarea celulelor vii ale cianobacteriilor de acțiunea radicalilor liberi le revine *proteinelor care realizează chelarea metalelor* cu valența variabilă. Aceste metale, în special cuprul și fierul, sunt parte componentă a reacțiilor, în cadrul cărora are loc formarea radicalului hidroxil (reacțiile Fento și Haber-Weiss) [187]. Stabilizarea ionilor metalelor cu valența variabilă prin includerea lor în structuri inerte este o măsură de profilaxie a formării radicalilor liberi agresivi. Din categoria proteinelor pentru chelarea metalelor fac parte transferinele sau proteinele asemănătoare transferinelor, care sunt prezente în abundență în membranele celulelor cianobacteriene și asigură în mod normal aportul de fier intracelular. În condiții de exces de fier în mediu și supraacumulare a ionilor de fier trivalent în celule, transferinele formează cu acești ioni legături puternice, blocând astfel acțiunea lor negativă [158].

Enzimele antioxidante primare – superoxiddismutaza (SOD), catalaza (CT) și peroxidazele (POx) – sun implicate direct în procesele de înlăturare a efectelor nocive ale stresului oxidativ prin anihilarea acțiunii SRO.

SOD este prima barieră a arsenalului antioxidant împotriva speciilor de oxigen în curs de formare. Enzima joacă un rol critic în atenuarea efectului toxic al radicalului superoxid. Rolul protector al SOD la cianobacterii a fost demonstrat pentru astfel de situații ca stările de prejudicii fotooxidative, disecare, lipsa ori insuficiența de azot, prezența substanțelor toxice, ca de exemplu coloranții azotici ș.a. SOD catalizează reacția de dismutație, transformând radicalii superoxid în dioxidigen și peroxid de hidrogen, care este mai puțin activ și este scindat de alte enzime. Există trei tipuri distincte de SOD, clasificate pe baza cofactorului metalic prezent: izozimele cupru / zinc (Cu / Zn-SOD), mangan (MnSOD) și fier (Fe-SOD). Cu/Zn SOD este caracteristică pentru citoplasmă, iar Mn SOD este localizată în mitocondriile formelor eucariote de alge. În formele procariote, deci tipice pentru cianobacterii, a fost depistată Fe SOD și Mn SOD. Sinteza activă a SOD și creșterea activității asigură supraviețuirea organismului în condiții de stres oxidativ [83, 132, 133, 148, 210, 241]. Nivelul sporit de SOD oferă un grad înalt de toleranță organismelor aerobe în condiții atipice pentru ele [73, 74, 102]. Conținutul înalt al SOD în biomasă este un marker biologic al unei stări de stres oxidativ și acest indice poate fi folosit pentru aprecierea nivelului de influență a unor factori nocivi asupra sistemelor vii.

CT – structură hemică tetramerică - este cunoscută ca prima enzimă izolată în stare pură, care realizează reacția de transformare a peroxidului de hidrogen în apă și oxigen. În prezent se cunosc 5 izoforme ale catalazei, care se deosebesc între ele prin structura părții proteice. Activitatea normală a catalazei asigură funcționarea sistemului citocromic celular, fiind implicată și în procesul de fosforilare oxidativă. Concentrația substratului specific – a peroxidului de hidrogen – nu este un factor limitativ pentru activitatea CT, acționând și în condiții de supraproducere a peroxidului. O moleculă de catalază poate să scindeze până la 44 000 molecule de peroxid de hidrogen pe secundă. În mod normal catalaza este destul de stabilă, păstrându-și activitatea un timp îndelungat. În condițiile stresului oxidativ în celule se înregistrează o creștere semnificativă a acțiunii CT [124, 210, 237, 241].

Substratul specific al *peroxidazelor* în celule îl constituie peroxizii organici și peroxidul de hidrogen. În celulele organismelor ce realizează fotosinteza - și deci inclusiv a cianobacteriilor – în calitate de substrat al peroxidazelor sunt polifenolii și aminele aromatice. Grupul peroxidazelor este format din ascorbat – peroxidaza, NADH - peroxidaza, NADPH - peroxidaza, glutation - peroxidaza, guaiacol - peroxidaza ș.a. Funcția acestui grup de enzime constă în reducerea substratului specific menționat până la formarea apei. Pe parcursul activității peroxidazelor are loc oxidarea aminelor aromatice, anilinei, benzidinei, tirozinei, triptofanului, indolului, acidului indolil acetic, fenolilor, acizilor aromatici, fierocitocromului C, NADPH . În calitate de grup prostetic peroxidazele conțin fieroporfirina.

Cel mai intens studiată din grupul peroxidazelor care realizează reducerea peroxidului de hidrogen este ascorbat peroxidaza (APX), care utilizează ascorbatul în calitate de donator de electroni [115]. APX este o enzimă din grupul peroxidazelor hemice, care poate fi absentă la unele cianobacterii. Pe baza prezenței sau absenței ascorbat peroxidazei cianobacteriile pot fi clasificate în două grupuri: (i) care reduc peroxidul de hidrogen cu participarea peroxidazei folosind un fotoreducător ca donator de electroni, și (ii) care reduc peroxidul de hidrogen doar cu ajutorul catalazei. Printre reprezentanții primului grup, care conțin APX sunt genurile *Synechocystis*, *Anacystis*, *Synechococcus* și *Nostoc* [128].

Activitatea *glutathione peroxidazei* (GPX) este indusă enzimatic, de aceea cantitatea ei depinde de intensitatea stresului oxidativ. GPX este o enzimă seleniu - dependentă, care asigură protecție față de hidroperoxizii organici și ajută la regenerarea formei reduse a vitaminei C. Au fost identificate 8 izoforme ale GPX. Funcția GPX constă în menținerea stării active a mai multor enzime, care în celulă se oxidează spontan [75].

1.2.2. Antioxidanții cu masă moleculară joasă ai cianobacteriilor

Antioxidanții cu masă moleculară joasă constituie un grup foarte variat de substanțe capabile să asigure protecția celulelor de acțiunea radicalilor liberi, prin blocarea formării lor, inhibarea radicalilor formați și repararea distrugerilor cauzate de stresul oxidativ. Aceștia se deosebesc după proprietățile chimice și localizarea în celulă.

Cei mai cunoscuți, mai intens studiați, dar și cel mai activ aplicați în practică antioxidanți naturali sunt *carotenoizii*. Există o gamă largă de carotenoizi naturali, actualmente fiind descriși peste 600 [103, 104]. Carotenoizii constituie un grup omniprezent de pigmenți izoprenoizi. Ei sunt recunoscuți în calitate de stingători eficienți a oxigenului singlet și captatori ai altor SRO. Carotenoizii pot acționa, de asemenea, ca stingători ai proceselor de oxigenare ireversibilă. Mecanismele moleculare care stau la baza acestor reacții nu sunt încă pe deplin înțelese, în special în contextul activității anti și pro-oxidante a carotenoizilor care, deși nu sunt sintetizați de oameni și animale, sunt, de asemenea, prezenți în sângele și țesuturile lor, contribuind la o serie de procese biochimice. Potențialul antioxidant al carotenoizilor este de o importanță deosebită pentru sănătatea umană. Date provenind din studii epidemiologice și clinice susțin postulatul că suplimentarea adecvată cu carotenoizi naturali reduce semnificativ riscul unor tulburări mediate de SRO. Sunt demonstrate efectele benefice (de protecție) a aportului alimentar de carotenoizi în boli larg răspândite, tipice civilizației moderne, și anume, în cancer, tulburări cardiovasculare sau de fotosensibilitate.

În cianobacterii carotenoizii formează două categorii de bază: carotenele (molecule non-oxigenate) și xantofilele (molecule oxigenate). Rolul acestor pigmenți constă în colectarea luminii, disiparea excesului de lumină și stabilizarea structurilor celulare prin asigurarea fotoprotecției membranelor funcționale. Efectul antioxidant al carotenoizilor este determinat de prezența legăturilor duble conjugate și inelelor hexenice nesaturate în structura moleculelor lor. Carotenoizii cu nouă și mai multe legături duble realizează stingerea radicalilor clorofilei prin acumularea asupra lor a energiei și eliberarea ei în formă de căldură la relaxarea termică [113]. Procesul de "stingere" are loc prin intermediul reacțiilor chimice, transferului de energie, formarea radicalilor proprii, ca radicalii peroxilipidici [84, 154, 200, 234].

Posibilitatea modelării cantității carotenoizilor în biomasa cianobacteriilor prin aplicarea procedeelor tehnologice, activitatea pronunțată *in vivo* pentru mulți din ei, efectul prooxidant minim sau lipsa lui completă – acestea sunt argumentele pentru continuarea studiilor orientate spre elaborarea tehnologiilor de obținere a preparatelor antioxidante pe baza carotenoizilor naturali [8, 9, 117].

Tocoferolul sau *vitamina E* este un termen ce întrunește un grup de compuși, în care sunt incluse opt forme derivate ce exercită activitate α -tocoferolică. Acesta este unul din cel mai bine cunoscuți antioxidanți, utilizat în practica medicală și de cercetare mai multe decenii. Tocoferolul rupe reacțiile radicalice în lanț, interacționând cu radicalul peroxil. Rezultatul acestei reacții îl constituie formarea radicalului tocoferil. Regenerarea acestui radical înapoi în tocoferol are loc cu concursul ubiquinonei, glutathionului ori acidului ascorbic. Partea negativă a aplicării practice a acestui grup de antioxidanți constă în aceea, că în mediul lipofil în concentrații mari, aceste substanțe devin prooxidanți, care contribuie la ramificarea lanțului reacțiilor de peroxidare lipidică [33]. Tocoferolii sunt depistați practic în toate tipurile de celule vii, iar cantitatea lor este determinată de condițiile de mediu și de starea fiziologică a celulelor ori organismului. În cazul cianobacteriilor această cantitate este determinată de etapa ciclului de dezvoltare a culturii [32, 61].

Glutathionul (GSH) este cofactorul glutathion peroxidazei, glutathion transferazei, dehidroascorbat reductazei – enzime cu acțiune antioxidantă pronunțată. Independent acest compus de asemenea are proprietăți antioxidante fiind o capcană directă pentru radicalul hidroxil și oxigenul singlet. În componența enzimei glutathion peroxidaza participă la neutralizarea peroxizilor, inclusiv a celor lipidici. Efectul direct al glutathionului în calitate de antioxidant mai este exprimat și prin regenerarea radicalului tocoferil în tocoferol, acționând astfel în mod sinergist cu acest component și asigurând protecție antioxidantă eficientă în primul rând membranelor, în care se localizează vitamina E [60]. În situații experimentale un nivel sporit al

GSH este înregistrat atunci, când organismul este supus acțiunii factorilor de stres, iar în celule survine starea de stres oxidativ. Mărirea cantității de GSH în aceste condiții este o reacție de răspuns orientată spre anihilarea acțiunii radicalilor liberi și altor SRO [185, 251].

Acidul ascorbic sau *vitamina C* este un cunoscut antioxidant care *in vitro* are capacitatea de a neutraliza majoritatea radicalilor liberi și SRO. *In vivo* efectul antioxidant al acidului ascorbic este determinată de synergismul acțiunii lui în tandem cu tocoferolul și glutatationul, participând la reacțiile de transformări reciproce a formelor radical în forme stabile și invers. [60]. Ca și în cazul tocoferolului, hotarul între acțiunea antioxidantă și cea prooxidantă este destul de efemeră, acest echilibru fiind sub un constant pericol de prăbușire. În cazul acidului ascorbic factorul destabilizator este prezența metalelor cu valență variabilă în forma lor ionică. În aceste condiții ascorbatul devine prooxidant generând formarea metaboliților toxici, inclusiv a radicalului hidroxil. Un alt pericol, ce vine de la vitamina C pentru celulele vii provine din capacitatea acesteia de a se autooxida cu formarea dehidroascorbatului, care afectează grav transducția de semnal și întreaga activitate vitală a celulelor [29, 117].

Coenzima Q (CoQ) sau *ubichinona* face parte din sistemul succinat-dehidrogenazic. Activitate antioxidantă posedă forma redusă a coenzimei numită ubichinol (CoQH_2) care reacționează cu radicalul superoxid și radicalii lipidici asigurând stingerea lor eficientă [129]. În rezultatul acestor reacții se formează semichinona – un radical liber primar cu funcție biologică determinată, fiind un element structural și funcțional al lanțului respirator transportor de electroni. Acționează synergist cu vitamina E, asigurând regenerarea radicalului tocoferil în forma stabilă a vitaminei.

Prezența *fenolilor* - compuși în care grupa funcțională -OH este legată de un atom de carbon ce aparține unui nucleu aromatic – a fost demonstrată pentru biomasa majorității speciilor biotehnologic importante de cianobacterii și microalge [96, 103, 104, 127, 132, 133, 152]. Datorită proprietăților chimice specifice, fenolii sunt în esența lor substanțe cu efect antioxidant pronunțat. Efectul de anihilare a radicalilor liberi de către compușii fenolici are loc în primul rând, datorită capacității lor de a forma radicali fenoxil caracterizați prin grad înalt de stabilitate – deci, acționând în calitate de spărgători ai lanțului oxidativ. Pe lângă aceasta au mai fost depistate două mecanisme specifice, prin care compușii fenolici se realizează ca antioxidanți eficienți în celulă. Primul constă în chelarea ionilor metalici, iar cel de-al doilea constă în pătrunderea acestor compuși în bistratul lipidic al membranelor și modificarea fluidității acestora. Pentru unii fenoli așa ca cvercetina, miricetina, fuzetina este caracteristică și acțiunea synergistă în tandem cu alți antioxidanți recunoscuți, așa ca glutatationul ori enzima glutatation – S – transferaza. Varietatea mecanismelor protecției antioxidante prin care se pot implica compușii

fenolici în protecția celulelor determină și gradul înalt de corelare între cantitatea de fenoli în biomasă și activitatea antioxidantă a acesteia [84, 96, 140]. Cantitatea fenolilor în biomasa microalgelor și cianobacteriilor poate fi modificată prin acțiunea diferitor procedee biotehnologice, cum sunt acțiunea factorilor chimici, modificarea intensității luminii, modificarea raportului dintre principalii nutrienți, acțiunea temperaturilor mai înalte ori mai joase decât cele optime ș.a. [127].

Astfel, cianobacteriile, fiind printre primele organisme fotosintetizante care au contribuit la formarea atmosferei oxigenice a Pământului au cea mai lungă istorie de formare și perfecționare a mecanismelor, ce asigură protecția eficientă a structurilor celulare de efectele negative ale stresului oxidativ. Biomasa lor prezintă o varietate enormă de componente, ce posedă activitate antioxidantă. De regulă, efectul protector este asigurat de un complex policomponet în care fiecare component are rolul său indispensabil. De aici vine și activitatea mai pronunțată a sistemelor antioxidante complexe comparativ cu cea a substanțelor pure. În special aceasta se referă la rezultatele *in vivo*, fapt pentru care tot mai mulți cercetători pledează pentru complexe antioxidante, iar eforturile se concentrează pe descifrarea mecanismelor de interacțiune a elementelor complexului în asigurarea protecției antioxidante.

1.3. Tehnologii de obținere a antioxidanților din cianobacterii

Importanța cianobacteriilor pentru natură și om cuprinde două aspecte diametral opuse. Dintr-un punct de vedere, aceste organisme care numără peste 2000 specii joacă diverse roluri în ecosistemele acvatice și terestre [193]. Creșterea excesivă a cianobacteriilor, așa numita înflorire a apelor, reprezintă o amenințare serioasă la adresa ecosistemelor acvatice [82]. Acest fenomen contribuie la degradarea calității apei și valoarea de agrement a lacurilor și altor bazine acvatice [69]. Pe de altă parte, cianobacteriile ce populează apele potabile sunt recunoscute în calitate de producători de metaboliți secundari biologic activi cu diferită structură. În ultimul deceniu, cianobacteriile au fost recunoscute ca o sursă majoră de produse naturale, cu aplicații potențiale terapeutice în tratamentul cancerului, maladiilor metabolice, SIDA ș.a. [151]. Metaboliții cianobacteriilor sunt, de asemenea, explorați activ în calitate de compuși activi farmacologic, utili în diagnosticul medical, unde pot fi aplicați în calitate de sonde fluorescente, nutraceutice și suplimente alimentare și furajere. Este recunoscut, că radicalii liberi sunt implicați în declanșarea unor maladii, cum ar fi ciroza ficatului, ateroscleroza, cancerul, diabetul, etc., iar compușii care pot anihila radicalii liberi au un mare potențial în ameliorarea acestor procese patologice [26]. Astfel, antioxidanții joacă un rol important în protejarea organismului împotriva deteriorării provocate de SRO. Antioxidanții sintetici utilizați frecvent, cum ar fi butilhidroxianizolul și

butilhidroxitoluenul ascund potențiale riscuri pentru sănătate și se caracterizează prin toxicitate înaltă. Prin urmare, acestea trebuie să fie înlocuite cu antioxidanți naturali [114].

În compartimentul precedent al acestui reviu au fost trecute în revistă doar unele dintre componentele biomasei cianobacteriene cu activitate antioxidantă pronunțată. Acestea pot fi atât compuși cu masa moleculară mare, cât și cu masă moleculară joasă; pot fi hidrosolubili ori liposolubili, se pot localiza în citozol, diferite compartimente celulare, inclusiv membrane funcționale, ori pot difunda în mediul extracelular. Tehnologiile de obținere a antioxidanților din biomasa cianobacteriilor sunt determinate, în primul rând de scopul care stă în fața producătorului, de natura substanțelor care urmează a fi obținute și de tipul preparatului care este solicitat în această tehnologie. În linii generale, aceste tehnologii au la bază principiul de extragere a componentelor active, ce urmează a fi realizat în condiții care să garanteze siguranța produsului finit.

În acest sens, este necesar de a combina selectivitatea, inofensivitatea și rentabilitatea procedeele de extragere a principiilor bioactive cu acțiune antioxidantă cu cerințele legale privind utilizarea solvenților de grad alimentar și proceselor acceptate în acest sens. Tehnicile de extracție tradiționale precum Soxhlet, extracția solid-lichid, sau extracția lichid-lichid sunt caracterizate prin utilizarea unui volum mare de solvenți și/ ori prin durata mare a acestor procese. Aceste tehnici adesea se caracterizează prin randament și selectivitate mici. În plus, extragerea cu aplicarea tehnicilor tradiționale de obicei nu este un proces automatizat, și deci, reproductibilitatea poate fi adesea compromisă. Tehnicile contemporane de extragere a principiilor bioactive cum ar fi extracția în fluide supercritice, extracția cu lichid presurizat, extracție cu solvent accelerat, extracția cu apă caldă presurizată, extracția asistată de ultrasunete, și extracția asistată de microunde oferă un mod eficient de alternativă de depășire a problemelor tipice pentru tehnicile de extragere tradiționale [111].

Extracția în fluide supercritice (EFS) a fost aplicată în calitate de metodă alternativă de extragere în 1879. Cu toate acestea, nu a fost aplicată pe larg până în anii 1960. Metoda a început să fie investigată, ca o alternativă a metodelor de extracție convenționale, cum ar fi extracția solid-lichid ori lichid-lichid, care utilizează mari cantități de substanțe chimice periculoase, cum ar fi solvenți clorurați [108]. EFS se bazează pe utilizarea solvenților la temperaturi și presiuni mai mari decât cele ce corespund punctelor critice. Această tehnică a fost folosită anterior pentru a extrage o mare varietate de compuși interesanți din diferite materiale. Una dintre cele mai valoroase caracteristici ale EFS este rata extrem de redusă (de multe ori la zero) de utilizare a solvenților organici toxici. Dioxidul de carbon (CO_2) este solventul cel mai frecvent utilizat pentru a extrage compuși bioactivi din surse naturale utilizând EFS. CO_2 are o

serie de proprietăți avantajoase pentru utilizare în extragerea antioxidanților: este ieftin, condițiile sale critice sunt ușor de atins (30,9°C și 73,8 bari), este un solvent ecologic, care este în general recunoscut ca fiind sigur pentru utilizare în industria alimentară. Principalul dezavantaj al CO₂ supercritic este polaritatea scăzută, o problemă care poate fi depășită prin utilizarea modificatorilor polari sau a co-solvenților pentru a schimba polaritatea fluidului supercritic și a mări puterea lui de solubilizare. Au fost propuși și alți solvenți pentru EFS, printre care propanul, butanul și eterul dimetilic, dar nici unul dintre aceștia nu respectă toate principiile chimiei și ingineriei ecologice la fel ca dioxidul de carbon. Avantajele utilizării CO₂ supercritic pentru extragerea antioxidanților din biomasa cianobacteriilor include posibilitatea de a regla cu ușurință temperatura și presiunea în sistem, ceea ce asigură controlul puterii și viscozității extractului; posibilitatea de a obține extracte libere de solvenți, deoarece odată ce procedura de extracție este finalizată, depresurizarea sistemului transformă CO₂ din lichid în gaz, ceea ce facilitează mult recuperarea extractului. Aceste proprietăți determină utilizarea extinsă a CO₂ supercritic pentru extragerea compușilor bioactivi, inclusiv a antioxidanților. Din biomasa cianobacteriilor (*Arthrospira*, *Nostoc*) prin această metodă au fost extrași compuși volatili, lipide, produse saponificabile, compuși fenolici, tocoferol și alți compuși cu proprietăți antioxidante pronunțate [130, 252]. Pornind de la avantajele acestei metode originale, atunci când sunt prezente instalațiile respective, EFS este un procedeu avantajos de obținere a antioxidanților din biomasa de cianobacterii cu un grad înalt de siguranță a produsului finit.

Extracția în fluid presurizat (EFP) este, de asemenea, cunoscută cu variațiile de extracție în solvent de înaltă presiune, sau extracție accelerată în fluid, extracție în apă fierbinte presurizată ș.a. [169]. Această tehnică a fost descrisă pentru prima dată în 1996. În EFP este aplicată presiunea înaltă pentru a permite utilizarea de lichide la temperaturi mai mari decât punctul lor de fierbere în condiții normale. Dintre acestea, extracția accelerată în lichid, care poate fi considerată o nouă versiune a aparatului Soxhlet, dar care funcționează la presiuni și temperaturi ridicate, extracția cu apă de temperatură înaltă sunt tehnici promițătoare de extragere a substanțelor bioactive din diferite materii prime. Utilizarea combinată a presiunii și temperaturii ridicate asigură viteza înaltă a procesului și utilizarea cantităților minime de solvenți. De exemplu un proces, care prin această metodă se realizează timp de 20 min folosind 10-50 ml solvent poate fi comparat cu o procedură de extracție tradițională în care sunt necesare 10-48 ore și până la 300 ml solvent. Creșterea temperaturii de extracție poate promova solubilitatea mai mare a compușilor de interes, în primul rând prin transferul mai eficient de masă. În plus, temperaturile ridicate scad viscozitatea și tensiunea superficială a solvenților, facilitând accesul la zonele de interes ale matricelor, măbind astfel rata de extracție. Pe de altă

parte, EFP este larg recunoscută ca o tehnică de extracție ecologică, în principal din cauza consumului redus de solvenți organici, care îndeplinește perfect elementele de bază ale măsurilor de prevenire a poluării și principiile chimiei și ingineriei ecologice. Variații de extracție au fost aplicate cu succes în extragerea diferitor grupuri de carotenoizi din biomasa cianobacteriilor, precum și în extragerea complexelor fenolice din acest tip de biomasă. Aplicarea în calitate de fluid presurizat a amestecurilor apă-etanol și apă-metanol asigură obținerea extractelor cu o activitate antioxidantă deosebit de înaltă [146, 174].

Extracția în apă fierbinte sub presiune, de asemenea, cunoscută sub numele de extracție în apă subcritică, extracție în apă de polaritate scăzută sub presiune, sau extracție în apă supraîncălzită este un caz particular al metodei EFP. Apa are multe avantaje în ceea ce privește universalitatea și impactul asupra mediului și poate fi utilizată în procese de extracție și izolare a ingredientelor funcționale din diferite materii prime, inclusiv plante și deșeuri alimentare. Tehnica se bazează în utilizarea apei la temperaturi peste punctul de fierbere atmosferic, în timp ce păstrarea în stare lichidă are loc prin aplicarea presiunii înalte. În aceste condiții, proprietățile fizice și chimice ale apei se modifică dramatic, de exemplu, constanta dielectrică a apei scade de la aproximativ 80 la temperatura camerei (25°C) la aproximativ 33 la 200°, adică, aproape de cea a unui solvent organic polar cum ar fi metanolul. Mai mult decât atât, viscozitatea și tensiunea superficială scad odată cu creșterea temperaturii, în timp ce difuzia crește, ceea ce împreună duce la îmbunătățirea procesului de extracție în termeni de eficiență și viteză. În plus, solubilitatea este, de asemenea, modificată de temperatură, favorizând astfel solubilizarea unor altfel de compuși prin modificarea selectivității acestora. Apa este, de asemenea, un solvent ecologic pur, care poate fi utilizat, perfect cu respectarea normelor de chimie și inginerie ecologică [236, 242]. Condițiile de realizare a tehnicii *extracției în apă fierbinte sub presiune* depind în principal de compușii țintă și aplicațiile țintă. De exemplu, condițiile supercritice sau condițiile aproape critice pot fi utilizate pentru oxidarea în apă supercritică, hidroliză, și transformările moleculare, cum ar fi conversia biomasei, în timp ce condițiile subcritice sunt ideale pentru extragerea compușilor benefici sănătății, inclusiv antioxidantilor. Din biomasa cianobacteriilor această metodă de extragere asigură obținerea în primul rând, a extractelor cu conținut înalt de ficobiliproteine [103,104].

Extracția asistată de ultrasunet (EAU) și extracția asistată de microunde (EAM) sunt două tehnici ecologice foarte actuale. Tehnica EAU folosește cavitaționarea acustică pentru a provoca perturbarea pereților celulari, reducerea dimensiunii particulelor, și îmbunătățirea contactului între solvent și compușii țintă. Tehnica EAM utilizează radiații de microunde care cauzează mișcarea moleculelor polare și rotația dipolilor pentru a încălzi solventul și pentru a promova

transferul compușilor țintă din matricea probei în solvent [256]. Ambele metode oferă posibilitatea de a utiliza mai mulți solvenți cu polarități diferite. De fapt, ambele tehnici asigură o extracție extrem de rapidă, cu evitarea degradării compușilor labili. Ambele tehnici sunt rapide, folosesc cantități mici de solvenți și sunt rentabile. Prin urmare, dezvoltarea ambelor metode ar putea reprezenta un punct cheie în dezvoltarea tehnologiilor durabile de obținere a produselor antioxidante. Aceste două tehnici, în special EAU este aplicată pentru a obține compușii antioxidanți liposolubili, iar compararea eficacității acestei metode cu EFS a arătat, că acestea acționează practic la parametri egali [149].

Tehnologiile elaborate, aprobate în practica de cercetare și propuse pentru aplicare industrială permit recuperarea unor produse calitative din biomasa cianobacteriană. În același timp, necesitatea aplicării unui echipament costisitor și a unor chimicale scumpe limitează din punct de vedere economic aplicarea lor industrială [15]. În prezent există cerere pronunțată din partea diferitor companii în ceea ce ține de tehnologiile simple, ieftine și eficiente de obținere din biomasa vegetală a preparatelor antioxidante, dar în pofida eforturilor considerabile ale cercetătorilor numărul de implementări în acest domeniu este destul de redus, ceea ce denotă necesitatea unor propuneri mai atractive pentru producere.

1.4. Utilizarea antioxidanților din cianobacterii

Cianobacteriile produc o varietate enormă de substanțe cu acțiune antioxidantă în scopul de a se proteja de efectele negative generate de SRO. Extragerea și utilizarea lor în calitate de remedii profilactice ori terapeutice oferă celulelor organismului uman posibilitatea de a se proteja de acțiunea radicalilor liberi [221]. Din gama largă de produse antioxidante ale cianobacteriilor cele mai cunoscute pentru efectele lor benefice sunt compușii fenolici, vitaminele C și E, carotenoizii și ficobiliproteinele [37, 47].

Ficobiliproteinele (ficoeritrina, ficocianina și aloficocianina) din componența biomasei cianobacteriilor, în primul rând a spirulinei, se utilizează pe larg datorită proprietăților remarcabile ca coloranți și marcheri fluorescenți [184]. Fiind complet lipsiți de toxicitate, în calitate de coloranți aceștia pot fi parte componentă a alimentelor, inclusiv a celor care sunt destinate copiilor și grupurilor de populație cu necesități speciale, precum și în componența produselor cosmetice, inclusiv a celor hipoalergice. Datorită emisiei fluorescente specifice ficobilinelor din biomasa cianobacteriilor, după purificarea lor, sunt aplicate pentru realizarea diferitor tehnici de microscopie fluorescentă, teste biomedicale de imunodiagnostică, în care apar în calitate de marcheri specifici siguri pentru sănătatea omului. Datorită acțiunii antioxidante ficobiliproteinele se manifestă ca agenți antiinflamatori, care reduc edemul, scad

nivelul histaminelor, activitatea mieloperoxidului, precum și nivelul prostaglandinei PGE_2 și leucotrienei LTB_4 în țesuturile inflamate [117]. În sistemele vii acești pigmenți au acțiune de inhibiție a radicalilor hidroxil, alcoxil și peroxil. Ficocianina reduce de asemenea și nivelul factorului necrozei tumorilor ($\text{TNF-}\alpha$) și are efect neuroprotector. În prezent acești compuși sunt propuși pentru utilizarea în terapia fotodinamică a tumorilor [216]. Aceste substanțe își au efectul lor benefic și în prevenirea stărilor canceroase în calitate de remediu profilactic [126, 131].

β -carotenul – pigment prezent în toate cianobacteriile este aprobat spre utilizare în componența alimentelor și produselor cosmetice în statele care dezvoltă intens ficobiotehnologia, așa ca SUA, Israelul, Austria, Germania, Portugalia ș.a. Pornind de la utilizarea lui în calitate de colorant, pe durata mai multor cercetări s-a demonstrat, că acest pigment, fiind inclus în formule alimentare ori cosmetice oferă nu numai culoare, ci și protecție contra procesului de oxidare aceluși produs, în componența căruia se regăsește. În cercetările biomedicale și clinice a fost demonstrat, că β -carotenul este indispensabil în asigurarea unui nivel normal al vederii, dar și a statutului imun la om, este un remediu profilactic eficient în cazul cancerului, aterosclerozei, maladiilor coronariene ș.a. Plasma sangvină a omului în mod obligatoriu conține caroten, în timp ce celulele corpului sunt incapabile de a realiza sinteza acestui compus. Deci, fiind un element esențial, aportul lui cu alimentele este strict necesar. De aici reiese cerința înaltă față de acești compuși pe piața mondială. Cantitățile de carotenoizi comercializați anual se estimează valoric la peste 800 mln dolari USA [27].

Extractele din cianobacteriile *Spirulina platensis*, *Nostoc linckia*, posedă acțiune hipolipemiantă, antioxidantă, antiinflamatoare și sunt indicate în hipercolesterolemie, maladii cardiovasculare, infecții virale, ș.a. [57, 182].

Majoritatea obiectelor ficologice, care au fost introduse în procesul de producere industrială prezintă un grad înalt de siguranță atât pentru organismul uman, cât și pentru mediul ambiant. În anul 2011, Comitetul de Experți în domeniul Informării despre Suplimentele Dietice (DSI-EC Dietary Supplements Information Expert Committee) al Convenției Farmaceutice a SUA a apreciat spirulina pentru cel mai înalt posibil grad de siguranță și a declarat consumul de spirulină absolut sigur pentru om, ceea ce este un argument suplimentar în utilizarea resurselor acvatice preferențial celor terestre în procesul de obținere a antioxidanților pentru uzul uman ori animal [15].

Biomasa cianobacteriilor conține cantități importante de enzime antioxidante, chiar dacă nu sunt superproducători ai acestor substanțe, compuși fenolici activi, aminoacizi și oligopeptide cunoscute prin efectele lor antioxidante. Consumul de biomasă ori de preparate obținute în baza

ei constituie un beneficiu pentru sănătatea omului, cu condiția că sunt luate sub control aspectele ce țin de prezența elementelor toxice ori cu efect prooxidant. Odată cu creșterea continuă a cererii pentru noi surse de antioxidanți naturali în studiu sunt incluse tot mai multe specii de cianobacterii. *Nostoc linckia*, care și-a avut întrebuințare doar în calitate de biofertilizator, ori ca produs alimentar în zone geografice foarte mici, poate deveni un obiect ficobiotehlogic de valoare pentru obținerea produselor antioxidante, atât datorită componenței biomasei, cât și cerințelor minime în procesul de cultivare industrială.

1.5. Concluzii la capitolul 1

1. În prezent sunt dezvoltate și implementate numeroase tehnologii de creștere intensivă a diferitor specii de microalge și cianobacterii, care sunt utilizate în diferite domenii ale economiei. Printre cele mai intens studiate în acest sens sunt speciile de *Dunaliella*, *Arthrospira* și *Haematococcus*. Cianobacteriilor din genul *Nostoc* li se atrage o atenție mult mai mică, cu toate că acestea sunt extrem de nepretențioase, au o rată de creștere acceptabilă pentru cultivare industrială și o componență valoroasă a biomasei.

2. Biomasa cianobacteriilor prezintă o varietate enormă de componente, ce posedă activitate antioxidantă; efectul protector al cărora este asigurat de sinergismul acestora. Sistemele antioxidante complexe se caracterizează prin activitate mai înaltă comparativ cu cea a substanțelor pure. În special, aceasta se referă la rezultatele *in vivo*, fapt pentru care tot mai mulți cercetători pledează pentru complexe antioxidante, iar eforturile majore se concentrează pe descifrarea mecanismelor de interacțiune a elementelor complexului în asigurarea protecției antioxidante.

3. Actualmente există cerere pronunțată din partea diferitor companii în ceea ce ține de tehnologiile simple, ieftine și eficiente de obținere din biomasa vegetală a preparatelor antioxidante, dar în pofida eforturilor considerabile ale cercetătorilor, numărul de implementări în acest domeniu este destul de redus, ceea ce denotă necesitatea unor propuneri mai atractive pentru producere.

4. *Nostoc linckia* este un obiect biotehlogic de perspectivă pentru obținerea preparatelor complexe cu efect antioxidant și antiradicalic datorită faptului că biomasa conține cantități biotehlogic importante de ficobiliproteine și polizaharide sulfatate, dar și de carotenoizi, compuși fenolici, glutatation, enzime antioxidante primare și secundare, chelatori ai metalelor.

5. Tehnologiile complexe de obținere a antioxidanților din biomasa de *Nostoc linckia* trebuie să includă atât etapele tradiționale ce asigură producerea de biomasă, dar și cele de extragere a componentelor active și de valorificare a deșeurilor produse.

Problema de cercetare, care a fost formulată în rezultatul studiului bibliografic constă în identificarea elementelor-cheie a procesului biotehnologic de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu scopul producerii preparatelor cu efect antioxidant și de valorificare a reziduului de biomasă.

Directiile de rezolvare a problemei de cercetare constau în depistarea compușilor și a procedeelelor specifice, care asigură activarea sistemelor de protecție antioxidantă în cultura de nostoc și acțiunea cărora nu se asociază cu acumularea produselor degradării oxidative; elaborarea tehnologiilor de obținere a preparatelor complexe cu efect antioxidant și antiradicalic din biomasa de nostoc, crescută în condiții de sinteză dirijată; elaborarea tehnologiilor de utilizare a reziduului de biomasă rămas după extragere în cadrul bionanotehnologiilor și tehnologiilor moderne de protecție a mediului ambiant.

Scopul lucrării constă în elaborarea tehnologiei complexe nonpoluante de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia*, de obținere a preparatelor cu efect antioxidant.

Obiectivele lucrării sunt: Monitorizarea modificărilor biochimice și activității antioxidante a biomasei și extractelor din ea pe durata dezvoltării culturii statice de *Nostoc linckia*; Evidențierea indicatorilor biotehnologici cu tangență la ciclul vital, utili pentru obținerea preparatelor antioxidante din biomasa de *Nostoc linckia*; Stabilirea parametrilor biotehnologici optimi de extragere și păstrare pe termen lung a componentelor cu efect antioxidant din biomasa de nostoc; Elucidarea particularităților modificării conținutului de componente antioxidante în biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia* în condiții de stres oxidativ indus prin acțiunea compușilor Fe(III); Studiul posibilității valorificării reziduului de biomasă de *Nostoc linckia* după extragerea componentelor antioxidante; Elaborarea tehnologiei complexe de cultivare a *Nostoc linckia*, de obținere a preparatelor cu efect antioxidant și de utilizare a reziduului de biomasă în calitate de matrice pentru bionanosinteză și în calitate de biosorbent în purificarea mediului.

2. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI COMPONENTA BIOCHIMICĂ A BIOMASEI DE *NOSTOC LINCKIA* PE DURATA CICLULUI VITAL

Speciile, inclusiv cele de cianobacterii supraviețuiesc azi doar datorită faptului că sunt adaptate în spațiu și timp la mediul lor fizic, geologic, chimic și biologic. Ele se adaptează continuu, și deci, evoluează, ori în caz contrar dispar. Adaptările obținute sunt extrapolate și în cazul transferului culturilor de cianobacterii în condiții tehnologice, atunci când sunt supuse standardizărilor în scopul obținerii biomasei și produselor de extragere. În condiții tehnologice orice cultură parcurge aceleași etape care împreună formează ciclul de dezvoltare al culturii discontinue sau ciclul vital. Ciclul vital este o expresie generalizată a adaptării speciei în baza celei mai rudimentare expresii ale paternului de specie. Determinativele genetice ale ciclului vital prezintă un lanț de dovezi ale supraviețuirii speciei pe parcursul istoriei evolutive. [15, 59, 229]. Evaluarea ciclului vital este importantă și pentru aprecierea fezabilității energetice și ecologice a proceselor biotehnologice cu implicarea cianobacteriilor. Studiul, evaluarea și aprecierea ciclului vital presupune nu doar monitorizarea modificării numerice, ci și schimbările, care intervin în activitatea fiziologică a celulelor și se exprimă în modificări biochimice, care pot fi detectate prin aplicarea unor teste uzuale.

În condiții metabolice normale, cianobacteriile, ca unicele procariote capabile de fotosinteză, produc în mod constant oxigen molecular, iar în procesul respirației necesită prezența acestuia ca acceptor final de electroni. Aceste procese redox sunt corelate cu formarea speciilor reactive de oxigen SRO (superoxid anionul $O_2^{\bullet-}$, peroxidul de hidrogen H_2O_2 , radicalul $OH^{\bullet}$ și oxigenul singlet 1O_2), considerate drept produși inevitabili ai prezenței oxigenului molecular în celulă. În consecință, principalele surse generatoare de SRO la cianobacterii sunt lanțul fotosintetic și cel respirator transportor de electroni, și însuși fotosistemul I și fotosistemul II la nivelul membranelor tilacoidale. Orice condiție fiziologică (de exemplu vârsta culturii, exigențele de mediu) ce induce un dezechilibru în ansamblul de reacții producătoare de putere reducătoare (NADPH) și de energie (ATP) va genera specii reactive de oxigen, iar efectul lor cumulativ va determina instalarea unui stres oxidativ. Din moment ce starea redox a celulei și lanțul transportor de electroni modulează multe procese celulare esențiale, și SRO sunt o parte integrantă a unor rețele de semnalizare, nivelul celular al diferitelor specii reactive de oxigen trebuie să fie bine controlat. Pentru a menține statutul antioxidant pe parcursul creșterii și dezvoltării, cianobacteriile adoptă numeroase mecanisme care își găsesc expresia în modificări în antenele lor colectoare, evoluția în tranzițiile de stare, schimbări în stoichiometria PS II la PS I, disiparea excesului de energie pe cale non-fotochimică de către pigmentii accesorii ca ficobiliproteine și, drept bariere mai avansate - enzime pentru detoxicare, activarea unor gene,

respectiv apariția unor noi produse de biosinteză implicate în rezistență și asigurarea supraviețuirii [71, 135]. Nu în ultimul rând, caracterele morfologice ale cianobacteriilor filamentoase (teaca mucopolizaharidică, hormogoniile, achinetele, heterocistele) intervin ca și factori de adaptare la condițiile de mediu și determină inițierea proceselor de migrare (evadare) și motilitate, precum și apariția unor compartimente caracteristice ce preiau anumite funcții când este afectată integritatea celulară. În consecință, multitudinea de strategii întreprinse de cianobacterii pentru a stopa formarea ori propagarea SRO se reflectă în activitatea biosintetică a culturii. Astfel, intensitatea sintezei componentelor cu acțiune antioxidantă și antiradicalică se modifică esențial pe parcursul ciclului de dezvoltare al culturii. Raportul cantitativ al acestor principii biologice active determină caracterul acțiunii antioxidante a biomasei și respectiv a extractelor sau a preparatelor complexe obținute în baza acestei biomase. În scopuri biotehnologice este foarte importantă stabilirea perioadelor de recoltare optime pentru obținerea unui complex antioxidant eficient.

Ciclurile vitale implică strategii de creștere cu utilizarea diferitor medii la diferite etape. Diferite specii se caracterizează în acest sens prin variate adaptări, care în esența lor sunt destinate asigurării creșterii culturii. Creșterea numerică poate fi apreciată ca diviziune a celulelor individuale sau ca creștere în mărime a coloniilor/trihoamelor atât din contul măririi numărului de celule ca rezultat al diviziunii, cât și din contul producerii polizaharidelor, ce prezintă o matrice pentru structura spațială formată. În dependență de specie, în timp de o zi pot avea loc în mediu de la 1 la 3 diviziuni. În linii generale, cu cât volumul individual al celulelor este mai mare, cu atât rata de creștere a culturii este mai înaltă, dar în dependență de condiții, chiar în cadrul unei și aceleiași tulpini de cianobacterii rata de creștere pe durata ciclului vital poate varia în limite foarte largi. În condiții naturale ciclul vital este determinat de un complex polifactorial care include cantitatea de nutrienți și biodisponibilitatea lor, fotoperiodismul, calitatea și cantitatea luminii, temperatura, salinitatea, turbulența și alte caracteristici de mediu. Astfel, în condiții naturale pentru marea majoritate a culturilor este caracteristică o alternanță a fazelor de creștere activă și a celor de repaos, ultimele fiind o adaptare la condițiile nefavorabile de mediu. În condiții de laborator ori cele industriale povara majorității factorilor variabili în natură este scoasă prin menținerea artificială a unor condiții mai mult ori mai puțin constante, determinate devenind caracterele ereditare, care determină procesele de reproducere și dezvoltare în condițiile unui mediu constant limitat. Astfel, **scopul** prezentului capitol constă în monitorizarea modificărilor biochimice și evoluției statutului antioxidant al culturii statice a cianobacteriei *Nostoc linckia* pe parcursul ciclului vital în condiții de laborator și industriale.

2.1. Materiale și metode de studiu

Obiect al studiului a fost tulpina cianobacteriei *Nostoc linckia* (Roth) Born et Flah CNM-CB-03 depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a R. Moldova.

Pentru cultivare mediul de nutriție Gromov 6 optimizat cu următoarea componență:
macroelemente (g/l) - KNO_3 -0,5, K_2HPO_4 -0,45, NaHCO_3 -0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1, CaCl_2 -0,11.
microelemente (mg/l) - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05, MnSO_4 - 2, H_3BO_3 - 0,85, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -2,25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 4, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,009, EDTA - 4,75.

Cultivarea a fost efectuată în baloane Erlenmayer cu menținerea următorilor parametri: pH-ul 6,8-7,2, temperatura 25-27 °C, intensitatea luminii de 2000-3000 lx, agitare periodică lentă. Cantitatea de inocul a fost de 0,2 g/l în recalcul la BAU. Prelevarea de probe s-a efectuat cu strictețe la intervale de timp de 24 ore, pentru a exclude variațiile circadiene care intervin în statutul oxidativ al culturii microalgale.

Determinarea productivității nostocului a fost efectuată spectrofotometric în baza curbei de calibrare, ce reprezintă corelația dintre densitatea optică și cantitatea de BAU:

$$\text{BAU (g/L)} = 0,88 \cdot E_{590} \cdot \eta \quad (1)$$

unde:

0.88 – coeficientul de recalcul a BAU

E_{590} – densitatea optică a probei la 590 ($0 \leq E \leq 0.2$),

η - diluția probei.

În continuare, biomasa nostocului se separă prin centrifugare de lichidul cultural timp de 6 min la 4000 rotații per minut, se spală timp de 3-5 min cu soluție de acetat de amoniu de 2,0-2,5% pentru înlăturarea sărurilor minerale, stabilită după “pierderea” fracției de molecule medii din celule, la spălarea cu soluție de diferite concentrații.

Obținerea extractelor. Extractul hidric și cel alcoolic au fost obținute prin extragere în apă distilată și, respectiv, în alcool de 96 % reieșind din raportul biomasă (mg): extractant (ml) de 5:1. Aceste tipuri de extracte permit extragerea unui complex antioxidant care conține fracțiile lipo - și hidrosolubile, iar efectul antioxidant final al extractelor este unul sumativ. *Extractul hidric* - biomasa cianobacteriană a fost dezintegrată prin congelare-decongelare repetată. Extragerea se face în apă distilată. *Extractul etanolic* - extragerea a fost efectuată timp de 24 ore la temperatura camerei în tuburi din masă plastică tip Eppendorf, la agitare continuă. Extractele obținute au fost separate de biomasă prin centrifugare și păstrate la temperatura +4°C.

Determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului DPPH•. Radicalul DPPH• (1,1 difenil-2-picril hidrazil) de culoare violetă, utilizat în calitate de substrat, este redus prin adăugare de atomi de hidrogen cu obținerea de 1,1 difenil-2-picril hidrazină de culoare

galbenă. Pentru determinarea activității antioxidante a soluțiilor hidrice și etanolice obținute din biomasa *Nostoc linckia* se prepară soluția etanolică de 0,6 μM DPPH[•] (radical). Pentru aceasta 2,4 mg DPPH se dizolvă în 100 ml etanol. Solubilizarea este anevoioasă și se efectuează cu utilizarea agitatorului magnetic. Se obține soluția DPPH cu absorbanta de 0,62-0,66. Stabilitatea soluției este de maximum 6 ore. Amestecul reagent constă din 0,3 ml soluție etanolică extract antioxidant și 2,7 ml soluție DPPH (sau 0,1 ml probă la 3 ml reagent DPPH). Probele se amestecă bine prin agitare. Incubarea se petrece la întuneric la temperatura camerei, timp de 60 minute. Incubarea peste 60 minute este inutilă. Absorbanta se măsoară la lungimile 515- 517 nm (maximumul înregistrat). În calitate de probă oarbă se utilizează etanolul în concentrația corespunzătoare în care este solubilizat 0,3 ml extract antioxidant pentru a exclude componenta color a probelor propriu-zise. Reducerea valorilor extincției (% Inhibiție) a soluției de DPPH se calculează conform ecuației:

$$\% \text{ Inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=60 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} * 100, \quad (2)$$

unde $\text{Abs}_{t=0 \text{ min}}$ este valoarea absorbantei soluției 0,06 mM DPPH și $\text{Abs}_{t=60 \text{ min}}$ este valoarea absorbantei soluției DPPH[•] după 60 min incubare cu extractele antioxidante [28, 34].

Determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului cation ABTS^{•+}. Metoda de determinare a capacității antiradicalice cu aplicarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6-acidului sulfonic) este cunoscută și utilizată pe larg pentru stabilirea activității antioxidante a substanțelor, indiferent de natura lor [201]. În baza metodei date se determină activitatea antioxidantă atât a substanțelor pure, cât și a complexelor antioxidante. Radicalul ABTS este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6-acidului sulfonic), iar reducerea lui are loc prin mecanismul de adăugare de electroni. În calitate de echivalent pentru calculul cantitativ în această metodă se utilizează troloxul, compus cu activitatea antiradicalică similară tocoferolului, dar care, fiind lipsit de lanțul fitil, este hidrosolubil. Rezultatele testului pot fi exprimate în % Inhibiție (pentru compararea rezultatelor în interiorul testului) și TEAC (*trolox equivalent antioxidant activity*) pentru compararea cu antioxidanții de altă natură.

Oxidarea ABTS în scopul formării radicalului cation ABTS se realizează cu utilizarea persulfatului de potasiu. Pentru aceasta se prepară soluția stoc a reagentului ABTS de 7 mM în apă deionizată, la care se adaugă persulfatul de potasiu în concentrația de 2,45 mM în raport de 1:1. Reacția de formare a radicalului ABTS decurge la întuneric, la temperatura camerei timp de cel puțin 12-16 ore. Soluția de lucru se prepară din soluția stoc de ABTS, care se dizolvă în etanol sau apă distilată până la stabilizarea valorii absorbantei la $0,700 \pm 0,020$ unități la lungimea de undă de 734 nm.

Amestecul reactant constă din 0,3 ml extract antioxidant și 2,7 ml soluție ABTS. Reacția de reducere decurge la temperatura camerei timp de 6 min, iar procentul de inhibiție se calculează conform ecuației:

$$\% \text{ Inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=6 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} * 100, \quad (3)$$

unde $\text{Abs}_{t=0 \text{ min}}$ este valoarea absorbanței de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm a soluției ABTS^{•+}, iar $\text{Abs}_{t=6 \text{ min}}$ este valoarea absorbanței după incubare.

Valoarea indicelui TEAC este exprimată în mM Trolox/g(mg) substanță activă (biomasă), utilizând curba de calibrare pentru Trolox. Intervalul liniar pentru curba de calibrare este de 20 - 1000 μM Trolox ($r^2 = 0,9976$).

Evaluarea capacității de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu [150, 223] are la bază transferul de electroni produs în mediul alcalin cu reducerea complexului acid fosfomolibdenic/fosfovolframic în rezultatul căruia are loc formarea cromogenului care se determină spectrofotometric. Din soluția Folin-Ciocalteu de 4N se prepară soluția de lucru prin diluarea reagentului de 10 ori cu apă bidistilată.

La extractele antioxidante (0,3 ml) se adăugă 1,5 ml reagent Folin-Ciocalteu și 1,2 ml carbonat de sodiu de 7,5%. Amestecurile se agită și se incubează timp de 5 min la 50°C. În proba martor în loc de extract se adaugă solventul corespunzător (etanolul, apa). După răcirea probelor se măsoară absorbanta lor la 760 nm. Capacitatea de reducere a radicalului Folin - Ciocalteu se exprimă în echivalent acid galic la mg/g substanță activă sau biomasă. Curba de calibrare pentru acidul galic este lineară în intervalul 0,01-0,1 mg/ml ($n=6$, $r^2=0,999$).

Evaluarea capacității antioxidante prin metoda reducerii reagentului fosfomolibdenic (CRFM). În baza testului CRFM activitatea antioxidantă a probei se determină indirect, spectrofotometric, în baza reacției de oxido-reducere, în timpul căreia are loc reducerea Mo(VI) în Mo(V) cu formarea complexului verde fosfat/Mo(V) și are la bază transferul de electroni în mediul acid. Utilitatea metodei date constă în posibilitatea testării antioxidantilor solubilizați în solvenți foarte variați, cu grad diferit de polaritate [194]. Reagentul fosfomolibdenic se prepară reieșind din următoarea compoziție: 0,6 M acid sulfuric, 28 mM sodiu fosfat și 4 mM amoniu molibdat. Pentru realizarea testului la 0,3 ml soluție etanolică extract antioxidant se adaugă 2,7 ml soluție reagent fosfomolibdenic. Amestecurile se incubează la 95°C timp de 90 min. Probele se răcesc până la temperatura camerei, se măsoară extincția lor la 695 nm. În calitate de control negativ se utilizează solventul. Capacitatea antioxidantă se exprimă în mg trolox la g substanță activă sau biomasă. Calculul se efectuează în baza curbei de calibrare pentru trolox. Deoarece metoda dată presupune testarea activității antioxidante a extractelor etanolice, testului CRFM sunt supuse doar extractul hidro-etanolic de 55% și cel etanolic.

Estimarea gradului de peroxidare a lipidelor (testul dialdehidei malonice). Pentru aprecierea nivelului de dialdehidă malonică (DAM) în biomasa de nostoc se procedează în modul următor: la 1 ml biomasă cu concentrația de 5 mg/ml se adaugă 2 ml soluție acid tiobarbituric de 0,65% preparat în soluție 20% acid tricloracetic. Amestecul reactant este supus incubării la 95°C timp de 20 min. Probele se răcesc și se determină densitatea optică la lungimile de undă de 532 nm și 600 nm. Absorbanța determinată la 600 nm exclude turbiditatea nespecifică [100].

Determinarea cantitativă a ficobiliproteinelor a fost efectuată conform metodei spectrofotometrice elaborată de Boussiba și Richmond în modifi cația [245, 246]. Metoda este bazată pe determinarea absorbanței extractului hidric, obținut în rezultatul procedurii de congelare-decongelare repetată a biomasei de nostoc standardizate după concentrație. Absorbanța extractelor a fost măsurată la lungimile de undă 565, 620 și 650 nm, ce reprezintă maximumul de absorbție a ficoeretrinei, ficocianinei și aloficocianinei, respectiv, iar concentrațiile au fost calculate folosind ecuațiile 4-6:

$$\text{Ficoeretrina (mg/ml)} = [E_{565} - 0.572 (E_{620}) + 0.246 (E_{650})] / 5.26 \quad (4)$$

$$\text{Ficocianina (mg/ml)} = [E_{620} - 0.666 (E_{650})] / 3.86 \quad (5)$$

$$\text{Aloficocianina (mg/ml)} = [E_{650} - 0.05 (E_{620})] / 4.65 \quad (6)$$

unde: E este coeficientul de extincție, măsurat la 565, 620 și 650 nm.

Conținutul de ficobiliproteine sumare în biomasa de nostoc s-a determinat prin suma cantității de ficoeretrină, ficocianină și aloficocianină [77].

Conținutul de proteine în biomasă, a fost determinat spectrofotometric prin metoda propusă de Lowry [147]. Metoda se bazează pe extracția proteinelor cu NaOH 0,1N. La 0,1 ml probă (biomasă de nostoc 5,0 mg/ml) s-a adaugă 0,9 ml NaOH 0,1N și timp de 30 min are loc extracția. După care din soluția dată s-a luat 0,1 ml și s-a adaugat 0,4 ml apă distilată și 2,0 ml amestec (reactiv A - carbonat de sodiu 2% în 0,1N hidroxid de sodiu - și reactiv B - sulfatul de cupru 0,5% de citrat de sodiu 1,0%, care s-a preparat prin amestecarea a 49,0 ml reactiv - cu 1,0 ml reactiv B - s-a agitat bine și s-a lăsat în repaos 10 min la temperatura camerei. Apoi s-au adăugat 0,2 ml reagentul Folin și s-a agitat energic. Proba s-a lăsat timp de 30 min pentru dezvoltarea colorației și s-a măsurat absorbanța soluției la spectrofotometru la lungimea de undă 750 nm în cuve cu grosimea stratului de 1,0 cm.

Conținutul de proteine în % din BAU s-a determinat după formula:

$$E_{750} \cdot 50 \cdot 0,32 \cdot 100\% / m, \quad (7)$$

unde: E_{750} – absorbanța probei la lungimea de undă 750 nm;

0,32 – coeficientul de recalcul a cantității de peptide în mg/ml;

50 – diluția probei

m – masa probei absolut uscate (mg).

Conținutul de glucide a fost determinat prin metoda colorimetrică cu utilizarea reactivului antronic, standard-D-glucoza [288, 292]. Metoda este bazată pe deshidratarea hexozelor în prezența acidului sulfuric concentrat, urmat de condensarea acestora cu antron, care rezultă cu obținerea unei colorații albastre-verzui. În scopul dat la 0,25 ml probă supusă cercetării s-au adăugat 2,50 ml soluție antron (50,0 mg antron recristalizat în 100,0 ml H₂SO₄ de 66%). Amestecul s-a agitat minuțios, apoi eprubetele s-au transferat pe baia cu apă în fierbere și s-au lăsat în decurs de 30 min. Apoi, eprubetele cu probe s-au răcit sub apă curgătoare și s-au lăsat la întuneric pentru expoziție timp de 30 min. Soluțiile colorate s-au colorimetrat la fotocolorimetru la lungimea de undă de 620 nm în cuve de 0,5 cm.

Conținutul de glucide s-a determinat după formula:

$$E_{620} \cdot 100 \cdot 1,25 / m, \quad (8)$$

unde: E₆₂₀ - absorbanta soluției la lungimea de undă 620 nm;

1,25 – coeficientul de recalcul a cantității de glucide în mg/ml;

m – masa probei absolut uscate, mg.

Determinarea cantitativă a lipidelor generale s-a realizat prin metoda colorimetrică, bazată pe determinarea produselor de degradare a lipidelor utilizând setul de reagenți: acizii sulfuric și fosforic concentrat, vanilină (LAHEMA) [38, 112, 121]. În scopul menționat la 0,5 ml probă (concentrația 7,0 mg/ml) s-a adăugat 1,5 ml H₂SO₄(c). Proba s-a supus hidrolizei la baia de apă timp de 10 minute. Apoi proba s-a răcit până la temperatura camerei. La 0,5 ml de hidrolizat colectat s-a adăugat 1,5 ml amestec fosfovanilinic (trei părți H₃PO₄(c) amestecat cu o parte soluție 0,6% de vanilină cu apă). După agitare s-a lăsat la întuneric timp de 45 minute la temperatura camerei. Extincția s-a măsurat la fotocolorimetru, la lungimea de undă de 560 nm în cuvă de 10,0 mm.

Conținutul de lipide generale s-a calculat conform formulei:

$$E_{560} \cdot 100 \cdot 0,96 \cdot m, \quad (9)$$

unde: E₅₆₀ - absorbanta soluției la lungimea de undă 560 nm;

0,96 – coeficientul de recalcul a cantității de lipide generale (mg/ml);

m – masa probei, (mg).

2.2. Modificarea cantității și calității biomasei de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital în condiții de producere și de laborator

Culturile microbiene statice sunt caracterizate prin stabilitatea ciclului vital, care poate fi reflectat în forma unui grafic – curba de creștere. Cunoașterea evoluției populației microbiene are o deosebită importanță pentru stabilirea perioadelor de recoltare industrială atât a biomasei, cât și a metaboliților primari și secundari. Productivitatea este unul din parametrii principali ce caracterizează creșterea și dezvoltarea cianobacteriilor [17].

Anterior au fost efectuate astfel de cercetări pentru cultura de *Porphyridium cruentum* și cea de *Haematococcus pluvialis* [11, 15]. Porfiridiumul are același tip de comportament pe durata ciclului vital atât în condiții standard, cât și în condiții de stres oxidativ, dar amplitudinea modificărilor care au loc în activitatea antioxidantă a extractelor este mai pronunțată în condiții de stres. Conform rezultatelor obținute, modificarea producerii de biomasă (reducere, sporire) pe durata celor trei faze ale ciclului vital al hematococului – celule mobile verzi, ciști bruni și ciști roșii demonstrează că în condiții de stres oxidative provocat de compușii coordinativi ai cobaltului cu bazele Shiff are loc o acumulare intensă de biomasă, iar în condiții de stres are loc o acumulare mai pronunțată a carotenoizilor [11]. Sinteza carotenoizilor intervine drept unul din factorii de bază care determină statutul antioxidant al microalgei. Acumularea lor în exces prezintă o reacție de răspuns a celulelor la prezența complexelor metalice care provoacă stare de stres oxidativ. De asemenea producerea de carotenoizi prezintă un răspuns de neutralizare a radicalilor liberi, care se formează în avalanșă în asemenea condiții. În cazul hematococului pe durata ciclului vital doar o analiză comparativă a proceselor de acumulare a biomasei și de sinteză a carotenoizilor poate oferi o informație veridică despre starea culturii. Evidențierea etapelor vulnerabile ale ciclului vital nu este posibilă doar în baza unui singur indicator – a cantității de biomasă la momentele reale de timp studiate. Din aceste considerente evaluarea productivității urmează a fi realizată doar în paralel cu alți indicatori, care caracterizează starea funcțională a celulelor. În cazul microalgei *Haematococcus pluvialis* un astfel de indicator este cantitatea de caroten în biomasă la etapa de celule verzi, iar la etapa de aplanospori – cantitatea de aplanospori [11].

În cazul nostocului care se caracterizează prin varietate mare a componentelor biomasei se monitorizează atât procesul de acumulare a biomasei, cât și modificarea conținutului principalilor compuși din componența acestei biomase. Aceste modificări pot oferi informații utile despre statutul biomasei de nostoc pe durata dezvoltării culturii statice.

În reprezentarea grafică a dinamicii acumulării de biomasă în cultura statică de *Nostoc linckia*, în condiții de laborator și de producere pot fi evidențiate fazele specifice, cunoașterea cărora are o importanță majoră pentru biotehnologie (Figura 2.1). În condiții de laborator se pornește de la un unocul de 0,2 g/L, iar în cele industriale – de la 0,4 g/L, ceea ce este dictat de specificul aplicării sistemelor industriale.

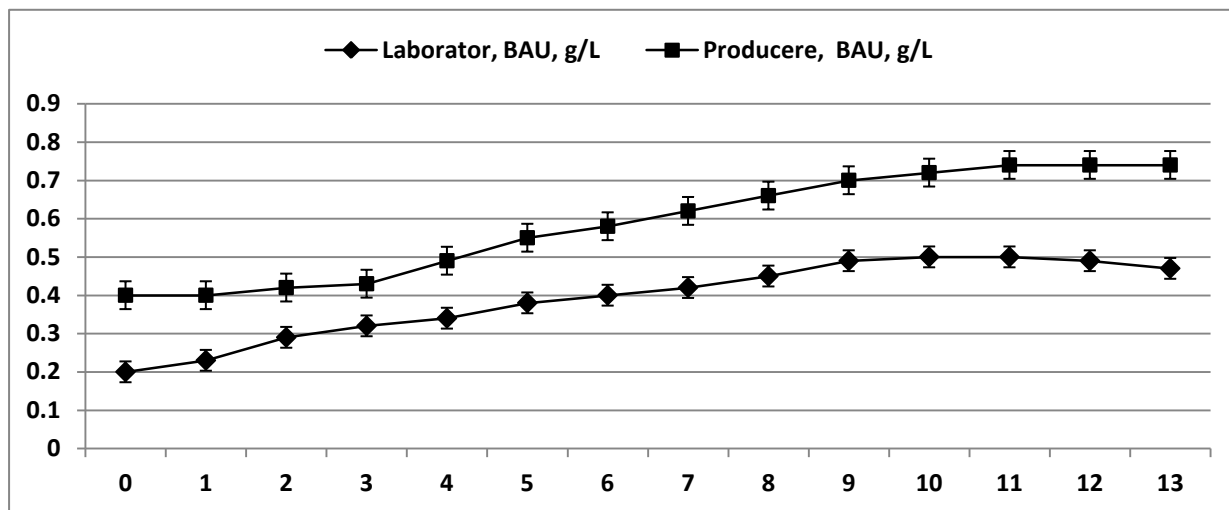


Fig. 2.1. Acumularea biomasei pe parcursul ciclului vital la *Nostoc linckia* în condiții de laborator și de producere

În condiții de laborator faza lag, în cursul căreia are loc reprogramarea metabolică a culturii, în cazul nostocului este redusă la limite imperceptibile, deoarece a fost utilizat un inocul consistent, iar inocularea acestuia s-a făcut în mediu de cultură identic cu cel în care a fost cultivată cultura din inocul. Faza de latență, ca și faza de accelerare a ritmului de creștere nu pot fi înregistrate ca fluctuații a cantității de biomasă în condiții de laborator.

Altfel stau lucrurile în condiții de producere. Am menționat deja, că în condiții industriale adaptarea culturilor are loc mai lent deoarece condițiile industriale nu sunt identice condițiilor de obținere a inoculului. Ca rezultat, primele două faze ale ciclului vital în condiții industriale se depistează cu ușurință, având o exprimare clasică în lipsa ori ritmul extrem de lent al diviziunii celulare și creșterii numerice.

Pentru cultura statică de *Nostoc linckia* faza de multiplicare exponențială în condiții de laborator este progresivă până la ziua a 9-a de cultivare, iar în condiții de producere – până la ziua a 10-a, ceea ce presupune o creștere a culturii la o rată constantă până la epuizarea substanțelor nutritive din mediul de cultivare. La sfârșitul fazei exponențiale se evidențiază o perioadă de încetinire a ritmului de creștere a tulpinii, după care cultura intră în faza staționară

(rata de creștere 0). În condiții de producere faza staționară este de durată mai lungă. Dacă cultura de laborator intră în faza de declin începând cu ziua a 12-a, cultura industrială și la cea de a 13-a zi de cultivare este în fază staționară stabilă. Ciclul vital al culturii statice de *Nostoc linckia* relevă un model de creștere caracteristică, iar durata optimă din punct de vedere biotehnologic este de 12 zile în condiții de producere, și 10 zile în condiții de laborator.

Pe durata ciclului vital se modifică și conținutul biochimic al biomasei de nostoc, iar de aici și caracterul acțiunii antioxidante a biomasei și respectiv a extractelor sau a preparatelor complexe obținute în baza acestei biomase. În scopuri biotehnologice este foarte importantă stabilirea perioadelor de recoltare optime pentru obținerea unui complex antioxidant eficient. În continuare au fost studiate modificările cantitative în principalele componente ale biomasei de nostoc (lipide, glucide, proteine, ficobiliproteine, fenoli). Pentru a monitoriza ce schimbări intervin pe parcursul ciclului vital la nivelul activității biosintetice au fost determinate principalele componente ale biomasei de nostoc la fiecare 24 ore de cultivare. În Figura 2.2 sunt prezentate rezultatele privind dinamica conținutului de fenoli în biomasa de nostoc pe parcursul ciclului vital.

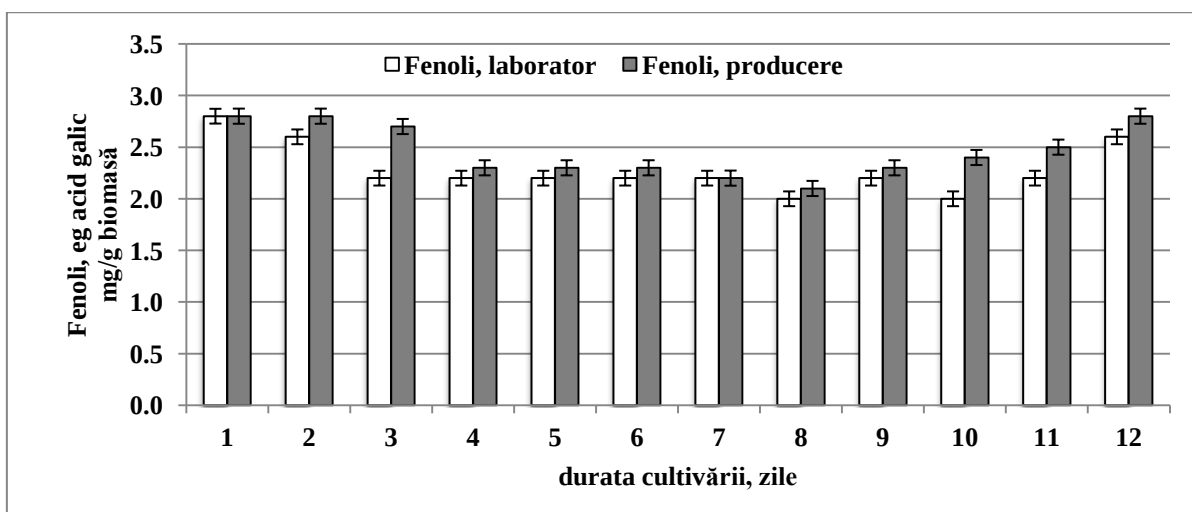


Fig. 2.2. Cantitatea de fenoli în biomasa de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital în condiții de laborator și de producere

Conținutul de fenoli în biomasa de nostoc pe durata ciclului vital este un indicator destul de stabil în timp. Un nivel mai ridicat al acestora se atestă la începutul cultivării și la finele acesteia atât în condiții de laborator, cât și în cele de producere. Condițiile industriale se caracterizează prin menținerea nivelului inițial înalt de fenoli timp de 3 zile din momentul inoculării și printr-o tendință constantă de creștere în faza staționară. În condiții de laborator creșterea nivelului de fenoli în biomasă are loc doar la intrarea culturii în faza de declin.

Ficobiliproteinele constituie o componentă importantă a biomasei de nostoc. Fiind pigmenți fotosintetici (auxiliari) aceștia, de rând cu clorofila și carotenoizii, determină intensitatea proceselor de biosinteză a materiei organice, și deci, asigură creșterea biomasei celulare. Cantitatea ficobiliproteinelor totale în biomasa de *Nostoc linckia* în ambele cazuri precăutate este în ascensiune ușoară de la inoculare și până la finele etapei de creștere exponențială, după care cantitatea lor în biomasă începe să scadă, ceea ce corespunde scăderii intensității fotosintezei în faza staționară și începutul celei de declin (Figura 2.3).

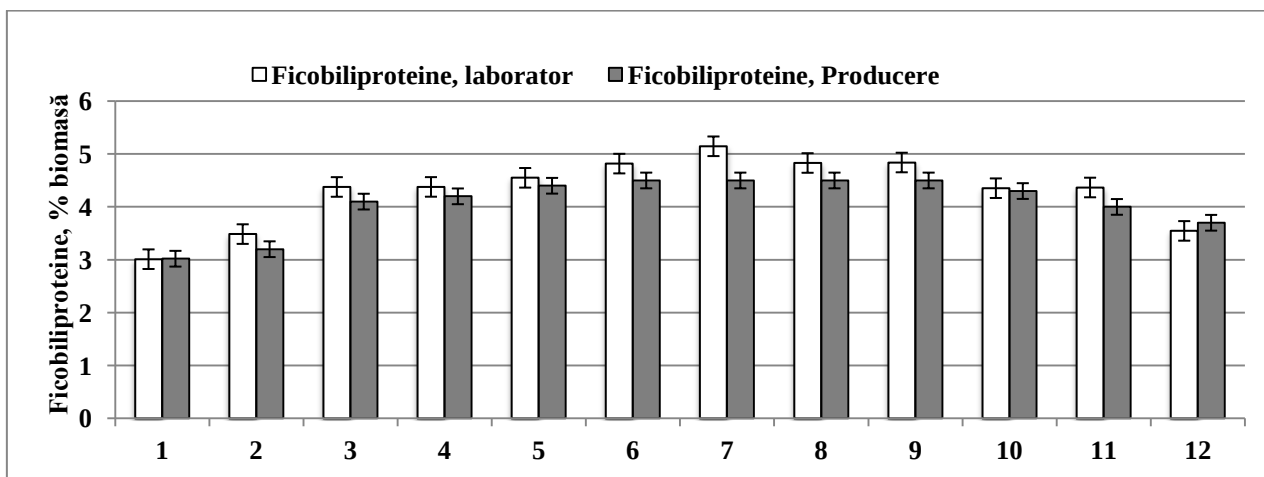


Fig. 2.3. Cantitatea ficobiliproteinelor totale în biomasa de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital în condiții de laborator și de producere

Aceste rezultate de fapt reflectă fluctuațiile procesului de fotosinteză, care au loc cel mai intens în etapa de creștere exponențială a culturii. Ca urmare, anume în acest interval de timp cantitatea pigmenților auxiliari fotosintetici este maximală.

Cu toate că față de alte cianobacterii biomasa de *Nostoc linckia* conține o cantitate mai joasă de proteine, importanța acestora, ca și în orice tip de celulă este una vitală. Fluctuațiile calorice ale cantității de proteine poate reflecta acumularea ori utilizarea substanțelor de rezervă, activarea ori inhibarea activității enzimatice ș.a. Cantitatea de proteine în biomasa nostocului este maximală în primele două zile de cultivare atât în condiții de laborator, cât și în cele de producere și se menține la un nivel înalt până la jumătatea fazei exponențiale de creștere, după care urmează o scădere, care este mai pronunțată în condiții de laborator. Aceste modificări cel mai probabil, sunt determinate de micșorarea intensității proceselor enzimatice de protecție, adaptare și a celor metabolice de bază. Rezultatele sunt prezentate în Figura 2.4.

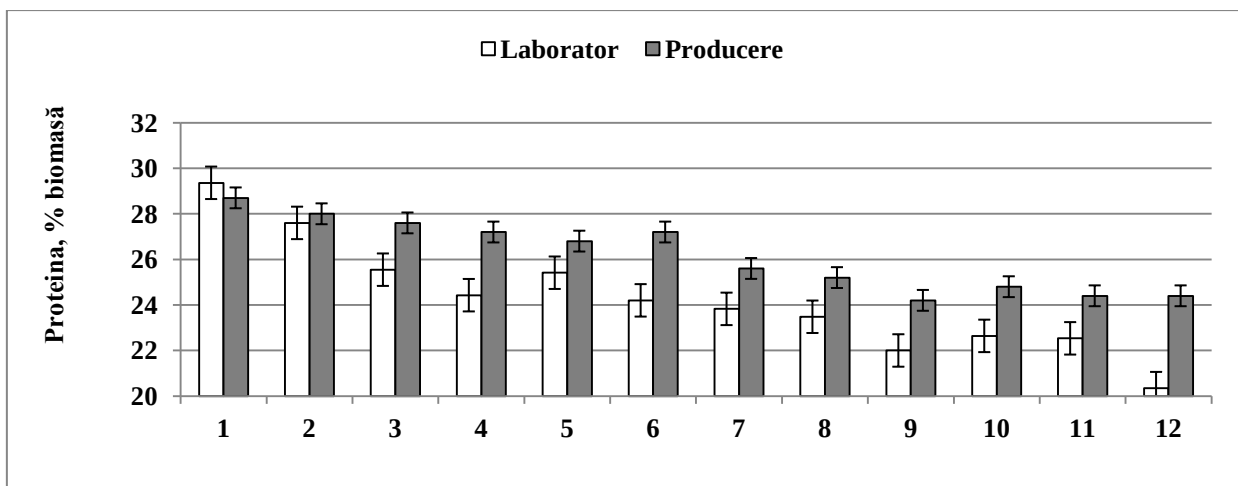


Fig. 2.4. Cantitatea proteinelor în biomasa de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital în condiții de laborator și de producere

Rezultatele obținute pentru cantitatea de proteine în biomasa de nostoc de-a lungul ciclului vital încă o dată confirmă perioadele optimale pentru recoltarea biomasei. Astfel, în condiții de laborator la ziua a 12-a de cultivare cantitatea de proteină scade simțitor, deci recoltarea unei biomase calitative trebuie efectuată mai devreme, așa cum am recomandat anterior – la ziua a 10-a din momentul inoculării.

Compușii glucidici prezintă fracția majoră a biomasei de nostoc. Pe lângă funcțiile tipice pe care le au acești compuși în celulă, în cazul nostocului aceștia mai sunt și componentele structurale ale capsulei celulare, strâns atașate de peretele celular. Funcția de bază ale acestor polizaharide este de a proteja celulele de nostoc de disecare. Specia *Nostoc linckia*, fiind o specie edafică se confruntă în natură adesea cu acest fenomen, iar pe durata procesului evolutiv, formarea unei capsule strâns atașate de peretele celular este un mecanism eficient de protecție și adaptare. Capsula celulară are rol de structură de protecție și față de alți factori nefavorabili. De exemplu, aceasta asigură supraviețuirea celulelor în medii cu concentrații înalte de compuși cu toxicitate înaltă, cum ar fi, de exemplu, metalele grele. Rolul protector al compușilor glucidici constă în sorbția toxicanților pe site-urile active și diminuarea pe această cale, a impactului lor asupra celulelor. Fiind un component al biomasei cu rol de protecție, în condiții normale fluctuațiile cantitative a glucidelor nu ar trebui să fie observate.

Rezultatele obținute pe durata studiului ciclului vital la *Nostoc linckia* confirmă acest lucru (Figura 2.5).

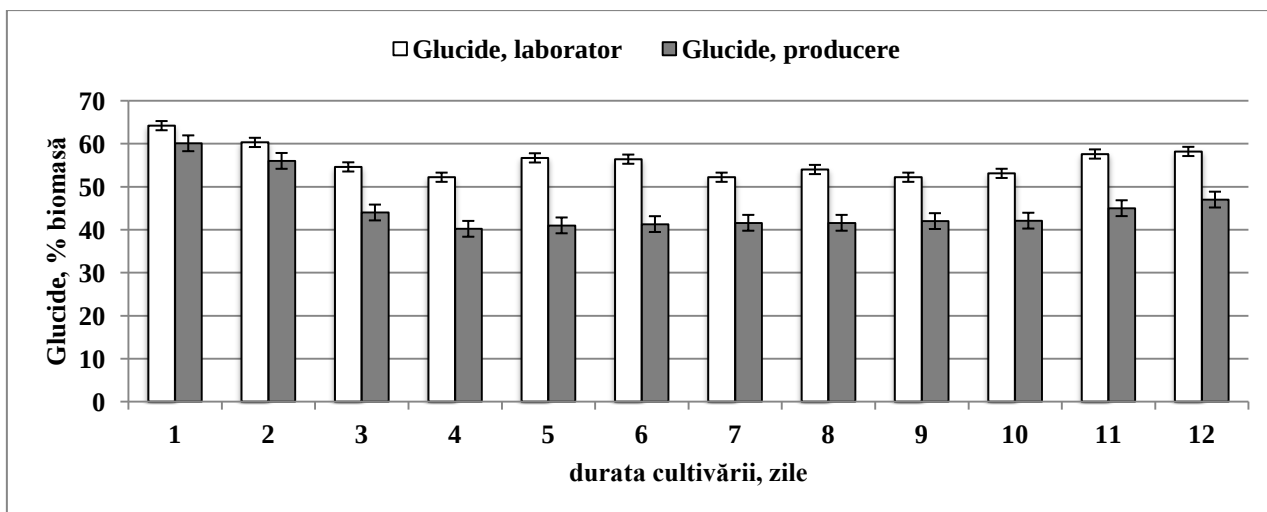


Fig. 2.5. Cantitatea glucidelor în biomasa de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital în condiții de laborator și de producere

Din figură se vede, că pe durata ciclului vital în condiții de laborator se înregistrează fluctuații neînsemnate în cantitatea de glucide din biomasa de nostoc. În cazul condițiilor de producere în primele zile se înregistrează o scădere esențială a acestui indiciu, cu până la 34% față de condițiile de laborator. Pe durata fazei creșterii exponențiale se păstrează de asemenea un nivel mai jos cu peste 30 % a glucidelor. Explicația este în condițiile industriale de creștere, care includ sisteme cu malaxoare care în permanență mișcă fluxurile de mediu cu celule de nostoc, iar în acest proces are loc dispersarea treptată a straturilor exterioare în mediul nutritiv. În condiții de laborator acest fenomen de asemenea are loc, dar la cote incomparabil mai mici față de condițiile de producere.

Ultimul component al biomasei monitorizat în acest compartiment al lucrării sunt lipidele. Cianobacteria *Nostoc linckia* face parte din speciile cu conținut redus de lipide, acestea alcătuind până la 3 % din biomasa absolut uscată. În asemenea cantități, lipidelor le revine în special funcția de parte componentă a membranelor celulare și a celor funcționale, în deosebi, pe care sunt localizați ficobilisomii. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 2.6. Se observă menținerea unui nivel stabil al lipidelor în biomasa de nostoc pe întreaga durata a ciclului vital. În condiții de laborator se observă o ușoară creștere a cantității de lipide, ceea ce este tipic pentru culturile în fază de declin și în proces de degradare.

Astfel, putem concluziona, că atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere cultura statică de *Nostoc linckia* prezintă fazele tipice culturilor microbiologice. În condiții de producere are loc lungirea fazei staționare, fără elemente specifice declinului culturii. În condiții de laborator, datorită transferului de cultură în condiții similare cu cele pentru obținerea

inoculului, faza de latență este practic imperceptibilă, iar în condiții de producere are aspect clasic cu lipsa completă a creșterii culturii.

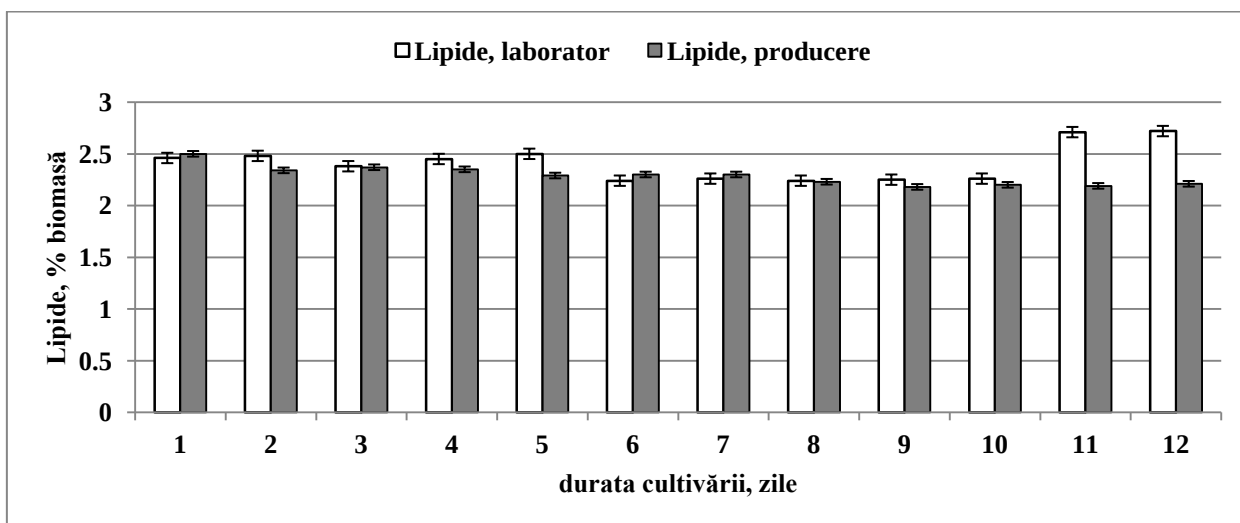


Fig. 2.6. Cantitatea lipidelor în biomasa de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital în condiții de laborator și de producere

Cele mai inerte componente ale biomasei de nostoc pe durata ciclului vital sunt glucidele și lipidele. Cantitatea acestora, în special pe durata fazei de creștere exponențială și staționară rămâne constantă. Cantitatea proteinelor totale și a ficobiliproteinelor descrește în a doua jumătate a fazei exponențiale de creștere. Astfel, pe durata ciclului vital modificările cantitative ale principalelor componente ale biomasei de nostoc au limite destul de restrânse, ceea ce caracterizează cultura de *Nostoc linckia* ca una cu grad ridicat al homeostaziei. Acest lucru ușurează semnificativ manipularea culturii în condiții industriale și simplifică procedurile din cadrul tehnologiilor aplicate.

2.3. Modificarea activității antioxidante a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital

Anterior a fost demonstrat, că valorile testelor antioxidante corelează cu componența biochimică a extractelor care se supun testării [10, 11, 15]. Cel mai semnificativ dintre studiile efectuate în laboratorul Ficobiotehnologie este exemplul culturii de *Haematococcus pluvialis*. În cazul acestei culturi extractele etanolice din biomasă sunt practic monocomponente, deoarece în cazul fazei de celule verzi acesta este prezentat prin β -caroten, iar în cazul aplanosporilor – prin astaxantină. În asemenea condiții între valorile testului ABTS și conținutul de carotenoizi în extracte este o corelare foarte strânsă, coeficientul de determinare fiind mai mare de 0,9. În asemenea condiții este absolut suficientă determinarea acestor doi carotenoizi la etapele

respectiv pentru a putea face o concluzie reală despre starea culturii, fie în condiții normale, fie în cele de stres oxidativ indus [10]. În cazul altor culturi, inclusiv de *Nostoc linckia* este necesar de efectua testele antioxidante a extractelor, care se caracterizează prin componență variată, iar nici unul din componentele lor nu este determinat în formarea valorilor capacității de inhibiție a radicalilor.

Pornind de la scopul care stă în fața procesului tehnologic de producere a biomasei de cianobacterii și microalge, este foarte important să cunoaștem situația la moment pentru toți parametrii care au tangență la acest scop. În cazul nostru, este necesar de a obține un echilibru între cantitatea de biomasă obținută și activitatea antioxidantă în ea. În această parte a lucrării sunt reflectate rezultatele cercetărilor orientate spre stabilirea activității antioxidante a extractelor din biomasa de nostoc pe durata ciclului de dezvoltare. Au fost aplicate mai multe metode de determinare a activității antioxidante, care în prezent sunt aplicate pentru diferite tipuri de extracte vegetale și care scot în evidență diferite mecanisme de acțiune a antioxidantilor din componența biomasei. Inițial potențialul antioxidant al extractelor din biomasa de nostoc a fost evaluat cu aplicarea a doi radicali nonbiologici DPPH[•] și ABTS^{•+}. Reducerea radicalilor DPPH[•] și ABTS^{•+}, care indică acumularea substanțelor cu efect antioxidant, se face în baza mecanismului transferului de hidrogen (H[•]) și electroni (e⁻). Rezultatele obținute pentru cultura crescută în condiții de laborator sunt prezentate în Figura 2.7.

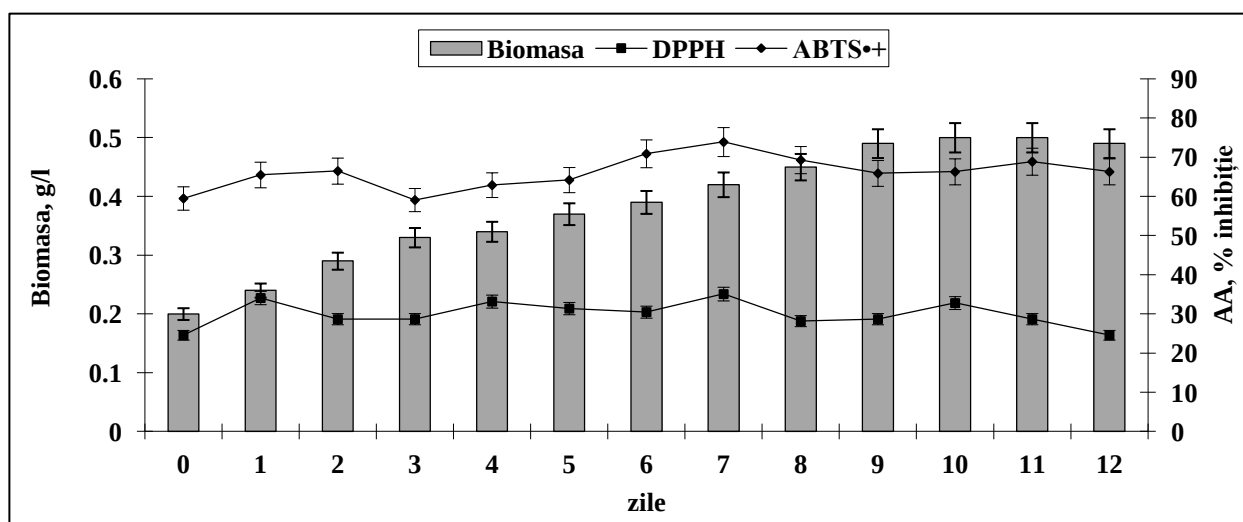


Fig. 2.7. Activitatea antiradicalică a extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* (condiții de laborator) pe parcursul ciclului vital

Testul DPPH[•] este util pentru a compara sau pentru a monitoriza evoluția activității antioxidante în obiectele biologice ori pentru a determina eficiența tipului de solvent utilizat pentru a extrage componentele antioxidante. A fost stabilit, că pe durata ciclului vital, valoarea

activității antioxidante a fracțiilor hidrosolubile din biomasa de nostoc obținută în condiții de laborator oscilează în limitele a 24,6-35,1 % inhibiție radical DPPH[•]. Fluctuațiile ce se produc pe parcursul perioadei de cultivare, determinate de o majorare sau o scădere a procentului de inhibiție de la aceste valori, evidențiază necesitatea adaptării culturii de nostoc în fazele de creștere și, respectiv, răspunsul antioxidant al culturii la modificările metabolice cauzate de procesele de creștere și dezvoltare.

Cele mai mari valori se înregistrează după 24 ore de la inoculare – 34,1% inhibiție, și pe durata zilelor 4-7 ale ciclului de cultivare (30,5-35,1% inhibiție), ce caracterizează faza exponențială de creștere a nostocului considerată una cu activitate biosintetică sporită. O inhibiție pronunțată a radicalului DPPH[•] în prima zi după inocularea culturii (de la 24,6 % inhibiție până la 34,1 % inhibiție), se explică prin activarea mecanismelor de adaptare metabolică la noile condiții ale mediului. Faza de accelerare a ritmului de creștere (ziua a 3-a) este marcată de o creștere a inhibiției radicalului DPPH[•] de la 28,7 la 33,2 %, iar faza de încetinire a ritmului de creștere care precede faza staționară (ziua a 8-a) se caracterizează prin scăderea nivelului de reducere a radicalului DPPH[•] de la 35,1 % la 28,2 %. Totodată, la ziua a 10-a de cultivare, când cultura este pe platou, fracțiile hidrosolubile au manifestat o inhibiție de 32,8 % a radicalului DPPH[•]. Modificările produse în etapa de declin au influențat potențialul antioxidant al biomasei și, ca rezultat, extractele hidrice obținute la ziua a 12-a de cultivare au prezentat cele mai mici valori de 24 % inhibiție radical DPPH[•].

A fost stabilit că rezultatele testului DPPH aplicat în studiul extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* corelează cu fazele de creștere. Valorile maxime ale testului DPPH au fost înregistrate în prima zi (faza lag), ziua a 4-a (începutul fazei de creștere exponențială), ziua a 7-a (mijlocul fazei exponențiale) și ziua a 10-a (faza staționară).

Astfel, prin salturi ale inhibiției radicalului DPPH[•] sunt marcate momentele cruciale în dezvoltarea culturii de nostoc – trecerea de la o condiție fiziologică la alta. Rezultatele obținute confirmă faptul că testul DPPH reflectă obiectiv modificările statutului antioxidant ale fracțiilor hidrosolubile din biomasa nostocului.

Extractele hidrice obținute în baza biomasei de nostoc au manifestat, de asemenea, o capacitate înaltă de reducere a radicalului cation ABTS^{•+} pe durata întregului ciclu vital. Ca și în cazul testului DPPH, testul ABTS permite sesizarea fazei de latență la începutul ciclului vital. Astfel, extractele hidrice obținute din biomasa de nostoc, colectată în prima și a doua zi de cultivare, au manifestat un nivel comparativ redus de inhibiție a radicalului ABTS^{•+} (65,5 și 66,5 % inhibiție, respectiv). La ziua a 3-a de cultivare – faza accelerării creșterii – se observă un salt

negativ al puterii de inhibiție a radicalului până la valoarea inițială din momentul inoculării – 59,1%. În faza de creștere exponențială după perioada de adaptare a culturii la condițiile noi de mediu se observă tendința de sporire a activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasa de nostoc, care atinge maximum în ziua 7 cu o valoare de 73,9 % inhibiție radical ABTS⁺. De remarcat că valorile înregistrate în faza exponențială de creștere a cianobacteriei *Nostoc linckia* corespund cu rezultatele altor cercetători, care au fost obținute în screening-ul activității antioxidante a unor tulpini de cianobacterii și microalge. Astfel, a fost stabilit că extractele din *Nostoc muscorum* asigură un nivel de aproximativ 70 % inhibiție radical ABTS⁺ [218].

Creșterea activității antioxidante determinată prin testul ABTS, începând cu ziua 4-a de cultivare, este specifică fazei de creștere exponențială, caracterizată prin intensificarea activității biosintetice și, respectiv, prin formarea de SRO, ceea ce intensifică sinteza componentelor antioxidante. În faza staționară, extractele hidrice manifestă o activitate antioxidantă de 66-69 % inhibiție radical ABTS⁺.

Același tip de analiză a fost realizat și pentru cultura de nostoc crescută în condiții industriale. Rezultatele pentru testele DPPH și ABTS sunt prezentate în Figura 2.8.

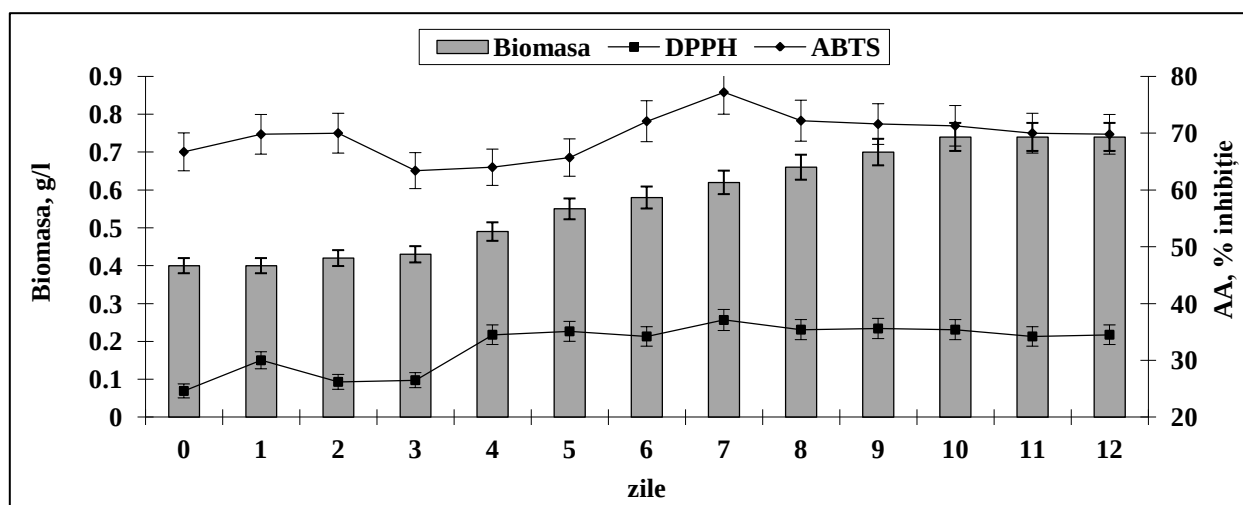


Fig. 2.8. Activitatea antiradicalică a extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* (condiții de producere) pe parcursul ciclului vital

Similar biomasei obținute în condiții de laborator, fluctuații evidente ale activității antioxidante sunt caracteristice fazei de latență (cu creșterea activității antiradicalice față de ambii radicali testați). În cazul testului DPPH avem o activitate antiradicalică practic pe întreaga durată a fazei de creștere exponențială și a perioadei staționare. În cazul testului ABTS se atestă aceeași situație, cu excepția că mijlocul fazei de creștere exponențiale este marcat printr-o creștere de scurtă durată a activității antiradicalice față de radicalul cation. Putem spune că în

condiții de producere, odată stabilizată, cultura de *Nostoc linckia* se caracterizează prin indici de activitate stabili, ceea ce este foarte convenabil în cazul transferului tehnologic.

În continuare, a fost studiată activitatea antioxidantă a extractelor etanolice obținute din aceeași biomasă de nostoc pe durata ciclului vital. Testele DPPH și ABTS relevă un nivel mai mic de inhibiție a radicalilor nonbiologici comparativ cu cel înregistrat de extractele hidrice, iar activitatea antioxidantă nu este marcată de fluctuații valorice importante pe parcursul fazelor de creștere, cu excepția creșterii activității în primele 24 ore ce caracterizează momentul inoculării culturii (Figura 2.9).

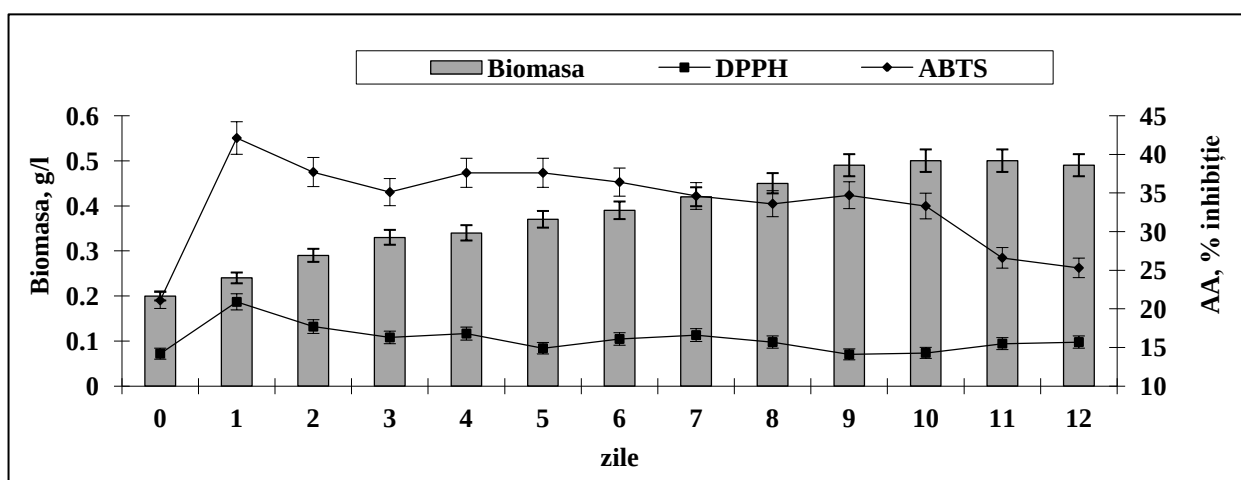


Fig. 2.9. Activitatea antiradicalică a extractelor etanolice din biomasă de *Nostoc linckia* (condiții de laborator) pe parcursul ciclului vital

În cazul testului DPPH, activitatea antioxidantă a extractelor etanolice din biomasă de nostoc a înregistrat un procent mediu de inhibiție de aproximativ 14-17 % pe durata ciclului vital. Valorile testului ABTS sunt cuprinse în limitele 33-37 % inhibiție în faza exponențială de creștere. Se observă o stabilitate a activității antioxidante prezentată de extractele etanolice din biomasă de nostoc. Prin urmare, ponderea componentelor antioxidante solubile în alcool poartă un caracter stabil și constant care nu ar depinde de etapa de dezvoltare a culturii statice. La etapa de inițiere a creșterii culturii, testele DPPH și ABTS reflectă o singură modificare evidentă pe parcursul căreia are loc o creștere spectaculoasă în prima zi (cu 20 % în cazul testului ABTS), ce se explică prin aceleași mecanisme de adaptare metabolică ca urmare a inoculării culturii. Decalajul înregistrat în etapa de declin a culturii (26 % inhibiție radical $ABTS^{++}$) se explică prin activarea proceselor de deteriorare a componentelor celulare ca rezultat al îmbătrânirii culturii

Din biomasa obținută în condiții de producere de asemenea au fost obținute extractele etanolice și au fost efectuate testele DPPH și ABTS. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 2.10.

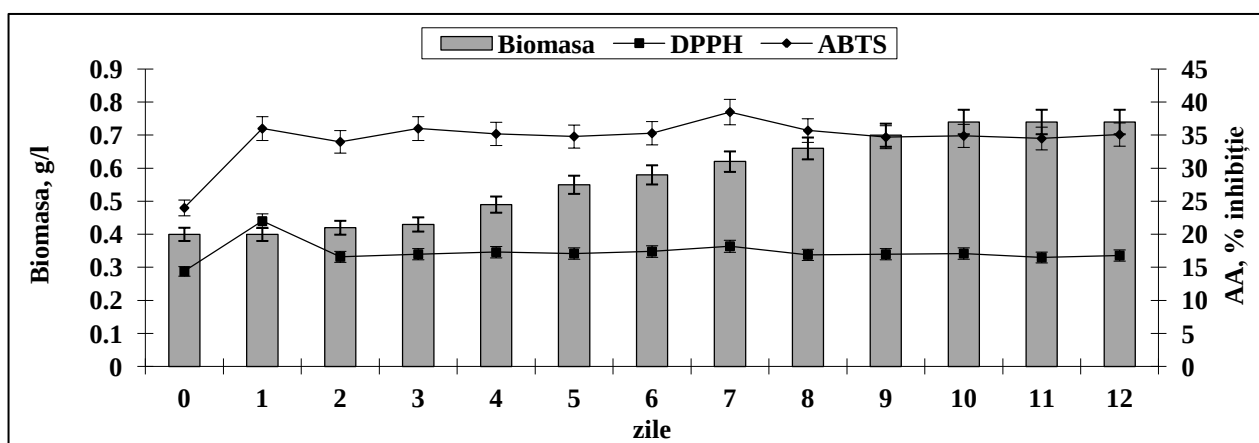


Fig. 2.10. Activitatea antiradicalică a extractelor etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* (condiții de producere) pe parcursul ciclului vital.

CÎn condiții de producere, ca și în cele de laborator, se înregistrează un salt specific al activității antiradicalice pe durata perioadei de latență, atîta timp cît are loc adaptarea culturii la noile condiții, după care ambele teste înregistrează valori destul de stabile.

Rezultatele acestor două teste (DPPH și ABTS) demonstrează, că cultura de nostoc în condiții de laborator manifestă un comportament mai variat în ceea ce ține de acumularea componentelor antioxidante hidro- și etanolsolubile. Astfel, prin fluctuații valorice se manifestă perioada de latență, începutul și mijlocul fazei de creștere exponențială, perioada de declin. În condiții de producere este evidentă o singură variație a capacității de reducere a radicalilor liberi la începutul ciclului vital. După ce cultura s-a adaptat la noile condiții de mediu, activitatea antiradicalică a extractelor hidrice și etanolice din biomasa de nostoc rămân stabile până la finele experienței. Astfel, în zilele a 10-12-a de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* în condiții de producere se menține practic același nivel al biomasei și a activității antioxidante a acestei biomase, ceea ce este util în producere.

Pentru a verifica cele constatate cu aplicarea testelor ABTS și DPPH în extractele etanolice a fost determinată capacitatea de reducere a reagentului fosfo-molibdenic, care permite evidențierea activității antioxidante a componentelor lipofile ale extractelor. Rezultatele pentru extractul din biomasa de nostoc obținută în condiții de laborator sunt prezentate în Figura 2.11.

Testul CRFM de asemenea evidențiază perioadele sensibile pe durata ciclului vital al nostocului. Astfel, în faza de latență capacitatea de reducere scade de 2,0-3,7 ori, după care

urmează o creștere foarte semnificativă – de 2,9 ori față de nivelul inițial care se atestă la ziua a 4-a – care corespunde începutului fazei creșterii exponențiale. După aceasta nivelul de reducere a reagentului fosfo-molibdenic se menține stabil la valori între 52 și 72 mg echivalent acid ascorbic la gram de biomasă. Începutul perioadei de declin este asociată cu scăderea radicală a activității antioxidante a extractului etanolic – de 2,7 ori față de ziua precedentă (a 11-a).

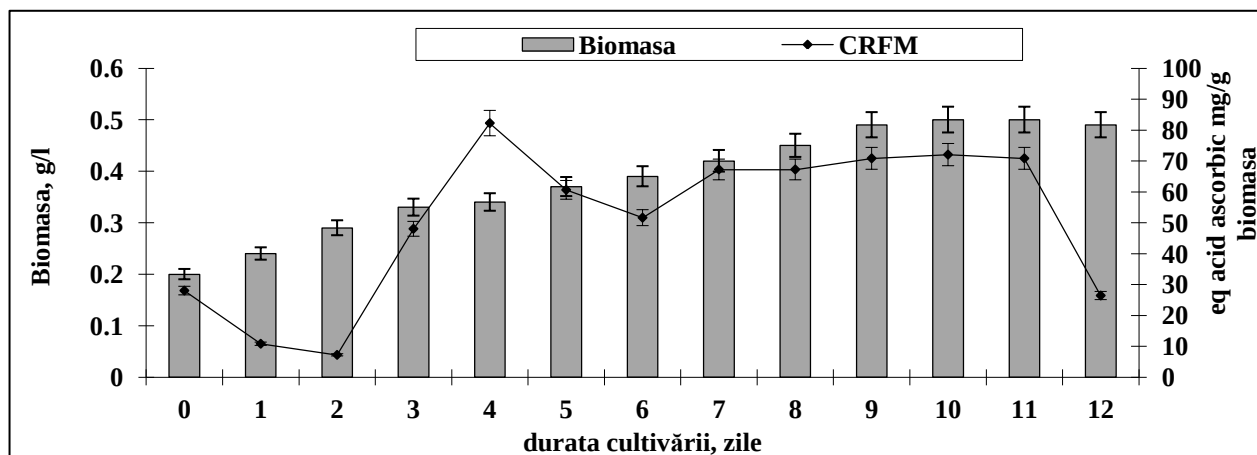


Fig. 2.11. Capacitatea de reducere a reagentului fosfo-molibdenic - CRFM (eq acid ascorbic, mg/g BAU) a extractelor etanolicе din biomasа de *Nostoc linckia* (condiții de laborator) pe parcursul ciclului de cultivare.

Rezultatele obținute pentru extractul etanolic din biomasа de nostoc obținută în condiții de producere sunt prezentate în Figura 2.12.

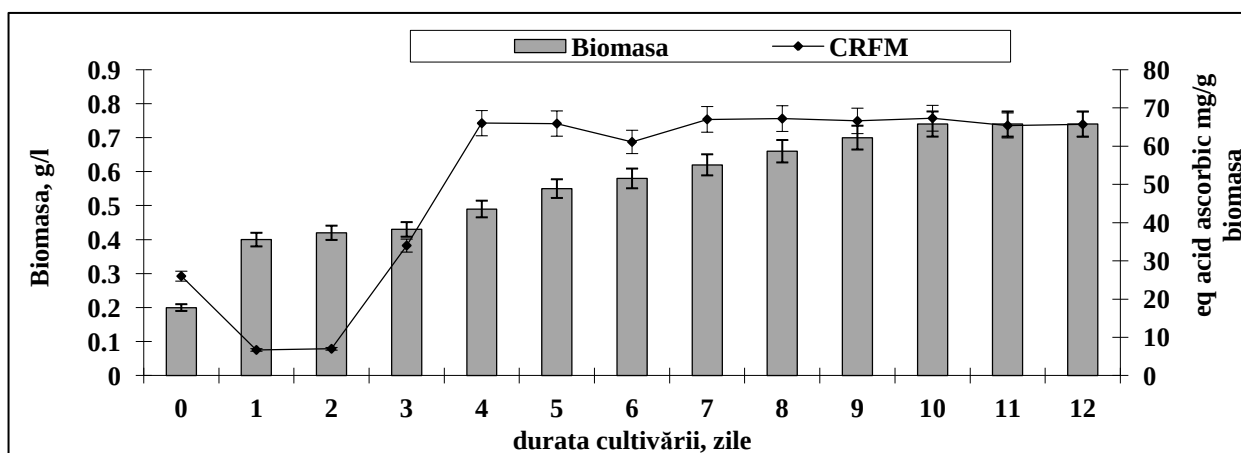


Fig. 2.12. Capacitatea de reducere a reagentului fosfo-molibdenic - CRFM (eq acid ascorbic, mg/g bm) a extractelor etanolicе din biomasа de *Nostoc linckia* (condiții de producere) pe parcursul ciclului de cultivare.

În condiții de producere are loc aceeași scădere esențială a capacității antioxidante a extractului din biomasa aflată în faza de latență și o creștere foarte semnificativă la începutul fazei creșterii exponențiale. După ziua a patra de cultivare activitatea antioxidantă a extractelor etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* rămâne la același nivel până la sfârșitul experienței.

Experiențele descrise mai sus au demonstrat, că cei mai stabili parametri pentru cultura de nostoc în condiții de laborator se obțin la ziua a 10-11-a de cultivare, ce corespunde fazei staționare. Această perioadă se caracterizează prin cel mai înalt nivel al biomasei și cea mai stabilă activitate antiradicalică și antioxidantă. În condiții de producere, perioada de recoltare a biomasei în aceleași scopuri poate fi extinsă cu mai multe zile, demonstrat în lucrare – până la ziua a 12-a. Deci, din punct de vedere economic, termenii indicați sunt cei mai avantajoși, rămâne însă de stabilit dacă biomasa obținută este sigură pentru utilizarea ulterioară. Anterior a fost demonstrat, că calitatea biomasei poate fi apreciată în baza testului de determinare a produselor peroxidării lipidelor – testul DMA [15]. Din aceste considerente pe durata ciclului vital a fost monitorizat nivelul DAM în biomasă (Figura 2.13)

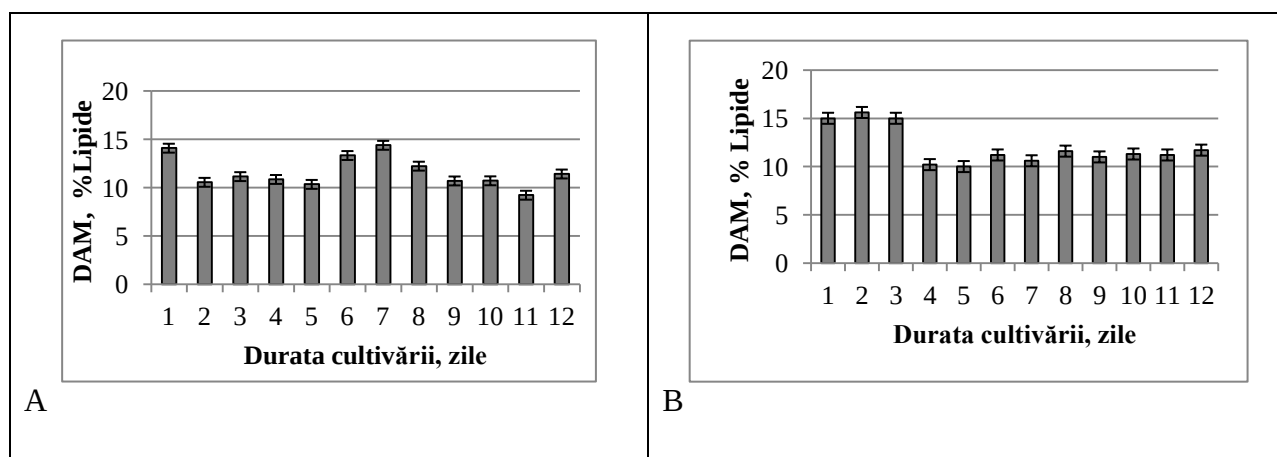


Fig. 2.13. Nivelul DAM în biomasa de *Nostoc linckia* (condiții de laborator- A; condiții de producere -B) pe durata ciclului vital.

Conform rezultatelor obținute cel mai înalt nivel de peroxidare al lipidelor are loc la inoculare și în mijlocul fazei de creștere exponențială. Pe durata fazei staționare (ziua a 10-a și a 11-a) când se presupune recoltarea de biomasă, nivelul DAM este cel mai jos și nu depășește 10,4% din conținutul de lipide totale. În condiții de producere cel mai înalt grad de peroxidare al lipidelor se atestă de la inoculare și până la intrarea culturii în faza exponențială de creștere. După aceasta pe toată durata ciclului se menține un nivel stabil jos al DAM, ceea ce este dovadă a siguranței biomasei și produselor obținute în baza acesteia.

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere ciclul vital al culturii statice de *Nostoc linckia* relevă un model de creștere caracteristică, iar durata optimă din punct de vedere biotehnologic este de 12 zile în condiții de producere, și 10 zile în condiții de laborator.

2. În condiții de laborator, datorită transferului de cultură în condiții similare cu cele pentru obținerea inocului, faza de latență este practic imperceptibilă, iar în condiții de producere are aspect clasic cu lipsa completă a creșterii culturii.

3. Pe durata ciclului vital modificările cantitative ale principalelor componente ale biomasei de nostoc au limite destul de restrânse, ceea ce caracterizează cultura de *Nostoc linckia* ca una cu grad ridicat al homeostaziei. Acest lucru ușurează semnificativ manipularea culturii în condiții industriale și simplifică procedurile din cadrul tehnologiilor aplicate.

4. Rezultatele testelor DPPH, ABTS și CRFM demonstrează, că cultura de nostoc în condiții de laborator manifestă un comportament mai variat în ceea ce ține de acumularea componentelor antioxidante hidro-a și etanolsolubile. Astfel, prin fluctuații valorice se manifestă perioada de latență, începutul și mijlocul fazei de creștere exponențială, perioada de declin. În condiții de producere este evidentă o singură variație a capacității de reducere a radicalilor liberi la începutul ciclului vital.

5. Cei mai stabili parametri pentru cultura de nostoc în condiții de laborator se obțin la ziua a 10-11-a de cultivare, ce corespunde fazei staționare. Această perioadă se caracterizează prin cel mai înalt nivel al biomasei și cea mai stabilă activitate antiradicalică și antioxidantă. În condiții de producere, perioada de recoltare a biomasei în aceleași scopuri poate fi extinsă.

6. Nivelul scăzut al DAM în biomasa de *Nostoc linckia* la etapele recomandate pentru cultivarea biomasei confirmă siguranța acestei biomase, precum și a produselor, care ulterior pot fi obținute din ea.

3. EXTRAGEREA ȘI PĂSTRAREA COMPONENTELOR CU EFECT ANTIOXIDANT DIN BIOMASA DE *NOSTOC LINCKIA*

Tehnologiile de obținere a preparatelor antioxidante policomponente din biomasa algelor și cianobacteriilor, inclusiv *Nostoc linckia*, sunt de perspectivă datorită variabilității componentelor care facilitează modelarea rezultatului final. Factorii determinanți ai succesului tehnologiilor ficologice sunt: procesul de cultivare în scopul obținerii biomasei de calitate; procesul de extragere care asigură obținerea produselor cu proprietăți prestabilite; determinarea condițiilor de păstrare a produselor cu efect antioxidant. Extragerea principiilor bioactive întotdeauna a fost și rămâne în vizorul cercetătorilor, deoarece este un element cheie de care depinde cantitatea și calitatea produselor ficologice obținute.

Biomasa de nostoc, datorită componenței sale biochimice, este o materie primă conformă scopului de a obține preparate cu efecte antioxidante. În capitolul precedent a fost demonstrat, că pe durata ciclului vital atât timpul de creștere a cantității de biomasă, cât și activitatea antioxidantă a acesteia, depinde de faza în care este colectată biomasa. Perioadele vulnerabile sunt, de regulă, fazele primare și trecerile de la o stare fiziologică la alta. Cea mai stabilă perioadă pe parcursul ciclului vital al nostocului, atât în condiții de laborator, cât și în condiții de producere, este a doua jumătate a fazei de creștere exponențială și începutul fazei staționare, de aceea colectarea biomasei în scopul de a o utiliza pentru obținerea produselor antioxidante este anume începutul fazei staționare. În capitolul precedent testele antioxidante au fost efectuate în extractele hidric și etanolic. Este cunoscut faptul, că în laboratoare, în scop de cercetare a componentelor cu diferite efecte biologice din biomasa vegetală, sunt utilizați solvenții organici polari: acetona, metanolul, etanolul, dimetilsulfoxidul, diclormetanul, precum și amestecuri de solvenți (etanol/eter dietilic, hexan/acetona/etanol; acetona/metanol; diclormetan/metanol) și solvenți nepolari așa ca cloroformul, hexanul, eterul dietilic. Acetona și dimetilsulfoxidul sunt utilizați nu numai pentru cercetare, ci și în scopul procesării ulterioare a componentelor extrase. În același timp în mai multe lucrări se indică eficiența în special a extractelor hidro-etanolice [4, 15, 35]. Acest lucru se explică prin componența mult mai variată a acestui tip de extracte, care conține compuși cu proprietăți hidrofile și compuși cu proprietăți lipofile. Astfel, asemenea extracte pot acționa în diferite medii *in vitro* și în diferite compartimente celulare *in vivo*. De aceea studiul posibilității utilizării extragerii hidro-etanolice din biomasa de nostoc pentru obținerea unei materii prime de calitate pentru producerea antioxidantilor este importantă atât din punct de vedere fundamental, cât și din punct de vedere pur practic. Această abordare mai are și avantajul oferirii unei soluții suplimentare în ceea ce ține de siguranța produselor obținute.

Alcoolul etilic se înlătură cu ușurință prin evaporare, iar reziduurile lui nu sunt caracterizate prin toxicitate pentru celulele vii.

Asigurarea păstrării eficiente a produselor de extracție prezintă un alt aspect important al ficobiotehnologiilor. Acest lucru este în deosebi important atunci, când elementele tehnologiilor date sunt separate spațial, dar mai ales, temporal. În astfel de condiții este necesar de a elabora procedee eficiente, care asigura conservarea proprietăților biologice ale componentelor extrase.

În cadrul acestui capitol sunt prezentate rezultatele cercetărilor orientate spre clarificarea acestor două aspecte importante (extragerea și păstrarea de durată) ale tehnologiei de obținere a preparatelor antioxidante din biomasa de *Nostoc linckia*.

3.1. Materiale și metode de studiu

Suplimentar la metodele descrise în capitolul 2 a fost utilizată metoda de ***stabilire a activității antioxidante in vitro a extractelor prin oxidarea lipoproteinelor cu densitate joasă***. Acest test specific răspunde la întrebarea despre posibilitatea utilizării produsului testat în calitate de protector al lipoproteinelor de densitate joasă (LDL). Lipoproteinele de densitate joasă sub forma oxidată au un rol important în inițierea și progresarea proceselor aterosclerotice. Antioxidanții cu capacitatea de a reduce radicalii liberi și de a frâna evoluția reacțiilor oxidative în mod normal, pot preveni oxidarea LDL, ceea ce indică asupra posibilității utilizării preparatelor în baza lor în acest scop [13].

Oxidarea lipoproteinelor cu densitate joasă *ex vivo* a fost propusă inițial pentru stabilirea statutului antioxidant al organismului. Mai târziu metoda a început a fi utilizată în testarea capacității antioxidante a diferitor substanțe și complexe. Capacitatea de inhibiție a oxidării LDL, poate fi calificată ca o abilitate a antioxidantului testat de a acționa în mod principal și în condiții *in vivo*. Metoda propusă include obținerea lipoproteinelor de densitate joasă, inducerea proceselor oxidative și determinarea produselor oxidării.

Izolarea lipoproteinelor cu densitate joasă. Lipoproteinele de densitate joasă au fost obținute din serul sangvin prin metoda sedimentării cu heparină [290]. La 2 ml ser s-a adăugat 400UE heparină (soluție farmaceutică 5000UE/ml) și 150 μl clorură de mangan 1M. Proba este incubată pentru 30 min la 0°C, după care se centrifughează 30 min la 0°C și 12000g (Hettich 22R, micro). Sedimentul este spălat cu soluție de clorură de sodiu 0,9% și centrifugat repetat. Lipoproteinele sedimentate sunt trecute în clorură de sodiu de 1M, astfel ca conținutul de proteine să fie de 2 g/l.

Oxidarea lipoproteinelor cu densitate joasă [22]. La 0,1 ml LDL se adăugă 10 μl soluție de antioxidant. După 5 min de incubare este indusă oxidarea LDL prin adăugarea a 33,3 μl

sulfat de cupru 50 μ M. Probele sunt incubate pentru 24 ore la 37 °C. După incubare, procesul oxidativ este întrerupt cu soluție EDTA (concentrația finală de 27 mM).

Determinarea substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric [125]. Valoarea gradului de oxidare al LDL este determinată prin aprecierea concentrației produselor de reacție ale acidului tiobarbituric (dialdehida malonică). La probele cu LDL oxidat se adăugă 1 ml acid tiobarbituric 0,67% și 1 ml acid tricloracetic de 15%, după care probele sunt supuse incubării pentru o oră la 95°C. În continuare, probele sunt răcite pe gheață 5 min și centrifugate 15 min la 3000g. Concentrația complexului dialdehidei malonice cu acidul tiobarbituric este măsurată la 535 nm, iar cantitatea ei este raportată la proteina LDL cu utilizarea coeficientului extincției molare a complexului dialdehidei malonice sau în % inhibiție față de proba martorului negativ. Proba martor pozitiv conține soluția de LDL în care se induce oxidarea lipidelor cu sulfat de cupru în lipsa antioxidantului. Pentru excluderea autooxidării lipidelor se introduce proba control negativ în care oxidarea lipidelor decurge în lipsa sulfatului de cupru.

3.2. Selectarea solventului optimal pentru obținerea complexelor antioxidante din biomasa de *Nostoc linckia*

Elaborarea tehnicilor eficiente de extragere a componentelor antioxidante din biomasa microalgă prezintă un domeniu de interes teoretic și practic. Extragerea componentelor antioxidante din biomasa nativă este cea mai bună soluție pentru tulpina de *Nostoc linckia*, deoarece asigură valorificarea maximală a potențialului acesteia și nu impune cheltuieli suplimentare pentru prelucrarea și păstrarea ei. Așa cum tehnologiile contemporane tind spre reducerea costului produsului final, se pune accent pe utilizarea reziduului obținut în alte tehnologii valoroase. Astfel, biomasa nativă prelucrată va deveni un nou produs tehnologic.

În ultimul timp, tehnicile de extragere a produselor biologic active din biomasa vegetală pun accent pe produsul final obținut în condiții ecologice cu aplicarea solvenților nontoxici [153, 233]. Alcoolul etilic rămâne a fi cel mai convenabil solvent: este ieftin, reutilizabil, netoxic și considerat favorabil uzului uman și prietenos mediului. Extractele obținute pot fi utilizate în mod direct sau în calitate de materie primă pentru tehnologiile de obținere a preparatelor. Fiind un solvent polar, etanolul este capabil să extragă mai eficient componentele celulare. Polaritatea etanolului poate fi sporită prin modificarea concentrației lui. Nu în ultimul rând, alcoolul este un conservant bun, astfel evitându-se reacțiile Mayard (browning reactions) pe parcursul păstrării produselor obținute.

Majoritatea solvenților organici ca cloroformul, acetona, hexanul sunt utilizați frecvent în cercetare și mai puțin în producere. De exemplu pentru obținerea fenolilor din biomasa de

legume se utilizează acetona și metanolul de 50 și 70%, dar a fost demonstrată oportunitatea înlocuirii lor cu etanolul sau amestecurile hidro-etanolice [134, 232, 263]. Pentru extragerea carotenului, care din punct de vedere al structurii este un compus nepolar, solventul optimal este considerat a fi etanolul, randamentul tehnologic fiind unul acceptabil pentru obținerea de pigment natural, iar tehnologia aplicată este considerată „verde” sau ecologic pură [254]. Pentru extragerea astaxantinei din biomasa algei *Haematococcus pluvialis* se utilizează acetona, dar a fost demonstrată eficiența tehnicii de extragere a pigmentului în etanol [9]. Din biomasa de *Spirulina platensis*, cantitatea maximală de antioxidanți se obține prin extragerea în etanol [34, 103]. Fenolii din biomasa de *Nostoc ellipsosporum* sunt extrași cu aplicarea acetonei și etil acetatului, dar randamentul tehnicii propuse este unul foarte mic. Componenta antioxidantă variată a biomasei de *Nostoc linckia* a determinat rentabilitatea aplicării extragerii hidro – alcoolice cu conținut variat al alcoolului în amestecul extractant, care oferă posibilitatea obținerii unor produse policomponente active [34].

În cercetările noastre anterioare a fost demonstrată eficiența aplicării extracției hidro-etanolice pentru obținerea substanțelor cu efect antioxidant din biomasa de *Porphyridium cruentum*. Activitatea extractelor este dependentă de concentrația etanolului în soluție. Activitatea maximă a fost stabilită pentru extractele hidroetanolice în domeniul de concentrații 55-75%, acestea fiind prezentate prin componente hidro- și etanol solubile [14].

Scopul prezentului studiu a constatat în selectarea variantelor optimale de obținere a preparatelor policomponente cu activitate antioxidantă din biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia*. În calitate de extractant au fost utilizați doi alcooli: metilic și etilic. Metanolul a fost aplicat în calitate de control, fiind un solvent cu polaritate superioară și care este pe larg utilizat în extragerea componentelor biologic active, solubile în solvenți polari.

În cadrul experiențelor au fost monitorizați doi parametri principali: concentrația soluției alcoolice, utilizate pentru extragere și durata procesului de extragere. Pentru obținerea extractelor complexe din biomasa nativă de *Nostoc linckia* au fost folosite zece concentrații ale alcoolilor: de 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80% și 96%. Anterior, a fost demonstrată influența concentrației solventului asupra procesului de extracție și asupra componenței produsului obținut [16, 34]. În scopul eficientizării procesului de extracție durata acestuia a fost de 6 ore, 12 ore și 24 ore. Raportul dintre biomasă și solvent aplicată în întreaga serie de experiențe a fost de 10 mg biomasă la 2 ml solvent. Procesul de extragere a fost realizat în condiții de temperatură constantă (18-20°C) și la agitație permanentă. Extractele au fost separate de biomasă prin centrifugare la 3000g timp de 8 min. În extractele obținute a fost determinată activitatea antioxidantă cu aplicarea testului de inhibiție a radicalului ABTS^{•+}. Reducerea

radicalului cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ are la bază mecanismul transferului de hidrogen ($\text{H}^\bullet$) și electroni (e^-), iar testul este specific atât pentru componentele hidrosolubile, cât și pentru cele liposolubile. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 3.1, A-C.

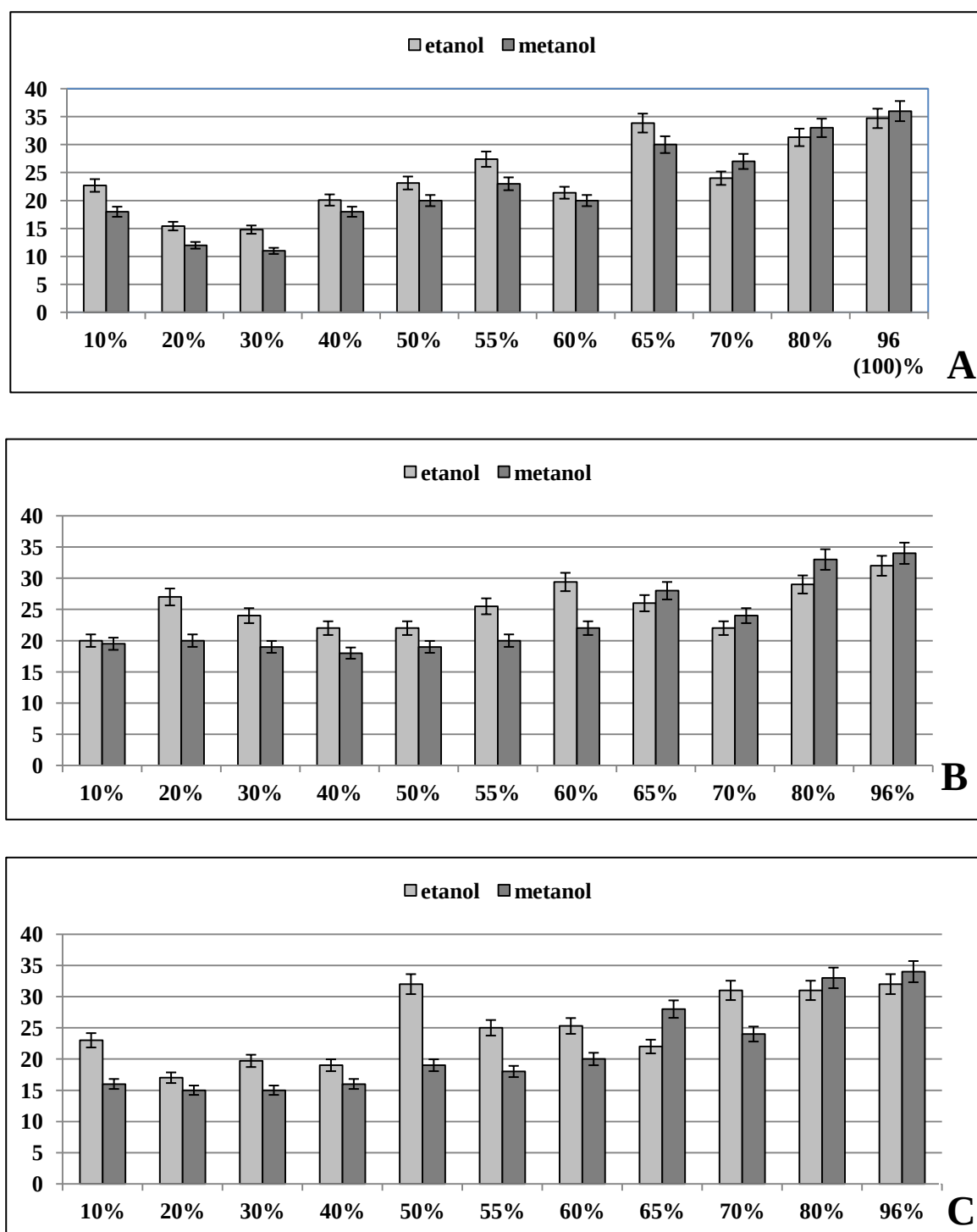


Fig. 3.1. Activitatea antioxidantă (% inhibiție $\text{ABTS}^{\bullet+}$) a extractelor etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* în dependență de concentrația alcoolului și timpul de extracție:

A-6 ore, B-12 ore și C- 24 ore.

Analiza rezultatelor testului ABTS, aplicat extractelor obținute în 6 ore a determinat tendința de creștere a activității antioxidante a extractelor etanolice în două serii (Figura 3.1,A). Prima serie corespunde extractelor cu concentrația etanolului de la 20% la 55%, iar a doua serie corespunde extractelor cu concentrația etanolului de la 60% la 96%. În primul caz, creșterea activității antioxidante pornește de la 15% inhibiție ABTS^{•+}, determinată pentru extractul alcoolic de 20%. Extractul din nostoc de 55% etanol reduce 27% din radicalul cation ABTS. În al doilea caz, activitatea antioxidantă a extractului de 60% este de 21% inhibiție ABTS^{•+} și crește până la 35% inhibiție ABTS^{•+}, activitate caracteristică extractului etanolic de 96%. Alcoolul metilic a demonstrat o activitate mai joasă a extractelor obținute cu aplicarea solventului în concentrațiile de la 20% la 65%, comparativ cu cea a extractelor etanolice. Această reducere este una nesemnificativă, dar trebuie menționată deoarece este un argument în plus în selectarea solventului optimal. Pentru extractele, obținute cu concentrațiile metanolului, de 70-100%, testul ABTS indică un spor al activității antioxidante. Acest spor este de asemenea neînsemnat. Prin urmare, etanolul poate substitui metanolul, în calitate de extractant pentru obținerea produselor antioxidante din biomasa de *Nostoc linckia*.

Extractele obținute la extragerea timp de 12 ore au înregistrat o activitate antioxidantă mai mare comparativ cu primul lot (Figura 3.1,B). Astfel, activitatea antioxidantă a extractelor etanolice de 20%, 30%, este de 22-24% inhibiție ABTS^{•+}, comparativ cu activitatea antioxidantă de 15% inhibiție ABTS^{•+} a variantelor obținute prin extragere timp de 6 ore. Un rezultat identic a valorilor testului ABTS au fost obținute și în cazul extragerii cu metanol. În cazul duratei de 6 ore a procesului de extragere, creșterea concentrației alcoolului aplicat în extragere de la 10% la 30% duce la reducerea capacității antioxidante a extractului obținut cu 7-8 unități % inhibiție. Pe durata de 12 ore, extractele, obținute cu alcool metilic de 20% și 30% am manifestat o activitate antioxidantă identică, valoarea testului ABTS fiind de 19-29% inhibiție. Activitatea antioxidantă a extractelor de 20-30% etanol crește cu 4-7 unități, valorile testului antioxidant fiind de 24-27%. Crește activitatea antioxidantă a extractului obținut cu aplicarea etanolului de 60%, valoarea testului ABTS fiind de 30% inhibiție comparativ cu 21% inhibiție, valoarea determinată pentru extractul etanolic obținut prin extragere timp de 6 ore. Valoarea testului ABTS, determinat pentru extractele metanolice de 60% nu s-a modificat. Mărirea duratei de extragere de la 6 ore la 12 ore nu este un factor determinant pentru valorile testului antioxidant a extractului metanolic de 60%.

Durata de 12 ore a procesului de extragere a sporit activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 65%, valorile testului antioxidant fiind de 34% inhibiție. Valorile testului ABTS,

determinat pentru extractele alcoolice, obținute prin extragere cu etanol și metanol timp de 12 ore oscilează între 31% și 36% inhibiție. Valorile date sunt comparabile cu cele stabilite pentru lotul experimental cu durata extragerii de 6 ore. Extractele de 40% , 50% și 55% alcool nu și-au modificat capacitatea de a reduce radicalul ABTS^{•+} în dependență de durata procesului de extracție.

Pentru lotul de extracte, obținute în 24 ore, creșterea activității antioxidante a extractelor din biomasa de *Nostoc* a fost determinată pentru cele de 50% și 70% concentrație etanol (Figura 3.1,C). Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice de 50% și 70% alcool a crescut cu 39-40%. Sunt unicele creșteri semnificative ale activității antioxidante care au depins de durata contactului dintre biomasa de *Nostoc* și alcoolul etilic. Este evident efectul neutru a alcoolului metilic, care indiferent de durata procesului de extracție nu modifică activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 50%. Pentru celelalte tipuri de extracte, durata de extracție peste 12 ore reduce din activitatea antioxidantă a lor. Extractele etanolice de 70%, 80% și 96%, obținute în mod identic (24 ore de extracție) au determinat valori identice ale activității antioxidante, egale 32% inhibiție ABTS^{•+}. Se evidențiază valorile antioxidante similare determinate pentru extractele de 80% și 96% (sau 100% pentru metanol), care nu depind de tipul alcoolului. Dacă concentrațiile alcoolilor de până la 70% variază în dependență de tipul alcoolului, concentrațiile apropiate valorilor absolute nu sunt determinate pentru activitatea antioxidantă a extractelor. Valorile superioare ale activității antioxidante ale unor extracte, obținute prin extragere cu alcool metilic nu pot fi un calificativ important în favoarea metanolului. Iată de ce alcoolul etilic este considerat un extractant eficient pentru obținerea extractelor policomponente antioxidante din biomasa de *Nostoc linckia*.

Pentru extractele etanolice, obținute din biomasa de *Nostoc* în 6 ore, extractele de 55% și 96% prezintă cea mai mare activitate antioxidantă de 27% și 35% inhibiție ABTS^{•+}.

Pentru extractele etanolice, obținute din biomasa de *Nostoc* în 12 ore, extractele de 50%, 70%, 80% și 96% prezintă cea mai mare activitate antioxidantă de 28 - 35% inhibiție ABTS^{•+}, iar în cazul celor obținute în 24 ore, extractul de 50% a redus 32% radical ABTS^{•+}. În scopul obținerii extractelor cu activitate antioxidantă sporită din biomasa de *Nostoc*, cu utilizarea etanolului în calitate de extractant, cele mai convenabile sunt concentrațiile alcoolului de 50%, 70%, 80% și 96%. Cea mai mare activitate antioxidantă, în majoritatea cazurilor, a fost înregistrată pentru extractele obținute prin extracția de 12 ore.

Pentru a stabili rolul determinant al alcoolului a fost efectuată analiza corelațională dintre activitatea antioxidantă a extractelor și concentrația alcoolului etilic utilizat. În cazul duratei de

extragere de 6 ore, corelarea dintre concentrația etanolului și valorile testului ABTS este înaltă, coeficientul de determinare fiind $R^2 = 0,79$ pentru alcoolul metilic și de $R^2 = 0,81$ pentru alcoolul etilic (Figura 3.2). Prin urmare, în condițiile de extragere cu durata procesului de 6 ore, este evidentă legătura direct proporțională între concentrația etanolului utilizat la extragere și activitatea antioxidantă a extractelor obținute.

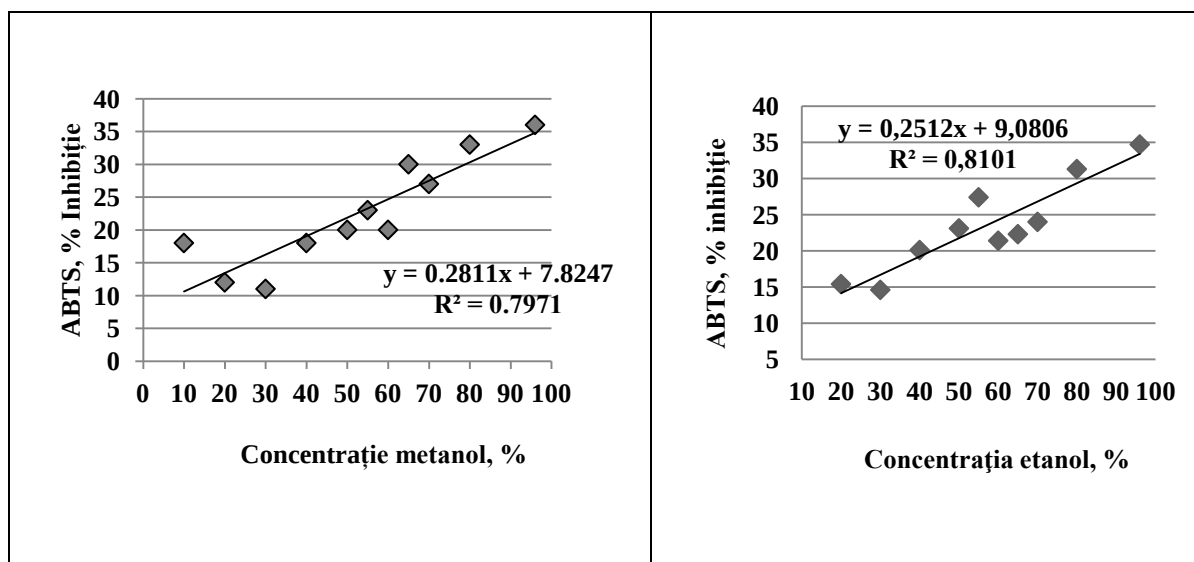


Fig. 3.2. Activitatea antioxidantă a extractelor metanolice și etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* CNM-CB-03 după 6 ore de extragere în dependență de concentrația alcoolului.

Extractul etanolic de 96%(100%) prezintă cea mai mare valoare a testului antioxidant ABTS și este de 35-36% inhibiție. Valori între 20%-25% inhibiție ABTS^{•+} au fost stabilite pentru extractele din nostoc de 40%, 50% și 60%, 65%, 70% alcool. Valori de 15% inhibiție ABTS^{•+} sunt specifice extractelor de 20% și 30% alcool. Concentrația de 55% etanol și cele de 80-96(100)% etanol sunt cele mai indicate în obținerea de extracte antioxidante din biomasa de nostoc în condițiile extracției de 6 ore.

Extractele obținute în 12 ore au valori ale testului antioxidant mai mari de 20% inhibiție ABTS^{•+} (Figura 3.3). Extractele alcoolice de 96(100)% prezintă, ca și în cazul extractelor de 6 ore, cea mai mare valoare a testului antioxidant ABTS și este de 32-34% inhibiție. Dependența dintre concentrația alcoolului, utilizat la extragere și valorile testului ABTS este exprimată prin coeficientul de determinare de $R^2 = 0,79$ pentru metanol și $R^2 = 0,60$ pentru etanol. Prin urmare în 80% de cazuri de extragere cu metanol timp de 12 ore și 60% de cazuri, în condițiile de extragere timp de 12 ore cu etanol, concentrația alcoolului determină activitatea antioxidantă a

extractelor. Alcoolul metilic a stabilit o implicare mai mare în procesul de extragere a componentelor antioxidante.

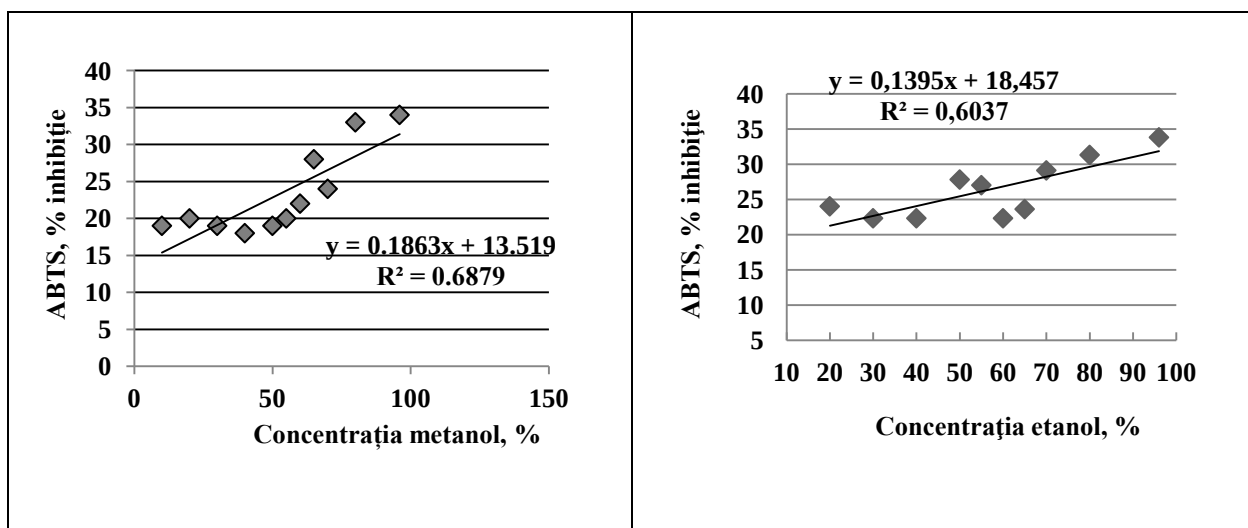


Fig. 3.3. Corelarea dintre concentrația etanolului și activitatea antioxidantă a extractelor hidro-etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* obținute prin extragere timp de 12 ore.

Dependența stabilită nu poate fi determinantă în stabilirea tipului de alcool, deoarece valorile testului ABTS sunt mai reduse, situându-se în regiunea valorilor de 15% inhibiție (Figura 3.3). Concentrațiile de 50-55% etanol și cele de 70-96% etanol sunt cele mai indicate în obținerea de extracte antioxidante din biomasa de nostoc în condițiile extracției de 12 ore.

În cazul duratei de extragere de 24 ore, corelarea dintre concentrația alcoolului și valorile testului ABTS este exprimată prin coeficientul de determinare de $R^2 = 0,79$ pentru metanol și $R^2 = 0,58$ pentru etanol (Figura 3.4).

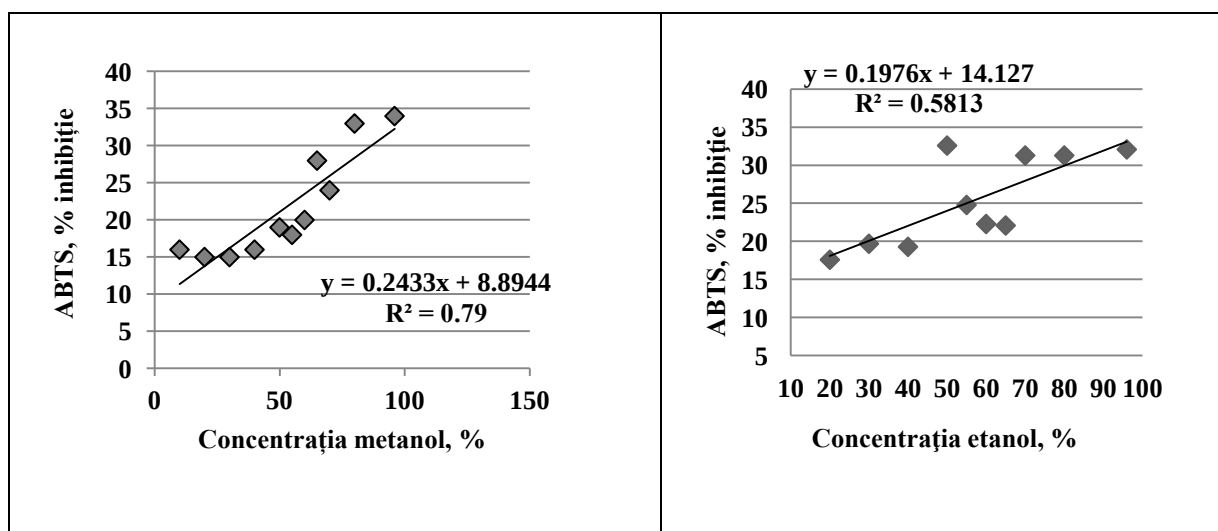


Fig. 3.4. Corelarea dintre concentrația etanolului și activitatea antioxidantă a extractelor hidro-etanolice din biomasa de *Nostoc linckia* obținute prin extragere timp de 24 ore.

Activitatea antioxidantă a extractelor nu depășește 34% inhibiție radical, dar nu au fost stabilite valori ale testului ABTS sub 15% inhibiție. Extractul din biomasa de *Nostoc*, obținut prin extragerea cu etanol de 50% a arătat cea mai mare valoare a testului ABTS. Creșterea concentrației alcoolului etilic cu 5-15% a redus activitatea antioxidantă a extractelor. Pentru extractele etanolice de 70%, 80% și 96%, valorile testului ABTS sunt identice de 32% inhibiție radical. Concentrațiile de 50% etanol și cele de 70-96% etanol sunt cele mai indicate în obținerea de extracte antioxidante din biomasa de *Nostoc* în condițiile extracției de 24 ore. Prin urmare factorul concentrației etanolului este unul determinant în obținerea extractelor antioxidante din biomasa de *Nostoc*.

În rezultatul studiului efectuat putem face următoarele concluzii: Alcoolii metilic și etilic sunt buni extractanți pentru obținerea de complexe antioxidante din biomasa nativă de *Nostoc linckia*; Pentru a exclude solvenții toxici din tehnicile de obținere a complexelor antioxidante din biomasa de *Nostoc*, alcoolul etilic este cel mai indicat solvent; Concentrațiile alcoolului de 80% și 96(100)% determină activitatea antioxidantă sporită identică pentru extractele obținute în 6, 12 și 24 ore; Concentrația de 50%-55% etanol este determinantă în obținerea de extracte antioxidante din biomasa de *Nostoc* în condițiile extracției de 6, 12 și 24 ore; Concentrația etanolului este unul din factorii determinanți în obținerea extractelor antioxidante din biomasa de *Nostoc*; Durata de extracție de 12 ore este avantajoasă pentru obținerea de extracte antioxidante din biomasa nativă de *Nostoc*.

În continuare au fost efectuate cercetări de optimizare a extragerii de ficobiline din biomasa de *Nostoc*. Pigmenții ficobilinici sunt solubili în apă. Sunt cunoscute tehnici de obținere a ficobilinelor din biomasa cianobacteriilor prin extragerea fracționată [106]. Alcoolul de 10-20% este aplicat în extragerea ficobilinelor din biomasa algală [287] și este considerat un extractant optimal deoarece randamentul este unul mare și este evitat procesul de congelare a extractului, condițiile fiind unele aseptice. În cazul biomasei de *Nostoc* activitatea antioxidantă a extractului hidric este înaltă - de 54% inhibiție (Figura 3.5), urmată de valorile scăzute de 22,7% și 15,4% inhibiție ale extractelor de 10% și 20%. Astfel, în condițiile unei extrageri cu etanol de 10% și 20% a principiilor bioactive din biomasa nativă de *Nostoc*, activitatea antioxidantă a extractelor obținute este redusă comparativ cu activitatea extractelor hidrice.

În scopul obținerii de extracte active au fost efectuate extrageri succesive din biomasa cianobacteriei cu aplicarea în calitate de solvent a apei și a etanolului în concentrațiile aplicate anterior, durata extragerii a fost de 6 ore. Obținerea succesivă a extractelor hidric și etanolice cu concentrația alcoolului de 10% și 20% din biomasa de *Nostoc* au favorizat obținerea unor rezultate mai bune, decât în cazul extractelor simple. Activitatea antioxidantă a extractului de

10% a crescut cu 85%, iar a celui de 20% - cu peste 100% comparativ cu extragerea separată din biomasa de *Nostoc*.

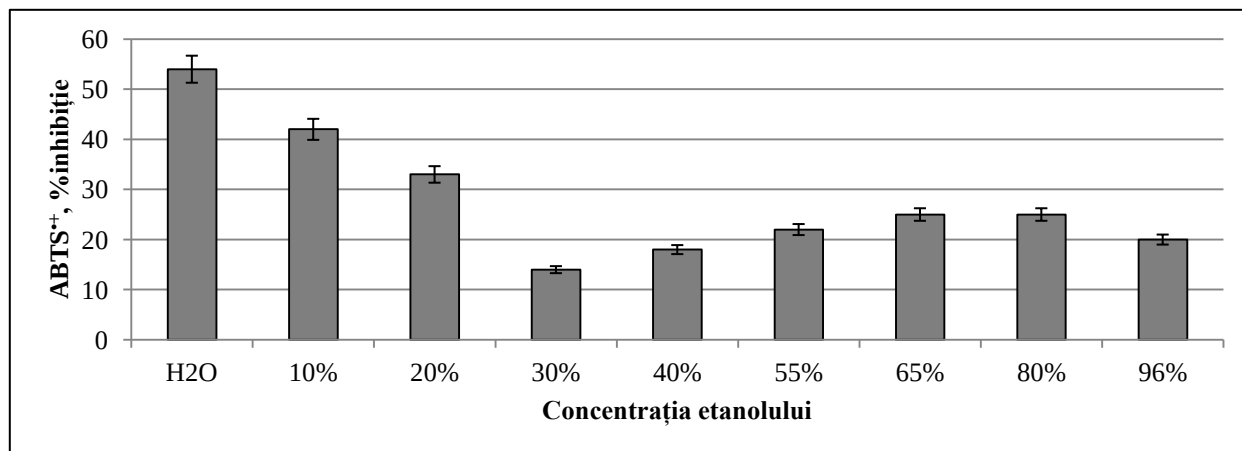


Fig. 3.5. Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS^{•+}) a preparatelor, obținute prin extragere succesivă din biomasa de *Nostoc linckia*.

Prin urmare, obținerea extractului hidric condiționează biomasa de *Nostoc*, favorizând extragerea ulterioară cu aplicarea etanolului de 10 și 20%. Extragerile succesive ulterioare pentru variantele cu soluție hidro-etanolică cu concentrația de la 30 la 96% au redus mult din activitatea antioxidantă inițială a lor, valorile testului ABTS fiind puțin peste 20% inhibiție. Astfel, activitatea antioxidantă a extractului de 55% a scăzut cu 20%, a celui de 65% cu 26%, iar activitatea antioxidantă a extractului de 96% s-a redus cu 42%. Prin urmare este rentabilă aplicarea extragerii succesive pentru a obține extracte hidro-etanolice cu conținut mic de etanol din biomasa de *Nostoc*.

3.3 Stabilirea condițiilor de conservare a proprietăților antioxidante ale extractelor hidro-etanolice obținute în baza biomasei de *Nostoc linckia*

Antioxidanții obținuți pe cale sintetică, în marea lor parte sunt protejați de aditivi. Preparatul antioxidant monocomponent poate fi supus degradării doar în condiții de păstrare neadecvate: vase din plastic sau sticlă transparente, temperaturi ridicate. Pentru produsele antioxidante policomponente condițiile de păstrare, chiar dacă sunt determinante nu pot împiedica degradarea lor. Iată de ce una din cele mai serioase piedici ale tehnologiilor de obținere a produselor antioxidante este degradarea în timp a proprietăților antioxidante. În scopul aprecierii evoluției în timp a capacității antioxidante a extractelor hidro-etanolice, obținute din biomasa nativă de *Nostoc* acestea au fost păstrate timp de 3 luni în condiții diferite.

În rezultatul experiențelor anterioare au fost evidențiate extractele de 65% și 96% obținute la extragere cu etanol de 65 și 96% cu durata extragerii de 6 ore și extractele hidric și etanolic de 10 și 20% obținute prin extragere succesivă. Anume aceste preparate antioxidante, obținute în baza biomasei de *Nostoc* au fost supuse testului de păstrare. Pentru aceasta, preparatele native au fost păstrate timp de 3 luni în condiții de frigider (4°C) în vase din sticlă fumurie. Periodic a fost determinată activitatea antioxidantă a preparatelor cu aplicarea testului ABTS (Figura 3.6).

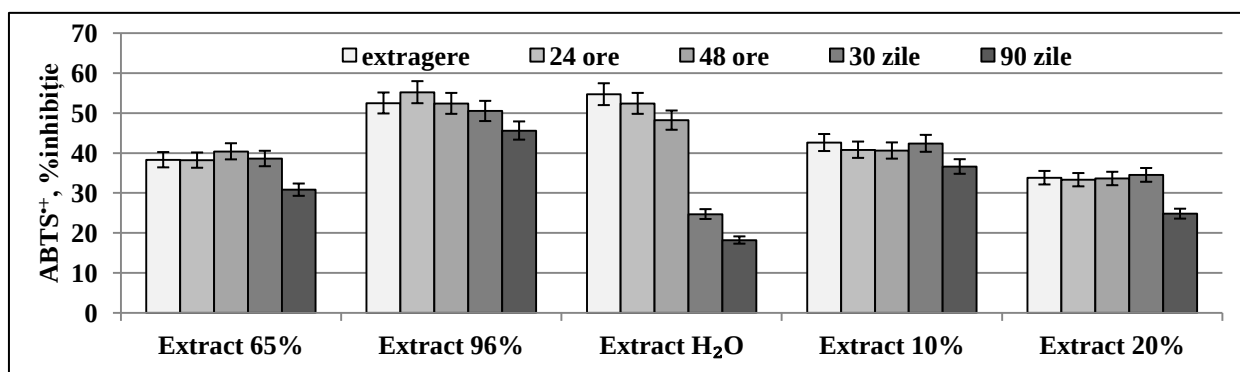


Fig. 3. 6. Modificarea activității antioxidante a extractelor etanolice în baza biomasei de *Nostoc* pe durata păstrării la temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$

Rezultatele monitorizării activității antioxidante a extractelor selectate a scos în evidență necesitatea modificării condițiilor de păstrare. Astfel, în primul rând devine evidentă durata redusă a păstrării extractelor în condiții de $+4^{\circ}\text{C}$ care este de 30 zile. Pentru toate extractele, activitatea antioxidantă se reduce spre a 3-a lună de păstrare. Extractele etanolice de 65% și 96% etanol pierd 10-13% din capacitatea de a reduce radicalul $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Același lucru este specific și pentru extractul etanolic de 10%, activitatea antioxidantă a căruia se reduce cu 14%. Cel mai instabil, la condițiile de păstrare de $+4^{\circ}\text{C}$ s-a dovedit a fi extractul hidric, activitatea antioxidantă spre sfârșitul termenului de testare fiind de 18,2% inhibiție, ceea ce este cu 66,7% mai puțin față de activitatea antioxidantă a extractului nativ. Extractul etanolic de 20% pierde 26,6% din capacitatea antioxidantă. Cu toate că conținutul ficobilinelor în extractele de 10% și 20% a fost identic, extractul de 20% etanol pierde dublu din activitatea antioxidantă spre sfârșitul perioadei de păstrare. Prin urmare capacitatea extractivă a etanolului aplicat în concentrația de 10% este mai mare comparativ cu cea a etanolului de 20% și componenta antioxidantă a extractului de 10% favorizează păstrarea activității antioxidante.

Au fost modificate condițiile de păstrare a extractelor din biomasa de *Nostoc*, cu menținerea probelor în vase din plastic la temperatura de 0°C . Efectul influenței condițiilor termice de păstrare a extractelor devine vizibil (Figura 3.7).

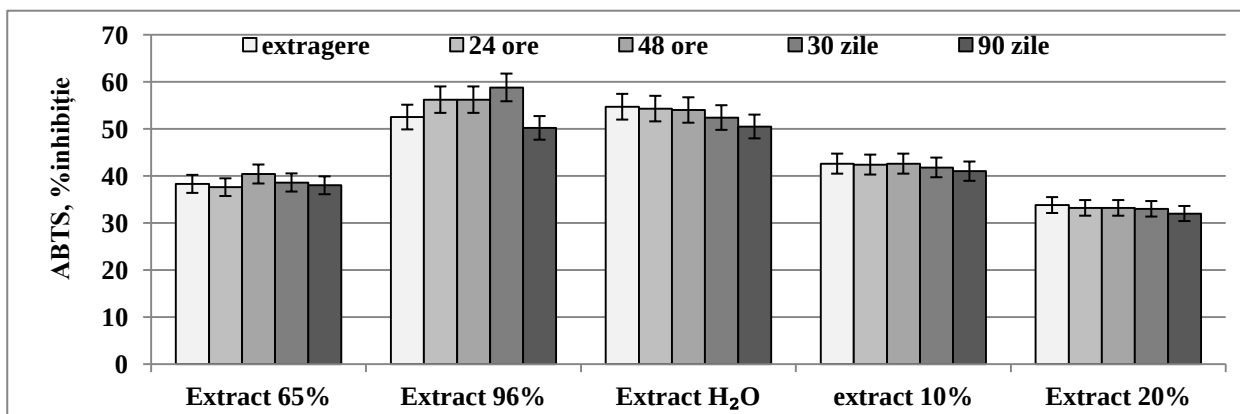


Fig. 3.7. Modificarea activității antioxidante a extractelor etanolice în baza biomasei de *Nostoc* pe durata păstrării la temperatura 0°C.

După 90 zile de păstrare, activitatea antioxidantă a extractelor practic nu s-a modificat. Valorile testului ABTS sunt identice celor determinate în extractele native. Pentru extractul etanolic de 96% este determinată o oscilare a activității antioxidante pe durata primelor 30 zile de păstrare, valorile testului ABTS au crescut cu 12%, după care au revenit la cele inițiale. Aceste oscilații sunt determinate de componența antioxidantă a extractului etanolic de 96%. Perioada de 30 zile a devenit perioada de stabilizare a extractelor.

Problema menținerii activității antioxidante, pe durată păstrării, a extractelor policomponente din biomasa microalgelor și cianobacteriilor, inclusiv și din *Nostoc linckia* rămâne a fi actuală. Condițiile de congelare nu sunt cele mai optimale pentru loturi mari de extracte antioxidante. A fost inițiat un studiu pentru a stabili posibilitatea utilizării antioxidantilor, aplicați în calitate de agenți protectori/stabilizatori ai activității antioxidante a extractelor etanolice din biomasa de *Nostoc linckia*.

În scopul fortificării efectului antioxidant și pentru minimalizarea proceselor de oxidare au fost propuse variante de preparate antioxidante suplimentate cu antioxidanți cunoscuți ca tocoferolul, troloxul și acidul ascorbic. Antioxidanții au fost selectați în măsura aplicării lor extractelor antioxidante cu conținut variat al etanolului. Astfel, preparatul în baza extractelor etanolice de 65% și 96% a fost suplimentat cu tocoferol, preparatul în baza extractului hidric a fost suplimentat cu trolox și acid ascorbic. Pentru a evita suprapunerea efectului antioxidant al substanțelor active, doza suplimentelor antioxidante a fost selectată de 1 μg/ml, 10 μg /ml și 100 μg /ml. În mod identic au fost selectate condițiile de păstrare a preparatelor timp de 3 luni în condiții de frigider (4°C) în vase din sticlă fumurie. Periodic a fost determinată activitatea antioxidantă a preparatelor cu aplicarea testului ABTS. Rezultatele obținute au fost prezentate în Figurile 3.8 - 3.10. În primul rând a fost stabilită o majorare relativă, cu 15%, a activității

antioxidante a extractelor suplimentate cu tocoferol, aplicat în concentrațiile de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ și 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.8). Pentru varianta de extract complexat cu 100 $\mu\text{g/ml}$ tocoferol, activitatea antioxidantă a crescut cu 20%.

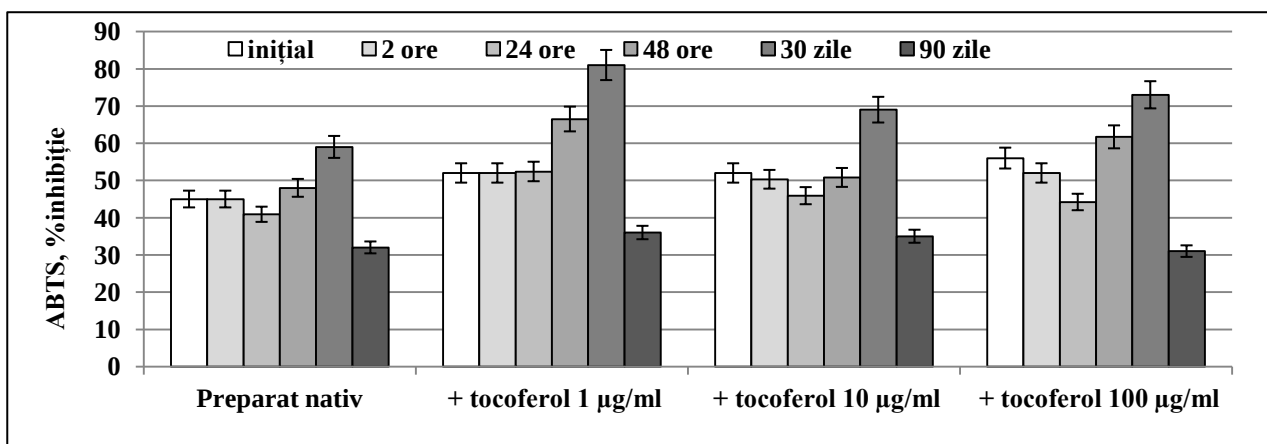


Fig. 3.8. Modificarea activității antioxidante a extractului etanolic de 96% în baza biomasei de *Nostoc linckia*, suplimentat cu tocoferol ($\mu\text{g/ml}$), pe durata păstrării la temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$.

Analiza rezultatelor testului de păstrare a extractului de 96% etanol a determinat existența unei perioade de stabilizare atât pentru extractul etanolic nativ, cât și pentru variantele de extracte complexate cu tocoferol, aplicat în trei concentrații. În primele 30 zile de păstrare, activitatea antioxidantă a extractelor suplimentate cu tocoferol, în concentrația de 1 $\mu\text{g/ml}$ a crescut cu 56%. Valoarea testului ABTS este de 81% inhibiție. Pentru variantele de extracte etanolice suplimentate cu tocoferol în concentrația de 10 și 100 $\mu\text{g/ml}$, activitatea antioxidantă a extractelor a crescut cu 30-32%. Valoarea testului ABTS este de 69% și 73% inhibiție. Reducerea neînsemnată a activității antioxidante peste 24 ore de păstrare a fost stabilită pentru extractul nativ, cu 10 %, și pentru extractul etanolic complexat cu tocoferol în concentrația 10 $\mu\text{g/ml}$ cu 12%. Extractul etanolic, care conține 1 $\mu\text{g/ml}$ tocoferol a prezentat o stabilitate antioxidantă pe durata primelor 24 ore de păstrare. O reducere semnificativă, cu 21%, a activității antioxidante a fost stabilită pentru varianta de extract etanolic, suplimentat cu tocoferol în concentrația 100 $\mu\text{g/ml}$. Cele mai vizibile modificări ale activității antioxidante a extractelor etanolice din biomasa de nostoc se produc în următoarele 24 ore. Pentru extractul etanolic nativ și varianta extractului etanolic suplimentat cu tocoferol în doza de 10 $\mu\text{g/ml}$, valorile activității antioxidante revin la cele inițiale și sunt de 48% și 51% inhibiție radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Activitatea antioxidantă a extractului suplimentat cu 1 $\mu\text{g/ml}$ tocoferol a crescut cu 28%, iar activitatea antioxidantă a extractului suplimentat cu 100 $\mu\text{g/ml}$ tocoferol a crescut cu 10%. Spre sfârșitul perioadei de 30 zile, activitatea antioxidantă a extractelor a crescut, procesul de stabilizare fiind

finalizat. Valorile testului antioxidant ABTS ale extractului nativ și a variantelor suplimentate cu tocoferol în concentrațiile de 10 $\mu\text{g/ml}$ și 100 $\mu\text{g/ml}$ s-au majorat cu 30-33%. Un spor cu 56% a fost determinat pentru varianta extractului etanolic din nostoc suplimentat cu 1,0 $\mu\text{g/ml}$ tocoferol. După trei luni de păstrare în condițiile testate, extractele în baza biomasei de *Nostoc* au pierdut din capacitatea de a reduce radicalul $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Suplimentele de tocoferol în concentrațiile de 1,0 și 10 $\mu\text{g/ml}$ au redus activitatea antioxidantă cu 30-32% în varianta de extract etanolic de 96%. Pentru varianta de extract etanolic suplimentat cu 100 $\mu\text{g/ml}$ tocoferol, activitatea antioxidantă s-a redus cu 45%. Prin urmare putem afirma că tocoferolul suplimentat extractelor etanolice obținute în baza biomasei de nostoc posedă capacitatea de a fortifica activitatea antioxidantă a extractelor. Cele mai bune rezultate au fost stabilite pentru variantele de extract suplimentate cu tocoferol în concentrația de 1 $\mu\text{g/ml}$. Cea mai stabilă variantă a extractului etanolic suplimentat cu tocoferol este varianta cu aplicarea concentrației de 10 $\mu\text{g/ml}$ tocoferol. Pentru această variantă perioada lipsită de variații este de 48 ore, iar sporul activității antioxidante, specific duratei de 30 zile este unul moderat. Reducerea activității antioxidante a extractelor etanolice native și a celor suplimentate cu tocoferol neagă implicarea acestuia în procesul de deteriorare a componentei antioxidante a extractului etanolic de 96% în baza biomasei de nostoc.

Un set identic de cercetări a fost efectuat cu extractul hidro-etanolic, obținut din biomasa de nostoc cu aplicarea etanolului, concentrația de 65% (Figura 3.9)

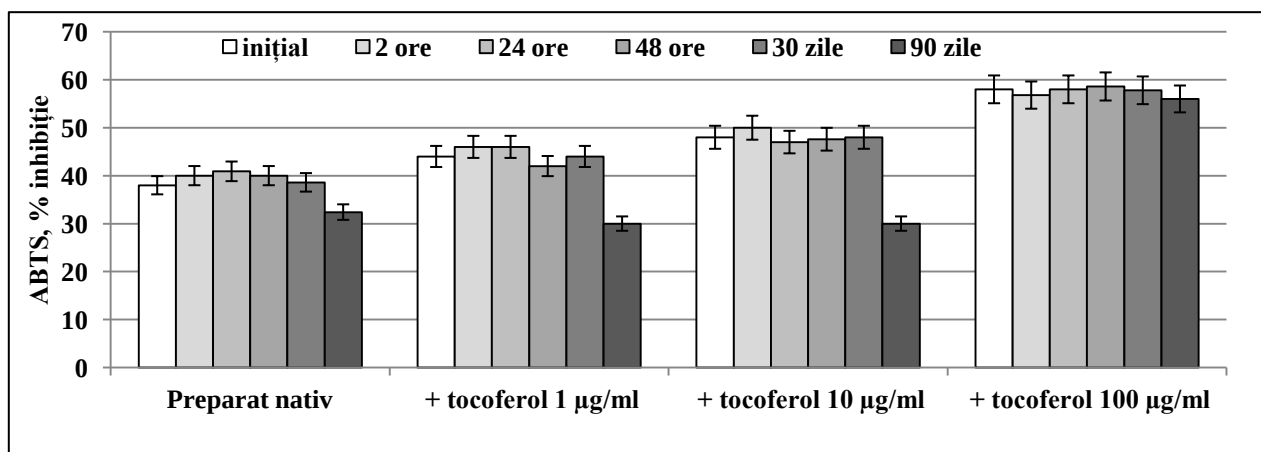


Fig. 3.9. Modificarea activității antioxidante a extractului etanolic de 65% în baza biomasei de *Nostoc linckia*, suplimentat cu tocoferol, pe durata păstrării la temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$.

Suplimentarea extractelor hidro-etanolice de 65% alcool cu tocoferol în concentrația de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ a sporit activitatea antioxidantă a extractului cu 16%, valorile testului ABTS crescând de la 38% inhibiție la 44% inhibiție. Suplimentarea extractelor hidro-etanolice din nostoc cu 10

μg/ml tocoferol a sporit activitatea antioxidantă a extractului cu 26%, valorile testului ABTS^{•+} fiind de 48% inhibiție. Cele mai evidente modificări au fost determinate pentru varianta de suplimentare a extractului cu 100 μg/ml tocoferol. Sporul activității antioxidante a fost cu 53%. Se poate presupune o implicare agresivă a tocoferolului în procesul de stabilizare și deteriorare a componenței și activității antioxidante a extractelor complexate. Dar varianta dată a manifestat cel mai mare grad de stabilizare. Spre sfârșitul duratei de păstrare nu au fost determinate reduceri ale activității antioxidante.

Rezultatele obținute au demonstrat neimplicarea tocoferolului în procesul de stabilizare a extractelor hidro-etanolice din biomasa de nostoc. În primele 30 zile de păstrare activitatea antioxidantă a extractului nativ și a variantelor complexate cu tocoferol nu au suferit modificări. Activitatea antioxidantă a variantelor testate nu s-a modificat. Valorile testului ABTS fiind la nivelul inițial.

Spre sfârșitul perioadei de păstrare, 90 zile, s-au redus valorile testului antioxidant ABTS pentru extractul nativ cu 14% și pentru variantele de suplimentare cu tocoferol în concentrația de 1,0 μg/ml și 10 μg/ml cu 32% și 37% respectiv.

Prin urmare putem spune că implicarea tocoferolului în procesul de stabilizare și de deteriorare a componenței și a activității antioxidante a extractelor etanolice din biomasa de nostoc depinde în primul rând de tipul extractului. Dacă pentru extractele antioxidante etanolice, tocoferolul a fost unul din factorii de stabilizare în timp a activității antioxidante, atunci pentru extractele hidro-etanolice de 65% alcool, tocoferolul nu s-a manifestat în calitate de stabilizator. Această neimplicare a fost precedată de un spor considerabil al activității antioxidante a extractelor hidro-etanolice complexate. În continuare a fost determinată implicarea dozelor de tocoferol suplimentate la extracte în procesul de stabilizare a extractelor. Pentru variantele de extracte etanolice complexate, concentrațiile de 10 μg/ml și 100 μg/ml tocoferol au fost semnificative. Concentrația de 1,0 μg/ml tocoferol a modificat esențial activitatea antioxidantă a extractului etanolic supus testului de păstrare. Pentru variantele de extracte hidro-etanolice complexate, toate concentrațiile au avut un efect similar de stabilizare. Concentrația de 100 μg/ml tocoferol s-a manifestat ca un stabilizator al activității antioxidante a extractului hidro-etanolic de 65%, activitate care a fost majorată de tocoferolul suplimentat.

Extractul hidric, obținut din biomasa de nostoc a fost suplimentat cu acid ascorbic și trolox, aplicate în concentrație de 1,0 μg/ml. Complexele antioxidante obținute au fost supuse testului de păstrare la temperatura +4°C. Complexarea extractului hidric cu acid ascorbic a sporit activitatea antioxidantă a extractului cu 10% (Figura 3.10).

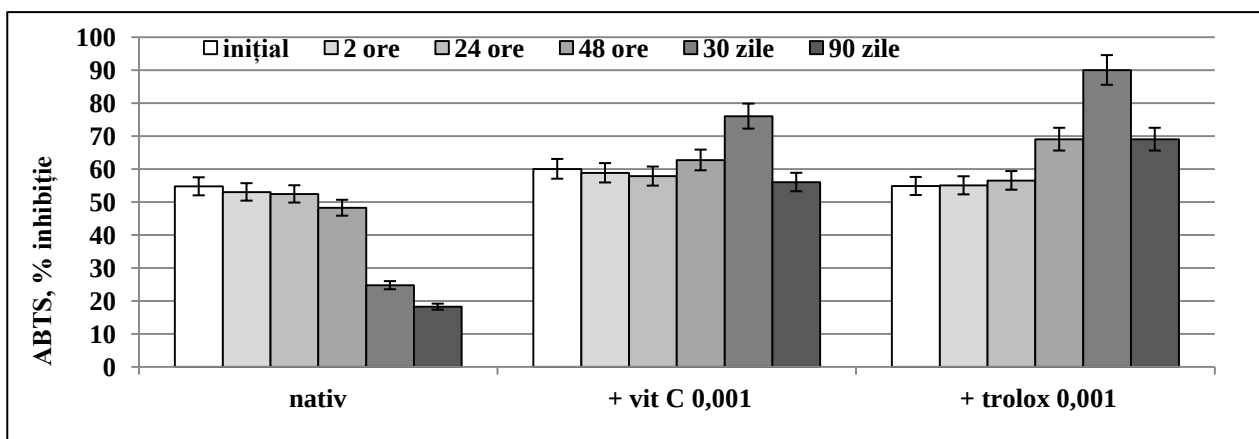


Fig. 3.10. Modificarea activității antioxidante a extractului hidric în baza biomasei de *Nostoc linckia*, suplimentat cu acid ascorbic și trolox, pe durata păstrării la temperatura de +4°C.

În primele 48 ore activitatea antioxidantă a extractului complexat cu acid ascorbic nu a suferit modificări. Extractul hidric nativ a pierdut 12% din capacitatea de a reduce radicalul ABTS. Tendința de reducere a activității antioxidante a extractului nativ se păstrează în continuare. Astfel, după păstrare timp de 30 zile, activitatea antioxidantă scade cu 55%, iar spre sfârșitul perioadei de păstrare, valorile testului ABTS^{•+} reprezintă doar 33% din valoarea inițială.

Pentru extractul hidric, suplimentat cu acid ascorbic, după perioada de 30 zile a fost înregistrat un spor cu 23% a activității antioxidante. După 90 zile, extractul complexat cu acid ascorbic pierde din activitatea antioxidantă. Valorile testului ABTS^{•+} se reduc de la 60% inhibiție la 56% inhibiție. Prin urmare, spre finele perioadei de păstrare, activitatea antioxidantă a extractului hidric suplimentat cu 1,0 μg/ml acid ascorbic nu se reduce. Putem presupune perioada de 30 de zile ca fiind suficientă pentru stabilizare.

În experiența de suplimentare a extractului hidric din nostoc cu antioxidantul sintetic trolox a fost determinată lipsa unor modificări a activității antioxidante în primele 24 ore. Valorile testului ABTS rămân neschimbate, și care sunt similare valorilor testului antioxidant a extractului hidric nativ. După durata de 48 ore de păstrare, activitatea antioxidantă a crescut cu 26%. Creșterea valorilor testului ABTS a fost determinată și după 30 zile de păstrare. Astfel după o lună de păstrare a extractului hidric complexat cu 1,0 μg/ml trolox, activitatea antioxidantă a crescut cu 64%. După 90 zile, valorile testului antioxidant se reduc, dar rămân la nivelul valorilor antioxidante determinate după 48 ore de păstrare. Spre deosebire de variantele de extracte etanolice și hidro-etanolice complexate cu tocoferol, unde după perioada de 90 zile de păstrare activitatea antioxidantă a extractelor complexate se reduce esențial, identic probelor native, activitatea antioxidantă a variantelor extractelor hidrice complexate cu antioxidanți

sintetici rămâne a fi superioară probelor native. Suplimentarea extractelor hidrice, obținute în baza biomasei de nostoc cu antioxidanți sintetici poate fi o condiție de păstrare a extractelor în lipsa congelării.

Extractul hidro-etanolic, obținut din biomasa de nostoc, de asemenea, a fost suplimentat cu acid ascorbic și trolox în concentrație de 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Complexele antioxidante obținute au fost supuse testului de păstrare la temperatura $+4^{\circ}\text{C}$. Suplimentarea extractului hidro-etanolic de 10% alcool cu acid ascorbic a sporit activitatea antioxidantă a extractului cu 18% (Figura 3. 11).

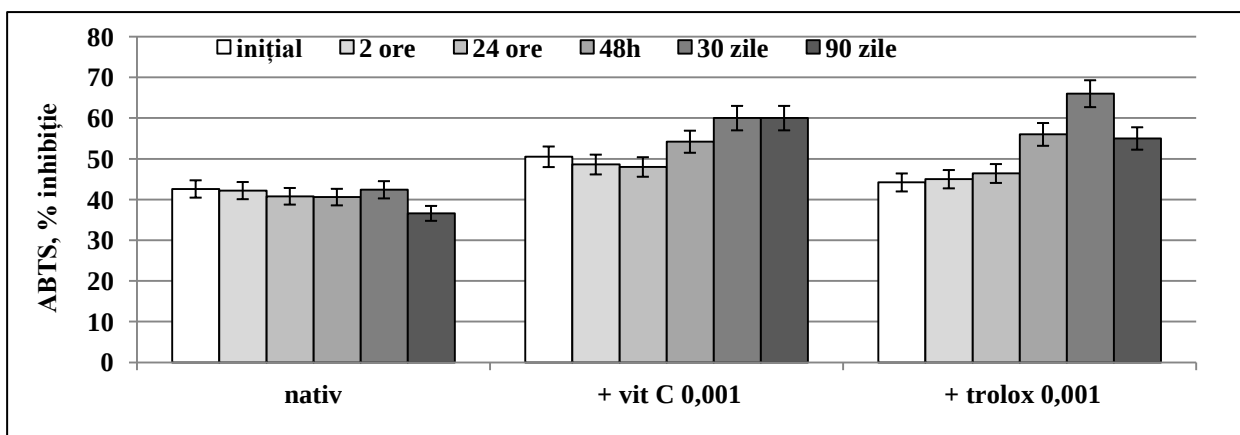


Fig. 3.11. Modificarea activității antioxidante a extractului hidro-etanolic de 10% în baza biomasei de *Nostoc linckia*, suplimentat cu acid ascorbic și trolox, pe durata păstrării la temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$.

Similar experienței cu suplimentarea extractului hidric în baza biomasei de nostoc, în primele 48 ore activitatea antioxidantă a extractului hidro-etanolic complexat cu acid ascorbic nu a suferit modificări. Extractul hidro-etanolic nativ menține capacitatea de a reduce radicalul $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pe durata a 30 zile de păstrare.

Pentru varianta de extract hidro-etanolic, suplimentat cu 1,0 $\mu\text{g/ml}$ acid ascorbic, după perioada de 30 zile a fost determinată o creștere a activității antioxidante cu 19%. După 90 zile, activitatea antioxidantă a extractului complexat cu acid ascorbic rămâne neschimbată. Valorile testului ABTS rămân la 60% inhibiție. Prin urmare, spre finele perioadei de păstrare, activitatea antioxidantă a extractului hidric suplimentat cu 1,0 $\mu\text{g/ml}$ acid ascorbic nu se reduce. Ca și în cazul probelor extractului hidric suplimentat cu acid ascorbic, pentru variantele complexate ale extractului hidro-etanolic de 10% putem presupune perioada de 30 de zile ca fiind suficientă pentru stabilizare.

În experiența de suplimentare a extractului hidro-etanolic din nostoc cu trolox a fost determinată lipsa unor modificări a activității antioxidante în primele 24 ore. Ca și în variantele complexate ale extractului hidric, valorile testului ABTS rămân neschimbate și sunt similare

valorilor testului antioxidant a extractului hidro-etanolic nativ. După durata de 48 ore de păstrare, activitatea antioxidantă a crescut cu 26%. Aceeași creștere a activității antioxidante a fost stabilită și pentru varianta de extract hidric suplimentat cu trolox. Creșterea valorilor testului ABTS a fost determinată și după 30 zile de păstrare. Astfel după o lună de păstrare a extractului hidric complexat cu 1,0 $\mu\text{g/ml}$ trolox, activitatea antioxidantă a crescut cu 49%. După 90 zile, valorile testului antioxidant se reduc, dar rămân la nivelul valorilor antioxidante determinate după 48 ore de păstrare. Modificările activității antioxidante a extractului hidro-etanolic suplimentat cu 1,0 $\mu\text{g/ml}$ trolox, pe durata perioadei de păstrare sunt similare modificărilor activității antioxidante a extractului hidric suplimentat cu trolox. Prin urmare, troloxul poate fi acceptat în calitate de stabilizator și conservant al activității antioxidante a extractelor hidric și hidro-etanolic de 10% din biomasa de nostoc.

Capacitatea complexelor antioxidante de a reduce radicalii și de a preveni oxidarea poate fi verificată prin aplicarea metodei de determinare a produselor degradării acidului tiobarbituric. În acest scop, în calitate de substrat ușor oxidabil au fost utilizate câteva tipuri de uleiuri vegetale, lipsite de adaos antioxidant. În calitate de antioxidant a fost utilizat extractul etanolic obținut în baza biomasei de nostoc prin extragere în alcool etilic timp de 12 ore.

Nivelul de oxidare a uleiurilor a fost stabilit prin metoda determinării cantității dialdehidei malonice acumulate, iar activitatea antioxidantă a fost determinată prin metoda reducerii radicalului DPPH $^{\bullet}$.

În studiu au fost incluse patru tipuri de uleiuri vegetale care se deosebesc după componența acizilor grași și respectiv după capacitatea de autooxidare. Raportul diferit dintre acizii grași mono- și polienici determină gradul de incorporare a produsului antioxidant: ulei din semințe de in, produs la fabrica „Aromavit”, Moscova, Rusia, seria de producere 010514; ulei din olive IBERICA, produs de Olive Line S.L., Madrid, Spania, seria L:7885; ulei din porumb, produs Unilever, Hamburg, Germania, seria L 315400916; ulei din floarea soarelui, produs la AO „Floarea soarelui”, Bălți, Moldova, seria 22.10.2013/4.

Oxidarea acizilor grași a fost indusă termic cu expunerea uleiurilor la 100 $^{\circ}\text{C}$ timp de 60 min. În continuare au fost determinate produsele reactive ale acidului tiobarbituric (testul MDA).

Pentru incorporarea extractului antioxidant (extract etanolic 96%), obținut pe bază de biomasă de nostoc, la 6 ml ulei s-au adăugat 3 ml preparat. Pentru a spori incorporarea antioxidantilor amestecul obținut a fost emulsionat prin agitare timp de 60 min. Separarea uleiului de restul de preparat s-a produs timp de 24 ore la temperatura camerei. Reziduul etanolic a fost înlăturat prin decantare. Probele experimentale de ulei cu complex antioxidant și probele control de ulei au fost supuse oxidării în condiții identice. În continuare a fost efectuat testul

MDA. Pentru a separa uleiul de substratul reactant, la probe a fost introdus cloroform în cantitate de 3 ml. Uleiul a fost eliminat prin decantare.

Nivelul de oxidare a uleiurilor a fost monitorizat prin cuantificarea MDA. Rezultatele determinării produselor de reacție ale acidului tiobarbituric sunt prezentate în Figura 3. 12.

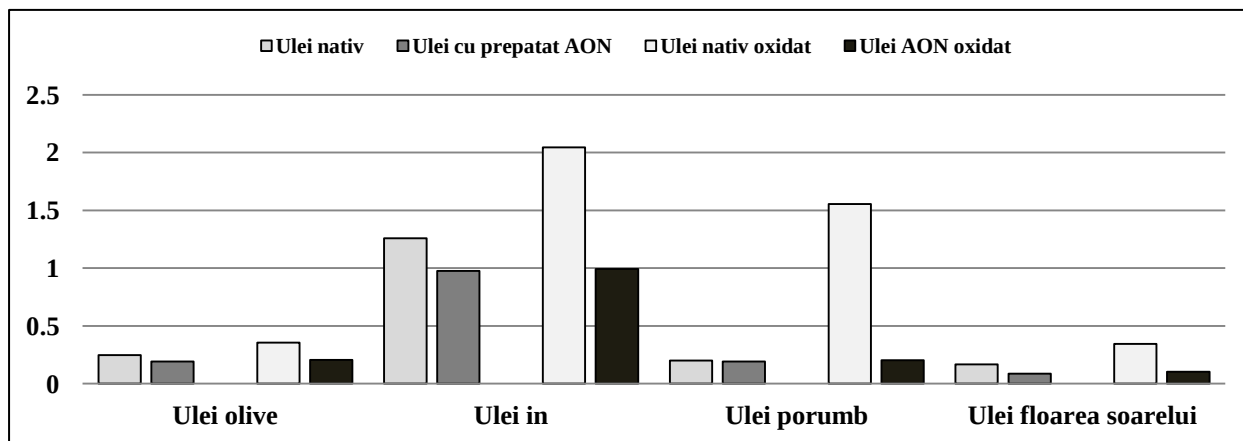


Fig. 3.12. Testul MDA, determinat pentru uleiurile vegetale native și suplimentate cu antioxidant, extract etanolic de 96% în baza biomasei de *Nostoc linckia*.

Din rezultatele prezentate se vede, că complexul antioxidant, obținut prin extragere etanolică din biomasa de nostoc este un factor important de protecție a uleiurilor vegetale, în special a celui de in și de porumb.

În lipsa oxidării induse a uleiurilor, testul DAM a determinat implicarea antioxidantilor în procesul de reducere a procesului oxidativ indus de condițiile de desfășurare a metodei. Cu 22% au scăzut valorile testului DAM pentru uleiurile de olive și in cele suplimentate cu complex antioxidant și 48% au scăzut valorile testului DAM pentru uleiul din semințe de floarea soarelui suplimentat cu antioxidant. Uleiul de porumb a fost mai puțin receptibil. Rezultatele stabilite nu pot fi analizate doar din punct de vedere al conținutului uleiurilor vegetale, substrat pentru reacțiile de oxidare. Astfel, componența polienică a uleiurilor din semințe de floarea soarelui și porumb sunt asemănătoare după raportul acizilor grași. Conținutul dublu de acid oleic C18:1 ω 9 din uleiul de porumb poate fi un factor de conservare a uleiului, efectul căruia s-a suprapus peste cel al antioxidantilor. Uleiul de in și de olive sunt absolut diferite după componența acizilor grași. Uleiul de in conține peste 50% acid linolenic C18:3 ω 3 și care lipsește în uleiul de olive. Uleiul de olive conține 75% acid oleic. Uleiul de in este ușor oxidabil, dar rezultatele testului DAM au arătat o reacție de protecție a uleiurilor de in și olive identică în variantele suplimentate cu complex antioxidant din nostoc.

Cu totul diferit au reacționat uleiurile vegetale suplimentate cu complex antioxidant din biomasa de nostoc la condițiile de stres oxidativ indus. Cel mai mic grad de oxidare a fost determinat pentru uleiul de olive. A fost stabilită o reducere cu 42% a valorilor testului MDA. Urmează uleiul de in pentru care complexul antioxidant a protejat 51% ulei. O cantitate care formează 87% din uleiul de porumb și 70% din uleiul de floarea soarelui au fost protejate de extractul antioxidant din biomasa de nostoc.

Prin urmare a fost demonstrată capacitatea extractelor etanolice, obținute în baza biomasei native de nostoc de a proteja uleiurile vegetale de oxidare.

Pentru aprecierea eficienței extractelor antioxidante din nostoc în calitate de protectori ai uleiurilor vegetale a fost aplicat testul DPPH. Pentru realizarea lui în calitate de solvent a fost selectată acetona. Perioada de incubare a probelor a fost de 20 min, după care a fost înregistrată absorbanta probelor la 517 nm. A fost introdusă proba control pentru uleiul nativ. Prin testul de reducere a radicalului DPPH a fost verificată activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 96% din nostoc. Transferul de componente antioxidante în uleiuri a fost realizat prin emulsionarea a 3 ml ulei cu 1 ml extracte. După separarea fracțiilor, uleiul a fost dizolvat în acetonă și efectuat testul DPPH. Rezultatele testului DPPH sunt prezentate în Figura 3. 13.

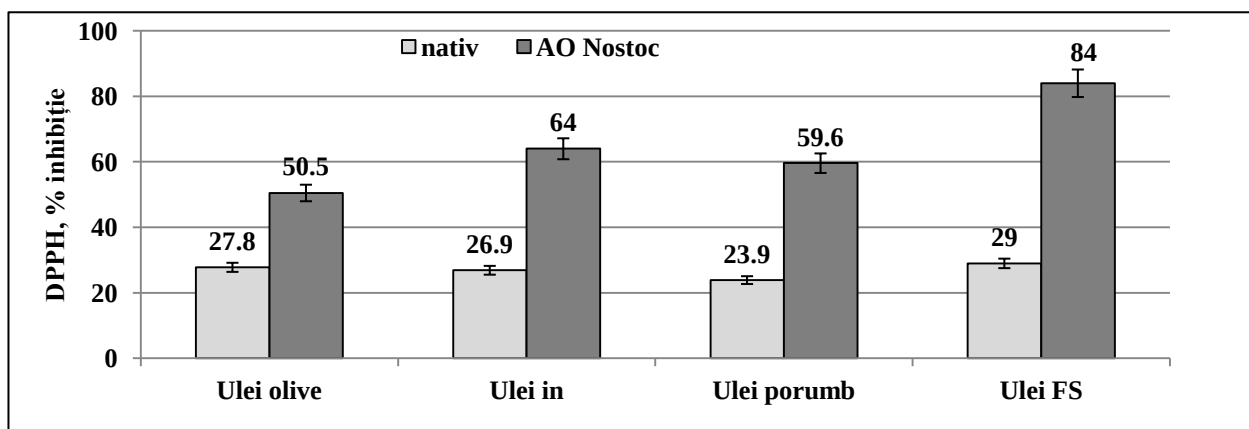


Fig. 3.13. Activitatea antioxidantă (DPPH^{*}, % inhibiție) a uleiurilor vegetale native și suplimentate cu antioxidant, extract etanolic de 96% în baza biomasei de *Nostoc linckia*.

Este evident sporul activității antioxidante a uleiurilor suplimentate cu complexul antioxidant din nostoc. Cel mai puțin a fost influențat uleiul de olive. Activitatea antioxidantă a uleiului de olive suplimentat cu complex antioxidant a crescut cu 82%. Valoarea testului DPPH este de 40,5% inhibiție radical. De 2,4-2,5 ori a sporit activitatea antioxidantă a uleiurilor de in și porumb, respectiv. De aproape 3 ori a crescut activitatea antioxidantă a uleiului de floarea soarelui suplimentat cu complex antioxidant din biomasa de nostoc. Valoarea testului DPPH a crescut de la 29% inhibiție la 84% inhibiție radical. Prin urmare, complexul antioxidant, obținut

în baza biomasei de nostoc prin extragere cu etanol absolut posedă capacitatea de amplificare a valorilor testului antioxidant.

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Activitatea antioxidantă a extractelor din nostoc este determinată de natura extractantului utilizat și condițiile derulare a procesului de extragere.

2. Alcoolul etilic este un solvent recomandat pentru obținerea preparatelor antioxidante din biomasa de nostoc, rezultatele obținute cu utilizarea lui fiind comparabile cu cele obținute cu utilizarea metanolului. În același timp etanolul se caracterizează printr-un nivel înalt de siguranță față de alcoolul de referință și deci este mai indicat pentru obținerea produselor antioxidante din biomasa cianobacteriană.

3. Activitatea extractelor hidro-etanolicе din nostoc este dependentă de concentrația soluției aplicate, iar cele mai înalte valori sunt obținute pentru extractele de 55-70%, în care sunt prezente atât componentele cu proprietăți hidrofile, cât și cu cele lipofile.

4. În scopul sporirii activității antioxidante ale extractelor obținute cu soluție etanolică de 10-20% se aplică o pre tratare cu apă distilată. Acest procedeu duce la sporirea activității antioxidante a extractelor hidro-etanolicе cu 85 - 100%.

5. Suplimentarea extractelor din nostoc cu tocoferol este eficientă pentru păstrarea de durată a extractelor hidro-etanolicе de 65%, și nu poate fi aplicată în cazul extractelor etanolicе.

6. Termenul de păstare a extractelor hidrice și hidro-etanolicе de 10 și 20% poate fi mărit prin suplimentarea extractelor cu trolox ori acid ascorbic.

7. Complexul antioxidant obținut prin extragere etanolică din biomasa de nostoc are capacitatea de a proteja uleiurile vegetale (în special de in și porumb) de oxidarea agresivă, indusă de condițiile de păstrare. Implicarea componentelor antioxidante din biomasa de nostoc în procesul de protecție oxidativă este susținut de testele antioxidante nespecifice care au demonstrat creșterea activității antioxidante a uleiurilor vegetale suplimentate cu complex antioxidant din nostoc.

4. ELABORAREA TEHNOLOGIILOR COMPLEXE NONPOLUANTE DE CULTIVARE A *NOSTOC LINCKIA* ȘI DE OBTINERE A PREPARATELOR ANTIOXIDANTE

Căutarea surselor noi de antioxidanți naturali cu potențial în profilaxia și tratamentul diferitor maladii umane este o tendință actuală a biotehnologiei moderne. În ultimii ani sinteza biologică a antioxidanților atrage atenția ca alternativă a sintezei chimice în primul rând din considerente de siguranță, precum și datorită posibilității de a modela preparate complexe cu activitate antioxidantă și antiradicalică înaltă. Relația strânsă dintre ficobiotehnologie, biotehnologia microbiologică și chimia compușilor coordinativi oferă oportunități mari în această direcție.

Cianobacteriile posedă numeroase mecanisme de protecție antioxidantă, ce includ componente enzimatică și nonenzimatică capabile să înlăture efectele speciilor reactive ale oxigenului [203-205]. Activitatea antioxidantă înaltă a cianobacteriilor se datorează distribuirii lor cosmopolite în diverse nișe ecologice, fiind dotate evolutiv cu mai multe mecanisme de menținere a viabilității decât majoritatea organismelor biologice. Ficobiliproteinele ca antioxidanți non-enzimatici absorb și asigură disiparea energiei de excitare sub formă de căldură și transferul eficient al energiei absorbite de centrele de reacție fotosintetice, în scopul de a reduce producția de oxigen singlet $^1\text{O}_2$ [250]. Acești compuși sunt viu colorați, cu capacitate înaltă de absorbție și fluorescență datorită cromoforilor bilinici, iar în linii generale toți sunt antioxidanți, care reduc intensitatea stresului oxidativ prin menținerea mediului redox sau modularea sistemului de semnalizare intracelulară [118, 173, 227].

Randomentul ficobiliproteinelor poate fi maximizat prin controlul sau optimizarea factorilor nutritivi și de mediu [156, 220, 222]. Compușii coordinativi ai metalelor cu diferiți liganzi atrag atenția anume prin capacitatea lor de a modela procesele biosintetice în celulele vii, chiar și fiind aplicați în concentrații foarte joase [49]. Ca xenobiotici pentru organisme vii, acești compuși pot genera stres oxidativ de diferită intensitate, care foarte des este asociat cu o creștere inițială a activității antioxidante a celulelor. Pe această cale compușii coordinativi ai metalelor de tranziție pot servi ca modulatori în procesul de sinteză dirijată a compușilor cu proprietăți antioxidante în obiectele de interes biotehnologic.

Fierul este un element esențial al mai multor complexe proteice, care sunt implicate în procesul de fotosinteză, în calitate de co-factori redox. Elementele fotosistemei I a cianobacteriilor și citocromul b_6f conțin cantități considerabile de fier și se sintetizează în celule în cantități mici în caz de insuficiență de metal [73]. La cianobacterii în biosinteza ficobiliproteinelor este implicată ficocianin-ferredoxin oxidoreductaza (PcyA) care mediază

reducerea atipică a biliverdinei IX [72]. Astfel, proprietățile redox datorită cărora fierul este un co-factor eficient duc, de asemenea, la interacțiuni oxidative, din care rezultă radicali liberi periculoși pentru celule. Astfel, cantitatea de fier în celule trebuie foarte strict controlată, misiune care este îndeplinită de către familia proteică a ferritinelor.

Din punct de vedere comercial sunt produse naturale valoroase cu utilizări multiple în calitate de nutraceutice și produse farmaceutice, componente alimentare, coloranți pentru cosmetice, marcheri în biomedicină. Utilizarea ficobilinelor în calitate de coloranți naturali fără potențial toxic ori oncogen este o alternativă actuală față de produsele sintetice [180, 203-205]. Numeroase studii arată, că datorită proprietăților lor ficobilinele normalizează imunitatea, inhibă dezvoltarea tumorilor, încetinesc procesul de îmbătrânire și dezvoltarea bolilor neurodegenerative [41, 157, 250, 260].

4.1. Modificarea activității antioxidante la *Nostoc linckia* sub influența compușilor coordinativi ai fierului (III) cu bazele Schiff și cu aminoacizii

În calitate de inductori ai acumulării principiilor bioactive cu efect antioxidant în biomasa de *Nostoc linckia* au fost utilizate două clase principal diferite de compuși coordinativi ai fierului – compuși ai Fe(III) cu aminoacizii și compuși ai Fe(III) cu bazele Schiff. Selectarea acestor două clase a fost fondată pe încercarea de a compara reacțiile de răspuns ale culturii de nostoc la acțiunea unor compuși cu grad diferit de toxicitate. Ambele tipuri de compuși conțin fierul – metal cu valență variabilă, unul dintre principalele elemente metalice responsabile în sistemele vii de declanșarea reacțiilor de oxidare și formare a radicalilor liberi. Din start am considerat că prezența metalului deja poate fi un element de control al activității antioxidante în biomasa de nostoc. Liganzii prezentați prin aminoacizi sunt elemente prietenoase mediului celular, capabile să atenueze efectele negative ale metalului, iar liganzii prezentați prin bazele Schiff, din contra, datorită potențialului lor toxic înalt, pot amplifica efectele negative ale metalului. Prin compararea efectelor acestor două clase de substanțe asupra nostocului speram să contribuim la tezaurul de cunoștințe acumulat cu referire la procesele de anihilare a consecințelor stresului oxidativ, elaborarea preparatelor cu efecte antioxidante, confirmarea siguranței biomasei ficologice cu bioelemente acumulate în procesele biotehnologice ș.a.

Parametrii monitorizați în cadrul acestor experiențe au fost: biomasa cianobacteriană, conținutul de ficobiliproteine în biomasă (și în extractele hidrice) ca component cu efect antioxidant și pondere maximală cantitativă, activitatea antioxidantă a extractelor hidrice și etanolice, determinată prin aplicarea diferitor metode.

4.1.1. Influența compușilor coordinativi ai Fe(III) cu aminoacizii asupra parametrilor biotehnologici la *Nostoc linckia*

Experiențele din acest subcapitol au fost efectuate cu utilizarea culturii de *Nostoc linckia* trecută prin 3 pasaje pe mediu lipsit de fier, care în mod normal se adaugă în formă de complex FeEDTA. Pentru adăugarea compușilor coordinativi la mediul de cultivare s-au preparat soluții apoase standard cu concentrația de 1mg/ml. Compușii au fost adăugați la mediul nutritiv până la inocularea culturii, concentrațiile utilizate fiind de la 10 la 40 mg/l cu intervalul între variante de 10 mg/l. Această schemă experimentală a fost aplicată și anterior pentru alte culturi ficologice – *Dunaliella salina* și *Porphyridium cruentum*, și a permis de a evidenția anumite elemente comune în reacțiile de răspuns ale acestor două obiecte valoroase. Este cu atât mai interesant de a aplica schema propusă în cercetările din această lucrare, că aici avem în calitate de obiect de studiu un organism principal deosebit – reprezentant al procariotelor. În Tabelul 4.1 sunt date formulele compușilor utilizați în studiu, abrevierile utilizate în continuare la prezentarea și analiza rezultatelor, concentrațiile lor utilizate în studiu și conținutul fierului în probele apicate [8, 15].

Tabelul 4.1. Concentrațiile compușilor coordinativi ai Fe(III) cu aminoacizii, aplicate în studiu și conținutul de fier în ele [8, 15]

Compusul	Abrevierea utilizată	Masa molară	Concentrația compusului	
			mg/l	μM
$[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	[Fe(III)Gly]	797,7	10	12,54
			20	25,08
			30	37,62
			40	50,17
$[\text{Fe}_3\text{O}(\text{L,DAIa})_6(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	[Fe(III)D,LAla]	899,7	10	11,11
			20	22,23
			30	33,34
			40	44,45
$[\text{Fe}_3\text{O}(\text{LAla})_6(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	[Fe(III)L,Ala]	899,7	10	11,11
			20	22,23
			30	33,34
			40	44,45
$[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_7 \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$	[Fe(III)Gly] ⁷⁺	1185	10	8,44
			20	16,88
			30	25,32
			40	33,76
$[\text{Fe}_3\text{O}(\beta\text{Ala})_6(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_7 \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$	[Fe(III)βAla] ⁷⁺	1260	10	7,94
			20	15,88
			30	23,81
			40	31,75

Colectarea biomasei cianobacteriene s-a produs la a 10-a zi de cultivare în condițiile menționate anterior, după care biomasa s-a standardizat și s-a supus extragerii hidrice, hidro-etanolice cu concentrația alcoolului în amestecul extractant de 55% și etanolice. Aceste tipuri de extragere au fost selectate în baza rezultatelor prezentate în capitolul 3, unde a fost demonstrat, că aceste tipuri de extracte sunt cele mai active din punct de vedere al activității antiradicalice și își păstrează proprietățile în condiții adecvate de stocare.

Toate extractele utilizate în studiu au fost standardizate după substanța uscată în așa mod, ca extractele supuse testării să conțină 1 mg substanță uscată la 1 ml. La prima etapă în extracte a fost determinată activitatea lor antiradicalică prin aplicarea testului ABTS^{•+}.

Rezultatele testului pentru extractele obținute din biomasa de *Nostoc linckia*, crescută pe mediu cu adaos de compuși coordinați în patru concentrații testate și din biomasa probei martor sunt prezentate în Figurile 4.1 și 4.2.

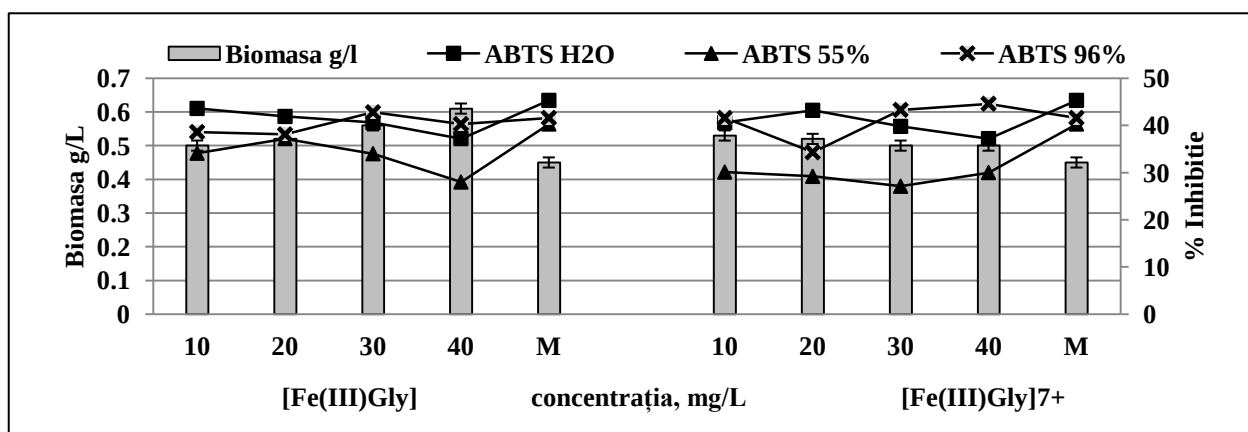


Fig.4.1. Productivitatea și activitatea antiradicalică (test ABTS) a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* obținută pe medii cu adaos de glicinat de fier(III).

După cum se poate observa din Figura 4.1, ambii glicinați ai fierului (III) în diferite concentrații au provocat o creștere moderată a cantității de biomasă acumulată. Cel mai pronunțat s-a înregistrat în varianta experimentală cu adaos de 40 mg/L [Fe(III)Gly], când cantitatea de biomasă obținută a fost cu 23% mai mare decât în cazul probei martor. Activitatea antiradicalică față de ABTS în toate 3 tipuri de extracte studiate (hidric, etanolic și hidro-etanolic de 55%) a fost mai joasă decât activitatea extractelor obținute din biomasa martorului. Rezultate similare au fost obținute și în cazul compusului [Fe(III)Gly]⁷⁺. Și în acest caz biomasa este la nivelul probei martor ori o depășește neesențial pe aceasta, iar activitatea antiradicalică a extractelor este la nivelul activității extractelor din biomasa standard, ori mai joasă ca aceasta. Cele mai joase rezultate au fost înregistrate pentru extractele hidro-etanolice de 55%, care în variantele experimentale înregistrează valori semnificativ mai joase decât în cazul martorului.

Rezultatele obținute în cazul suplimentării mediului nutritiv cu compuși ai fierului cu L,D-Alaninat, L-Alaninat și β -Alaninat sunt prezentate în Figura 4.2.

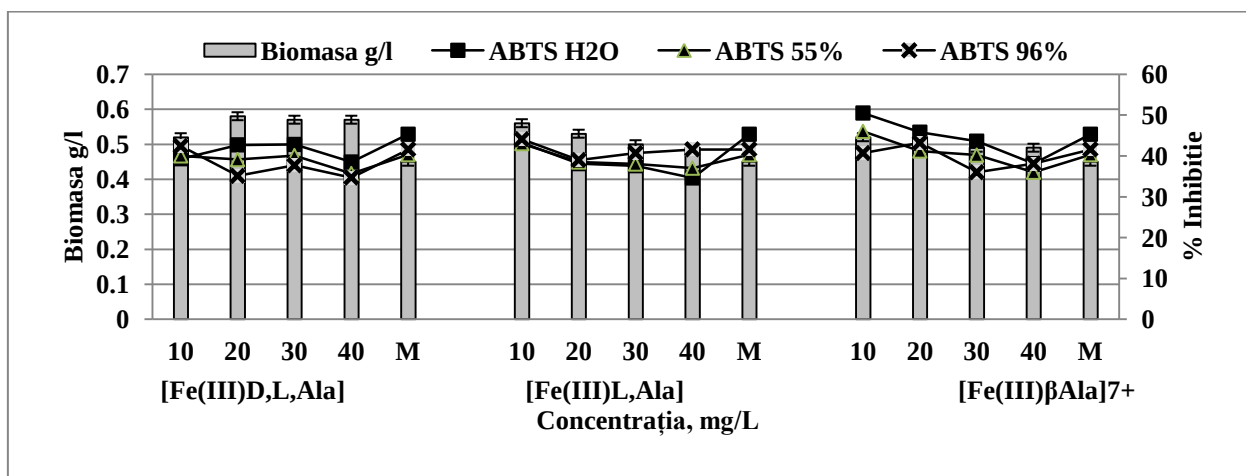


Fig.4.2. Productivitatea și activitatea antiradicalică (test ABTS) a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* obținută pe medii cu adaos de alaninați de fier(III).

Ca și în cazul examinat mai sus, în cazul alaninaților de fier nu au fost înregistrate efectele dorite – adică o creștere semnificativă a activității antioxidante. Atât biomasa, cât și activitatea antiradicalică față de radicalul cation ABTS nu s-au deosebit semnificativ în variantele experimentale de rezultatele obținute pentru proba martor.

Următorul test căruia au fost supuse extractele hidro-etanolic și etanolic din nostoc a fost testul de evaluare a capacității antioxidante prin metoda reducerii reagentului fosfomolibdenic (CRFM). Deoarece metoda dată presupune testarea activității antioxidante a extractelor etanolic, testului CRFM sunt supuse doar extractul hidro-etanolic de 55% și cel etanolic. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figurile 4.3 și 4.4.

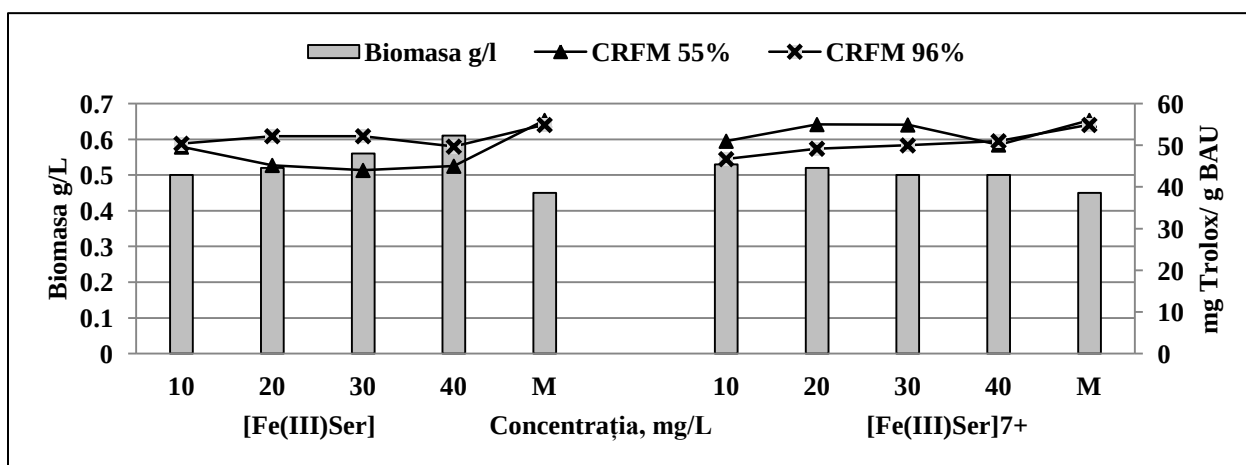


Fig.4.3. Productivitatea și capacitatea de reducere a reagentului fosfomolibdenic a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* obținută pe medii cu adaos de glicinat de fier(III).

Extracțele obținute din biomasa de nostoc crescută pe mediu cu adaos al glicinaților de fier (Figura 4.3) au manifestat o capacitate de reducere a reagentului fosfomolibdenic practic identică sau mai joasă comparativ cu biomasa standard. În cazul primului glicinat [Fe(III)Gly] extractul hidro-etanolic de 55% din biomasa de nostoc în toate variantele experimentale a manifestat o capacitate de reducere a reagentului fosfomolibdenic substanțial mai joasă față de extracțele din biomasa martor. Valorile maxime ale capacității de reducere a reagentului fosfo-molibdenic pentru extracțele etanolice și hidro-etanolice au fost înregistrate în cazul biomasei martor, acestea atingând 55-56 mg echivalent Trolox la gram de biomasă de nostoc. Astfel, testul CRFM a confirmat rezultatele obținute prin aplicarea testului ABTS – glicinații de Fe(III) nu provoacă o creștere a activității antioxidante în biomasa de nostoc.

În Figura 4.4. sunt prezentate rezultatele similare obținute pentru alaninații de fier (III).

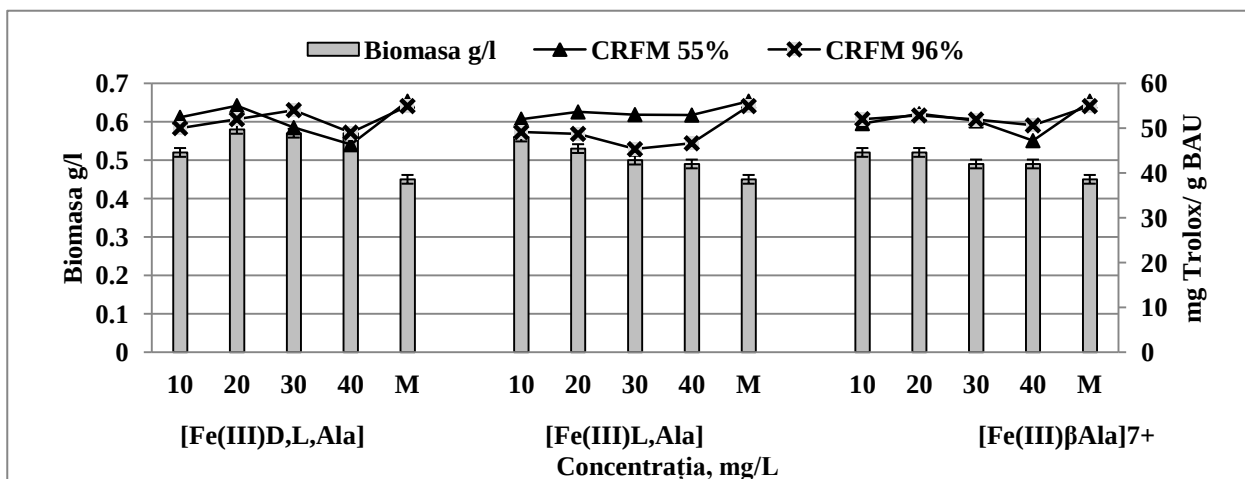


Fig.4.4. Productivitatea și capacitatea de reducere a reagentului fosfomolibdenic a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia* obținută pe medii cu adaos de alaninați de fier(III).

Extracțele obținute din biomasa de nostoc crescută pe medii cu adaos de alaninați de fier (Figura 4.4) au prezentat o capacitate de reducere a reagentului fosfomolibdenic la nivelul martorului, sau chiar mai joasă. Cea mai evidentă scădere a capacității antioxidante a extractelor obținute din biomasa probelor experimentale se înregistrează pentru toți cei trei compuși la concentrația de 40 mg/L.

În continuare cele trei tipuri de extracțe din biomasa de nostoc au fost studiate cu aplicarea metodei de evaluare a capacității antioxidante prin metoda reducerii reagentului Folin-Ciocalteu (CRFC). Această metodă are la bază principiul transferului de electroni produs în mediul alcalin cu reducerea complexului acid fosfomolibdenic/fosfovolframic cu formarea cromogenului care se determină colorimetric. Capacitatea antioxidantă se exprimă în echivalent

acid galic la cantitatea de biomasă. Calculul se efectuează după curba de calibrare pentru acidul galic.

Rezultatele obținute în procesul de monitorizare a activității antioxidante a extractelor în baza reacției de reducere a reagentului Folin – Ciocalteu sunt prezentate în Figurele 4.5 și 4.6. Glicinații de fier nu au indus efectele dorite în biomasa de nostoc, valorile testului de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu fiind comparabile cu cele obținute în cazul probei martor. Ca și în cazul reagentului fosfomolibdenic, cele mai joase rezultate s-au înregistrat în extractele obținute din biomasa, care a crescut în prezența celei mai înalte concentrații a compușilor (40 mg/L). În special acest lucru se observă în cazul extractului hidric și hidro-etanolic de 55% (Figura 4.5).

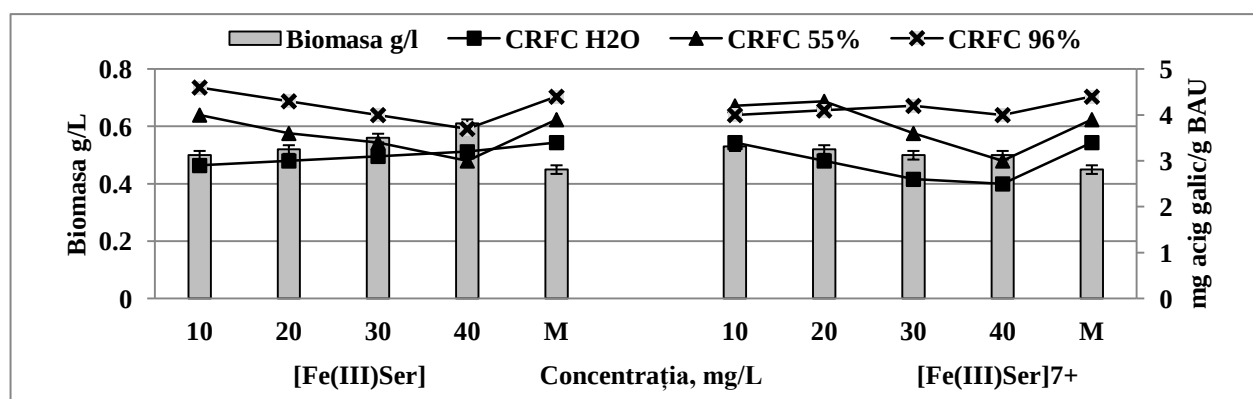


Fig.4.5. Productivitatea și capacitatea de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia*, obținută la cultivare în prezența glicinaților de Fe(III).

Rezultatele obținute în cadrul testului de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu pentru extractele hidrice, hidro-etanolic de 55% și etanolic de biomasa de nostoc crescută în prezența alaninaților de fier (III) sunt prezentate în Figura 4.6.

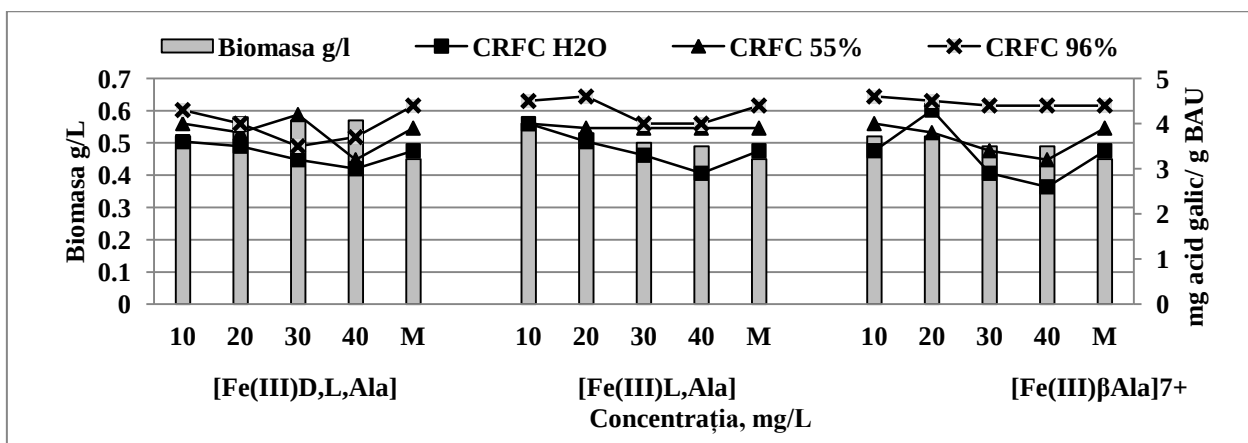


Fig.4.6. Productivitatea și capacitatea de reducere a reagentului Folin-Ciocalteu a extractelor din biomasa de *Nostoc linckia*, obținută la cultivare în prezența alaninaților de Fe(III).

Extractele etanolice și hidro-etanolice obținute din biomasa de *Nostoc* crescută pe mediu cu adaos de alaninați de fier (III) în linii generale au arătat o capacitate de reducere a reagentului Folin Ciocalteu comparabilă cu activitatea extractelor din biomasa standard. Activitatea extractelor hidrice din biomasa de *Nostoc* în variantele experimentale a fost mai joasă decât activitatea extractelor obținute din biomasa martorului, crescută pe mediul standard.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu diferă semnificativ de rezultatele obținute cu utilizarea aceluiași compuși pentru cultura microalgei roșii *Porphyridium cruentum*. În cazul porfiridiumului practic pentru toți compușii cu fier trivalent și aminoacizi au fost înregistrate creșteri semnificative ale activității antioxidante a tuturor tipurilor de extracte obținute. Astfel, în seria menționată de cercetări valorile activității antioxidante a extractelor din biomasa variantelor experimentale în medie au depășit activitatea extractelor din biomasa martorului de 1,4-1,7 ori, iar în unele cazuri – peste 3 ori [15]. *Nostoc linckia* s-a manifestat mult mai inert, fără a prezenta variații semnificative atât în procesul de acumulare a biomasei, cât și în valorile activității antioxidante ale acesteia. Astfel, compușii coordinativi ai Fe(III) cu glicinații și alaninații nu s-au manifestat în calitate de inductori ai stării de stres oxidativ ori de intensificare a proceselor de acumulare a componentelor cu acțiune antioxidantă în biomasa de *Nostoc*.

4.1.2. Influența compușilor coordinativi ai Fe(III) cu bazele Schiff asupra parametrilor biotehnologici la *Nostoc linckia*

Scopul cercetărilor descrise în această parte a lucrării a constat în studiul posibilității de sporire a activității antioxidante a *Nostoc*ului prin intermediul dirijării biosintezei de ficobiline în biomasă. În calitate de reglatori au fost utilizați 4 compuși ai fierului cu bazele Schiff obținuți prin condensarea 2,6 diacetilpiridinei cu hidrazida acidului izonicotinic (H_2L^1) și hidrazida acidului nicotinic (H_2L^2), sintezați de cercetătorii Institutului de Chimie sub conducerea dlui prof. Bulhac Ion. În Tabelul 4.2 sunt indicate formulele, concentrațiile molare și conținutul de metal, care au fost utilizate în experiențe.

Procesul de creștere la *Nostoc linckia* și sinteza metaboliților primari și secundari sunt dependente în mod direct de compoziția mediului de cultură. Compușii fierului (III) cu bazele Schiff au fost incluși în mediul nutritiv la prima zi a ciclului de cultivare în concentrații la 1 la 20 mg/L. Biomasa s-a recoltat la a zecea zi, iar după standardizare în ea au fost determinate activitatea antioxidantă și cantitatea de ficobiliproteine în extractele hidrice obținute din această biomasă. Rezultatele pentru compusul $[Fe(H_2L^1)(H_2O)_2](NO_3)_3 \cdot 1.5H_2O$ sunt prezentate în Figura 4.7.

Tabelul 4. 2. Compușii fierului (III) cu baze Schiff utilizați în cercetare

Compusul coordinativ	M, g/mol	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	20 mg/L
		$C_M \cdot 10^{-6}$, mol/L				
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$	706.343	1.41	7.08	14.15	21.23	28.31
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_{1.5}(\text{CH}_3\text{OH})_{0.5}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	834.701	1.20	5.99	11.98	17.94	23.96
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	769.397	1.30	6.50	13.00	19.49	25.99
$\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	809.673	1.23	6.17	12.35	18.52	24.70

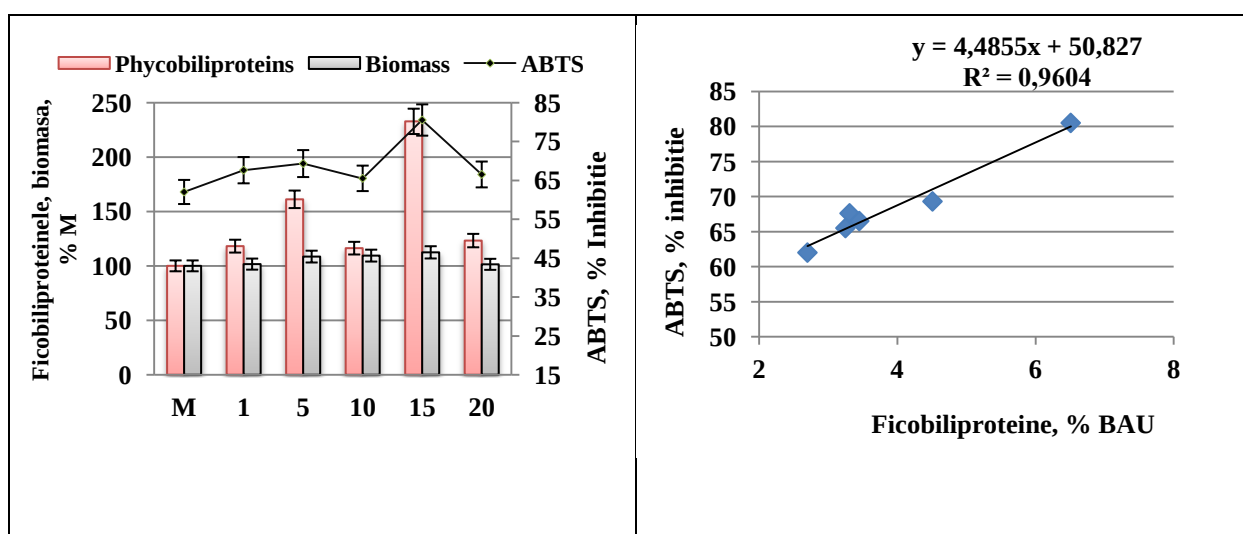


Fig. 4.7 . Conținutul total al ficobilinelor (% BAU) și corelarea între valoarea testului ABTS în extractele hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* în prezența $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$.

Cele mai mari valori au fost obținute la adăugarea cantității de 15 mg/L ale acestui compus, ceea ce a determinat creșterea conținutului de ficobiliproteine cu 132% comparativ cu proba martor. Cantitatea de 5 mg/L asigură o creștere a cantității de ficobiliproteine cu 60%. În ceea ce ține de activitatea antioxidantă a extractelor hidrice obținute din biomasa crescută în prezența diferitor concentrații ale compusului în aceste două cazuri avem o inhibiție de 70 și 80% respectiv a radicalului cation ABTS. În celelalte concentrații nu au fost observate careva modificări ale conținutului de ficobiline în biomasă. De asemenea și cantitatea de biomasă nu se modifică sub influența acestui compus. În cazul acestui compus valorile testului ABTS în extractul apos din biomasa de nostoc este în corelare cu conținutul ficobilinelor, coeficientul de determinare fiind $R^2=0.96$.

Datele prezentate în Figura 4.8 reflectă cantitatea de pigmenți ficobilinici și capacitatea antiradicalică față de radicalul cation ABTS a extractelor hidrice din biomasa de nostoc obținută la creștere în prezența compusului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Efectul de sporire a acumulării de ficobiline a fost observat pentru toate concentrațiile de compus utilizate în studiu. Concentrațiile de la 1 la 15 mg/L au dus la creșterea cantității de ficobiliproteine cu 40-70% față de martor, iar la concentrația de 20 mg/L această creștere a fost de 2,7 ori. În acest caz nivelul de inhibiție a $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a atins valoarea de 92%. La concentrațiile compusului de 1 și 5 mg/L nivelul de inhibiție a radicalului este de aproximativ 80%. În celelalte variante experimentale activitatea antiradicalică a extractului hidric din biomasă a fost la nivelul matorului. Analiza corelațională a stabilit o relație strânsă între conținutul de ficobiliproteine și activitatea antiradicalică a extractelor hidrice din biomasa de nostoc, coeficientul de determinare (R^2) fiind de 0.75 (Figura 4.8).

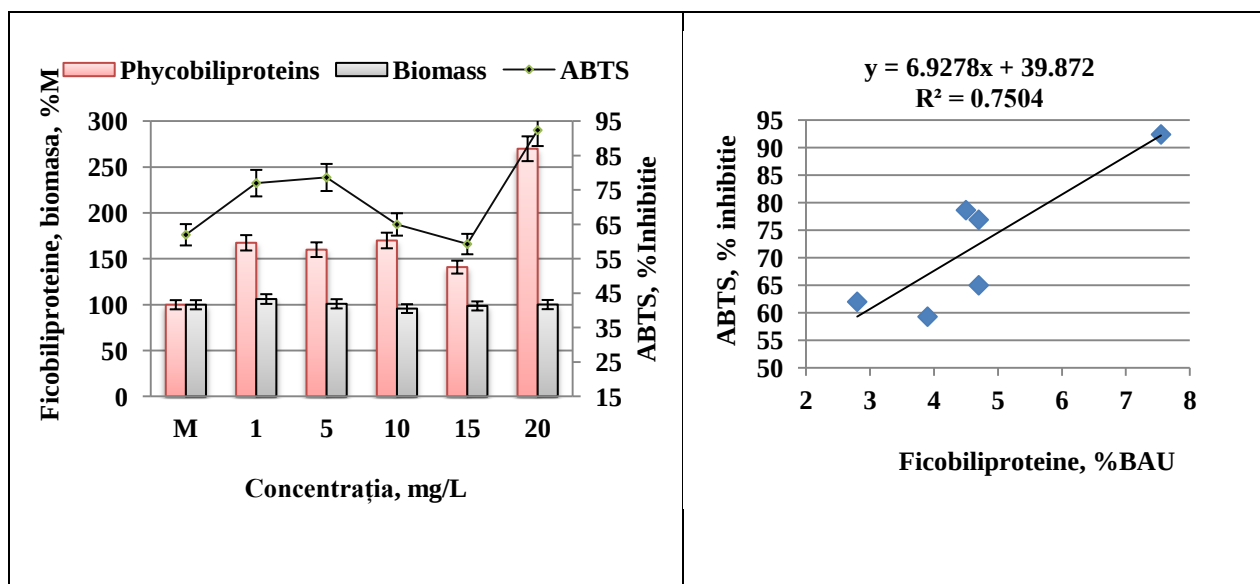


Fig. 4.8. Conținutul total al ficobilinelor (% BAU) și corelarea între valoarea testului ABTS în extractele hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* în prezența $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

A fost de asemenea stabilit efectul de stimulare a procesului de acumulare a ficobiliproteinelor în biomasa de nostoc la creștere în prezența concentrațiilor mici de 1, 5 și 10mg/L ale compusului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_{1.5}(\text{CH}_3\text{OH})_{0.5}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 4.9). În acest interval conținutul de ficobiliproteine în biomasă a crescut direct proporțional concentrației de compus, pornind de la o creștere de 40% la concentrația de 1 mg/L și terminând cu dublarea acestei valori la concentrația de 10 mg/L. Aceasta este cantitatea maximală de ficobiliproteine obținute în experiența cu utilizarea compusului dat. Nivelul de biomasă în variantele experimentale a fost identic probei martor. Valoarea maximă a inhibiției radicalului cation ABTS

a fost de 77%, înregistrat în extractul hidric din biomasa obținută la creștere în prezența a 5 și 10 mg/L de compus. Coeficientul de determinare între parametrii studiați a fost de 0,854, ce indică o corelare puternică între ei.

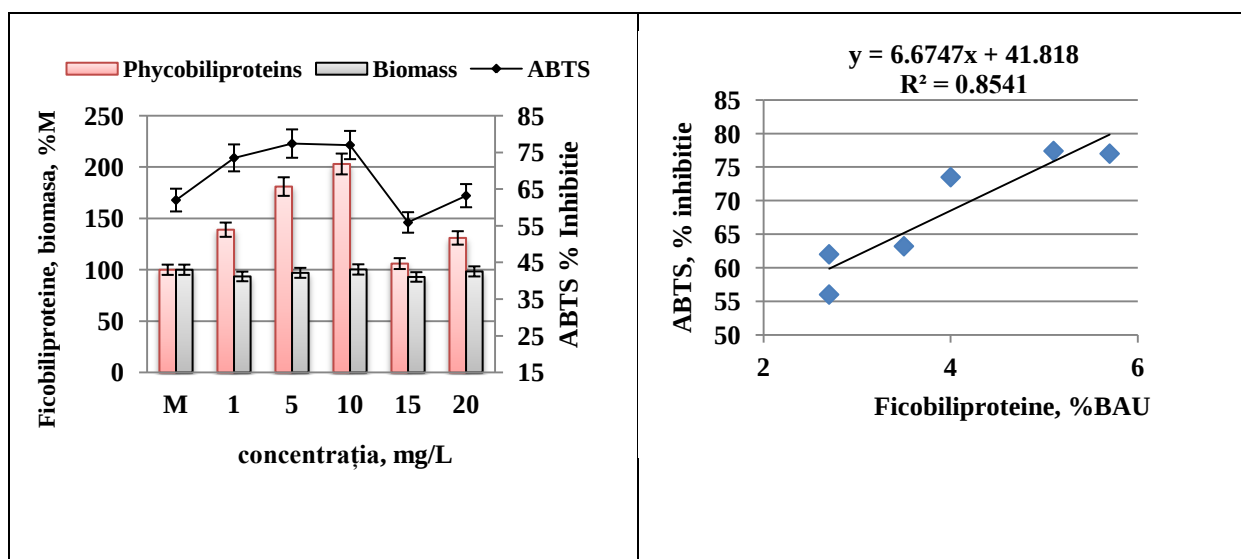


Fig. 4.9 . Conținutul total al ficobilinelor (% BAU) și corelarea între valoarea testului ABTS în extractele hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* în prezența $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_{1.5}(\text{CH}_3\text{OH})_{0.5}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Compusul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de asemenea nu a indus modificarea nivelului de acumulare a biomasei de nostoc, dar în toate concentrațiile aplicate a dus la mărirea conținutului de ficobiline cu 30-40% față de conținutul acestora în proba martor (Fig. 4.10). Creșterea cantității de ficobiliproteine în extractul hidric din biomasa de nostoc cu 30% nu a afectat practic deloc activitatea antiradicalică a acestuia. Astfel, în toate variantele experimentale activitatea antiradicalică a extractelor față de radicalul cation ABTS a avut valori care nu s-au deosebit esențial de activitatea antiradicalică a extractelor din biomasa standard. Coeficientul de determinare între parametrii monitorizați a fost de 0,45, ceea ce denotă o corelare slabă între conținutul de ficobiline și activitatea antiradicalică a extractului hidric.

În experiențele descrise compușii coordinativi ai Fe(III) cu bazele Schiff au fost adăugați la mediul nutritiv în diferite concentrații pentru a induce un stres oxidativ în cultura de *Nostoc linckia*. Aceasta, răspunde la rândul ei prin modificarea proceselor de sinteză a factorilor de protecție, printre care și ficobiliproteinele. Este cunoscut, că acești compuși acționează ca substanțe ce "sting" radicalii liberi ori rup lanțul de oxidare prin intermediul reacțiilor de transfer de electroni ori hidrogen [118]. De fapt, atunci când factorul de stres devine critic, în calitate de reacție de răspuns primar, unele tulpini de cianobacterii, inclusiv *Nostoc linckia*, și-au dezvoltat mecanisme de protecție de prima linie, ce presupun evitarea condițiilor nocive. Acestea includ

migrarea în straturile superficiale ale mediului nutritiv în condiții de laborator sau sinteza de polizaharide extracelulare care pot acționa ca factori de chelare a metalelor. Mai mult, exopolizaharidele pot reduce metalul, în special prin acțiunea grupelor funcționale chimice, depozitându-l în formă de nanoparticule. Aceasta oferă o perspectivă importantă pentru înțelegerea mecanismelor responsabile pentru transportul ionilor metalici și menținerea concentrației homeostatice.

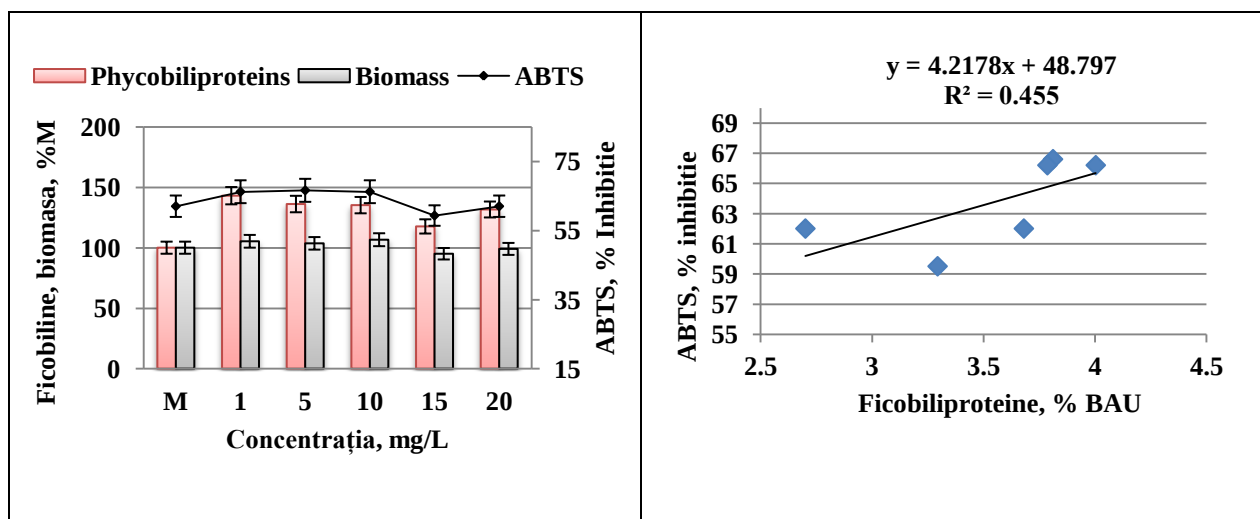


Figura 4.10. Conținutul total al ficobilinelor (% BAU) și corelarea între valoarea testului ABTS în extractele hidrice din biomasa de *Nostoc linckia* în prezența $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Rezultatele obținute demonstrează modificări evidente în conținutul de ficobiliproteine în biomasa nostocului. În cazul compusului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$, creșterea nivelului de pigmenți are loc la un nivel normal al productivității, deci nu putem afirma despre existența unui stres oxidativ. Creșterea cantității de ficobiliproteine în acest caz poate fi o reacție la necesitatea de a activa procesele de asimilare a energiei luminii. În același timp corelarea strânsă între conținutul de ficobiline și activitatea antioxidantă a extractului hidric indică asupra faptului, că acești pigmenți prezintă componentul antioxidant dominant în extract.

În cazul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, cel mai înalt nivel al ficobiliproteinelor a fost înregistrat la concentrația de 20 mg/L – 250% față de martor. În același timp, cantitatea de biomasă a fost la nivelul martorului, deci nu putem afirma, că în acest caz ficobiliproteinele au acționat doar ca elemente implicate în fotosinteză. Corelația între conținutul de ficobiliproteine și activitatea antioxidantă a extractelor hidrice este mai joasă, ceea ce vorbește despre prezența a mai multor componente antioxidante, afară de pigmenții studiați. Putem presupune, că un conținut sporit de ficobiliproteine la concentrația maximă a compusului este o reacție de protecție antioxidantă și una de intensificare a fotosintezei și productivității la *Nostoc linckia*.

În cazul compusului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_{1.5}(\text{CH}_3\text{OH})_{0.5}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ la concentrația de 1,5 și 10 mg/L s-a produs o creștere a conținutului de ficobiliproteine și a activității antioxidante a extractului hidric. Putem presupune, că în aceste condiții are loc o intensificare a sintezei ficobilinelor și a componentelor antioxidante în biomasa de *Nostoc*. La concentrații mai mari ale compusului, nivelul ficobilinelor în biomasă este ca și în proba martor. Aceasta, pe fonul unui nivel scăzut ușor de productivitate, poate fi o dovadă de includere a altor sisteme de protecție antioxidantă decât cele bazate pe acumularea excesivă a acestor pigmenți.

În cazul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a fost înregistrat cel mai mic nivel al corelării între conținutul de ficobiline și activitatea antioxidantă a extractului hidric, dar și cel mai jos nivel al ficobiliproteinelor în biomasa probelor experimentale. În condițiile unei productivități și activități antioxidante la nivelul probei martor, putem presupune că acest compus are o acțiune practic neutră față de *Nostoc*.

În concluzie putem afirma, că compușii coordinativi ai Fe(III) cu bazele Shiff au avut un efect stimulator asupra procesului de acumulare a ficobiliproteinelor în biomasa de *Nostoc linckia*. Efectul de stimulare depinde de doza aplicată, și în cazul a trei compuși, concentrația de 20 mg/L a fost determinată ca fiind una de intensitate moderată. Rezultatele obținute demonstrează existența unei corelații între conținutul ficobiliproteinelor și valorile testului ABTS ale extractelor hidrice din biomasă experimentală de *Nostoc linckia*. Prin urmare, este posibil să se modifice activitatea antioxidantă a biomasei de *Nostoc*, aplicând concentrații scăzute de stimuli chimici. În variantele noastre cel mai înalt nivel de corelație între parametrii studiați a fost observat în cazurile de stimulare a creșterii *Nostoc*ului (compusul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$) sau inhibarea acestui proces (compusul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_{1.5}(\text{CH}_3\text{OH})_{0.5}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Mai neutră este acțiunea factorilor externi în prezența cărora corelația dintre conținutul ficobiliproteinelor și activitatea antioxidantă a extractelor apoase este joasă. Această concluzie sugerează funcții duble ale pigmentilor ficobilinici pentru cultura de *Nostoc* - atât fotosintetică, cât și de protecție antioxidantă. Intensitatea acestor aspecte funcționale este determinată de natura și acțiunea factorilor externi care influențează cultura.

4.1.3. Utilizarea compusilor noi cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic pentru sporirea activității antioxidante la *Nostoc linckia*

Cercetările efectuate de noi pe alte culturi ficologice au demonstrat, că în cazul aplicării unor compuși cu potențial toxic, dar în cantități foarte joase, se poate obține o stare de stress moderat, care duce la acumularea intensă a compusilor antioxidanți în biomasă, fără a duce la

deteriorarea componentelor celulare. Astfel, compusul Sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat asigură creșterea substanțială a activității antioxidante a extractelor din biomasa de *Porphyridium cruentum* [1].

În acest compartiment al lucrării sunt descrise rezultatele testării a doi compuși chimici noi cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic, sintetizați de către cercetătorii Institutului de Chimie al AȘM sub conducerea dr. hab. Arîcu Aculina.

Ca compus inițial pentru sinteza N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarneseno-ilamino)carbazolului (4) a servit acidul $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenic (1), care a fost obținut din sclareolida (5) comercial accesibilă, cu un randament total de 60%. La tratarea acidului (1) cu clorura de oxalil (COCl)₂ a fost sintetizată *in situ* cloranhidrida (2), care a fost introdusă în reacție cu N-aminocarbazolul (3), în rezultatul căreia a fost obținut N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoilamino)carbazolul (4) cu un randament de 60% (Figura 4.11).

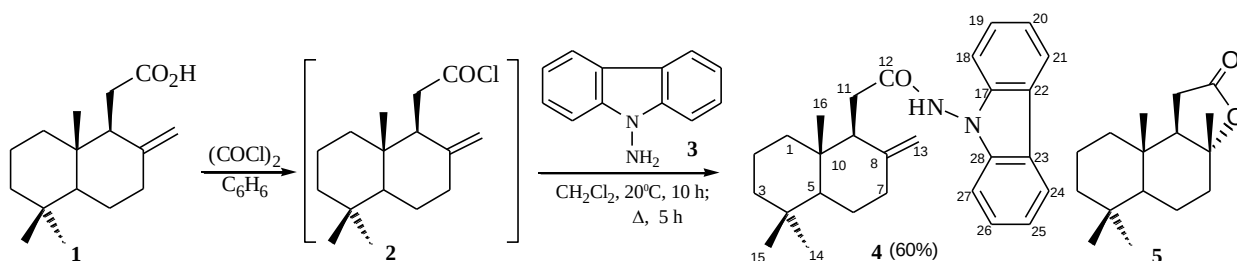


Fig. 4.11. Schema de obținere a N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarneseno-ilamino)carbazolului.

Procedeul de obținere a compusului este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 60% față de cel teoretic calculat. Compusul este stabil în contact cu aerul.

Ca compus inițial pentru sinteza 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazolului (4) a servit acidul $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenic (1), care a fost obținut din sclareolida (5) comercial accesibilă, cu un randament total de 60%. La tratarea acidului (1) cu clorura de oxalil (COCl)₂ a fost sintetizată *in situ* cloranhidrida (2), care a fost introdusă în reacție cu 3-amino-1,2,4-triazolul (3), în rezultatul căreia a fost obținută amida acidului biciclohomofarnesenic (4) cu un randament de 58% (Figura 4.12).

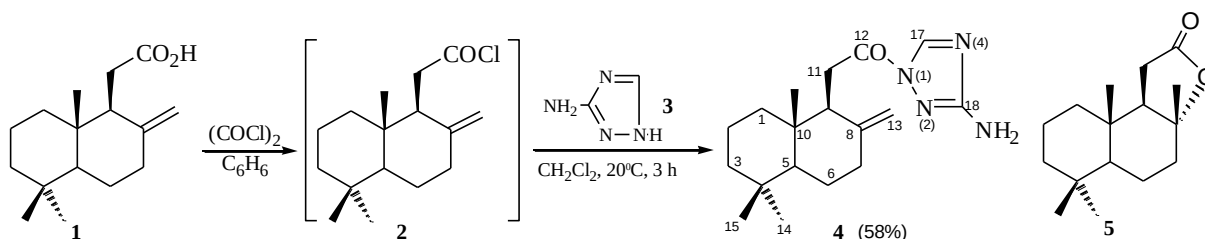


Fig. 4.12. Schema de obținere a 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazolului.

Procedeul de obținere a compusului este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 58% față de cel teoretic calculat. Compusul este stabil în contact cu aerul. Acești compuși în cantitate de 50-100 mg/L asigură sporirea activității antioxidante a extractelor etanolice de 70% cu 23-42% față martor. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.3.

Tabelul 4.3. Activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 70% în baza biomasei de *Nostoc linckia*, rezultate la cultivarea în prezența stimulatoarelor chimici

Compusul chimic	Concentrația compusului g/L	Activitatea antioxidantă, % inhibiție DPPH
Martor	-	28,03±0,72
1-($\Delta^{8,13}$-Biciclohomo-farnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazolul	0,050	60,14±1,09
	0,060	67,44±1,15
	0,100	59,16±2,04
N-($\Delta^{8,13}$-biciclohomo-farnesenoil-amino)carbazolul	0,050	64,35±0,98
	0,060	76,41±1,69
	0,100	71,24±1,48

Datele tabelului demonstrează creșterea activității antioxidante a extractului etanolic de 70% alcool etilic cu concentrația de 1 mg/ml substanța activă, obținut în baza biomasei de *Nostoc* de 2,11-2,73 ori față de varianta martor. Odată cu creșterea activității antioxidante a extractului etanolic crește și valoarea biomasei de *Nostoc* în calitate de producător de substanțe antioxidante.

Prin urmare compușii 1-($\Delta^{8,13}$ -Biciclohomo-farnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazolul și N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil-amino)carbazolul prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulatori ai activității antioxidante a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*. Aceste rezultate au stat la baza elaborării și obținerii a două brevete de invenție în colaborare cu colegii chimiști care au realizat sinteza compuşilor - Brevet MD 4326, Brevet MD 4327 [2,3].

4.2. Utilizarea reziduului de biomasă de *Nostoc linckia* după extragerea antioxidantilor pentru sinteza nanoparticulelor de argint

Unul dintre cele mai moderne aspecte ale nanotehnologiilor este sinteza biologică a nanoparticulelor – proces, ce nu implică medii și reagenți toxici, este prietenos mediului și oferă posibilități considerabile de a lărgi domeniile lor de aplicare prin introducerea în consumul uman și animal. Cele mai studiate nanoparticule sunt cele provenite din metale nobile, nanoparticulele de metal fiind testate și aplicate în știința materialelor, fizică, chimie, electronică, optoelectronică, medicină și biochimie. Nanoparticulele de argint sunt cunoscute pentru

proprietățile lor de a fi inerte și, în special, de a nu interacționa cu oxigenul molecular. În special acestea sunt apreciate pentru proprietățile lor dezinfectante și antimicrobiene, efectul antiviral, imunomodulator și capacitatea de a stopa procesul de malignizare a țesuturilor afectate.

Sinteza nanoparticulelor cu compoziție, dimensiuni și formă determinată este una din cele mai importante sarcini ale nanotehnologiei [116]. În prezent gama metodelor, care permit de a obține nanoparticule de argint (AgNP) este destul de largă. Printre acestea putem număra: metoda de sinteză chimică, electrochimică, radiația, metoda fotochimică și sinteza biologică [87, 109, 166, 178, 253, 255]. Bionanosinteza poate fi realizată în foarte multe variante, în special în funcție de materialul biologic utilizat în proces. Pentru biosinteza nanoparticulelor metalice sunt utilizate în special diferite specii de microorganisme, caracterizate prin rată de creștere înaltă și deci, prin eficiență înaltă în procesele biosintetice. Diferite tulpini de fungi filamentoși realizează biosinteza preferențial pe suprafața miceliului. De asemenea este intens studiată capacitatea de bionanosinteză a drojdiilor, actinomicetelor, diferitor specii de bacterii la care nanobiosinteza are loc atât pe suprafața celulelor, cât și în interiorul lor [116].

Plantele prezintă o enormă perspectivă pentru bionanosinteză, în special datorită unei varietăți largi de metaboliți cum ar fi flavonoizii, cetonele, terpenoizii, aldehydele, amidele și acizii carboxilici, care se pot include în procesul de bioreducere, care de fapt și determină biosinteza nanoparticulelor metalice, inclusiv a celor de argint. Printre avantajele invocate de susținătorii acestor obiecte pentru bionanosinteză sunt: disponibilitatea lor, lipsa potențialului patogen, sinteza rapidă, colectarea simplă. Printre speciile de plante cu ajutorul cărora a fost deja realizată biosinteza AgNP sunt *Cinnammum camphora*, *Aloe vera*, *Cycas*, *Jatropha curcas*, *Magnifera indica*, *Syzygium aromaticum* [24, 40, 110, 132, 133, 186]. Fiind apropiate de plante prin capacitatea de a realiza fotosinteza, cianobacteriile prezintă și ele nanofabrici potrivite pentru obținerea nanoparticulelor metalice. Fiind dotate cu sisteme enzimatice oxido-reducătoare performante, aceste obiecte realizează cu ușurință reacțiile, care stau la baza proceselor de nanosinteză a particulelor, inclusiv a celor de argint. Acțiunea antibacteriană a nanoparticulelor de argint depinde în mare măsură de dimensiunea, forma și stabilitatea nanoparticulelor [155]. Astfel, activitatea antibacteriană crește odată cu micșorarea dimensiunilor nanoparticulelor. Agregarea particulelor sintetizate duce la reducerea considerabilă a activității acestora. Rata formării intracelulare a nanoparticulelor precum și dimensiunea acestora poate fi dirijată prin modificarea condițiilor în care are loc acest proces, cum ar fi modificarea pH-ului mediului de reacție, temperaturii, concentrația diferitor substraturi, timpul de contact al biomasei cu soluția reactantă ș.a. Același principiu de manipulare a formei și dimensiunilor nanoparticulelor obținute prin biosinteză poate fi aplicat și în cazul sintezei extracelulare a acestora [81].

Scopul cercetărilor efectuate la această etapă de lucru a constat în obținerea biomasei de nostoc și realizarea experienței de evidențiere a procesului de biosinteză a nanoparticulelor de argint de către această cultură. Pentru realizarea bionanosintezei a fost utilizată biomasa reziduală după extragerea componentelor antioxidante. În calitate de precursor pentru biosinteza nanoparticulelor de argint a fost utilizată soluția standard de AgNO_3 cu concentrația de 100mg/L.

Amestecul reactant s-a preparat din 10 ml biomasă reziduală standardizată (50 mg/ml) și 100 ml soluție standard de azotat de argint. Incubarea sistemului reactant plasat pe un agitator orbital setat la 200 rotații/min, la temperatura camerei timp de 72 ore. Prelevarea probelor de biomasă pentru aprecierea procesului de biosinteză a nanoparticulelor și de monitorizare a modificărilor biochimice în biomasă au fost efectuate la 24, 48 și 72 ore de la începutul experienței. Pentru a stabili modificările în concentrația argintului în soluție produse după 24, 48 și 72 ore de interacțiune cu nitratul de argint a fost aplicată metoda spectrometriei atomice de absorbție (AAS), iar modificarea conținutului de argint în biomasă a fost apreciată prin aplicarea metodei de analiză de activare cu neutroni (NAA). Aceste cercetări au fost realizate la Institutul Unificat de Cercetări Nucleare din Dubna, Rusia în cadrul unui acord de colaborare între această instituție și Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. Rezultatele obținute au fost comparate cu rezultatele obținute pentru biomasa nativă obținută într-un ciclu de experiențe anterioare realizate în laboratorul Ficobiotehnologie [36].

Pentru a monitoriza concentrația argintului în mixul reactant, din acesta s-au prelevat probe imediat după prepararea soluției de contact și după intervalele stabilite de 24 ore, 48 și 72 ore. Prelevarea inițială este necesară, din cauză că, concentrația argintului în soluție nu va fi cea de 100 mg/l, deoarece o parte din argint este sedimentat de ioni Cl^- reziduali, iar alta se fixează la contactul imediat al biomasei cu soluția de azotat de argint. Rezultatele obținute în comparație cu datele pentru biomasa nativă sunt date în Tabelul 4.4.

Rezultatele obținute arată, că cantitatea de argint în soluție scade pe parcursul primelor 24 de ore și rămâne constantă până la sfârșitul experienței, atât în experiența efectuată cu utilizarea biomasei native, cât și cu reziduul de biomasă rămas după extragerea principiilor bioactive. Totodată, concentrația argintului în biomasa de nostoc crește, modificările principale în conținutul argintului producându-se în primele 24 ore de interacțiune cu nitratul de argint. rezultatele obținute în experiența cu reziduul de biomasă sunt mai înalte comparativ cu biomasa nativă. Acest lucru se datorează faptului, că în procesul de extragere are loc activarea site-urilor active de pe suprafața peretelui celular care se produce prin eliminarea particulelor fixate pe site-urile, care pot realiza această fixare.

Tabelul 4.4. Modificarea conținutului de argint în soluția reactantă și în biomasă pe durata biosintezei nanoparticulelor

Condițiile experienței	Concentrația argintului							
	Soluție, mg/L				Biomasă, mg/g			
	Inițial	24 ore	48 ore	72 ore	Inițial	24 ore	48 ore	72 ore
Biomasă nativă + soluție AgNO₃ [36]	60,5±0,2	23,3±0,9	23,0±3,0	23,6±0,4	6,0±0,9	43,5±0,7	44,9±3,1	45,2±2,2
Biomasă reziduală + soluție AgNO₃	64,0±1,1	15,3±0,8	14,6±1,7	14,7±0,6	6,5±1,0	48,9±2,6	49,6±1,4	50,7± 0,9

Prin urmare, se poate rezuma că concentrația argintului crește în biomasă în prima zi a contactului cu sursa de argint, iar explicațiile pot fi următoarele: În prima fază, numită „rapidă” ionii de argint sunt absorbiți prin implicarea grupurilor funcționale active astfel ca: amino, carboxil, sulfhidril, fosfat și tiolice care leagă metalul.

Este cunoscut faptul, că nanoparticulele de argint posedă absorbție specifică în diapazonul lungimilor de undă de 420-440 nm, de aceea în calitate de test primar al procesului de sinteză a nanoparticulelor de argint în probele prelevate au fost înregistrate spectrele de absorbție, care sunt prezentate în Figura 4.13.

Pe spectrele obținute se vede clar maximum-ul de absorbție apărut suplimentar în zona specifică nanoparticulelor (indicat cu săgeți). De asemenea, se mai observă mărirea intensității acestui pic. Formarea nanoparticulelor poate fi determinată de asemenea de modificarea culorii culturii. La contactul biomasei de nostoc cu soluția de azotat de argint s-a modificat culoarea mixului format dintre biomasă și soluția de azotat de argint din verde-brun în brun-gălbui.

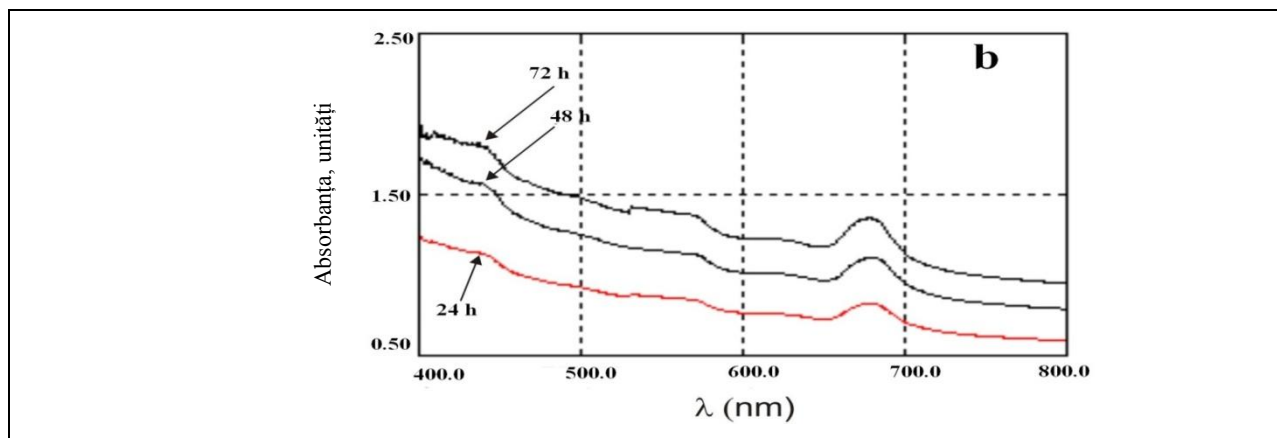


Fig. 4.13. Spectrele de absorbție a probelor de biomasă prelevate la 24, 48 și 72 ore de la începutul experienței.

Probele de biomasă de nostoc au fost supuse vizualizării cu aplicarea metodei microscopiei electronice de baleiaj. În Figura 4.14 sunt prezentate imaginile, care demonstrează formarea conglomeratelor de nanoparticule de argint pe suprafața celulelor. Trihoamele de nostoc sunt înconjurate de un strat de exopolizaharide, care poate rămâne legat covalent cu structurile membranei citoplasmatică, ori poate fi spălat în mediul extracelular în dependență de condițiile create. Anume acest strat este gazda conglomeratelor de nanoparticule metalice.

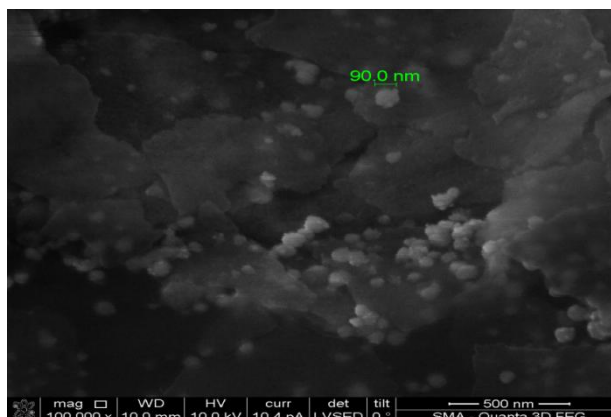


Fig. 4.14. Conglomerate de nanoparticule de argint situate extracelular pe suprafața capsulei polizaharidice la *Nostoc linckia*.

De asemenea, pentru a investiga mostrele de biomasă de nostoc cu Ag NP a fost aplicată metoda de difracție cu raze X. În Figura 4.15. este prezentată difractograma paternului de nanoparticule sintetizate de către *Nostoc linckia*, procesate conform metodei Rietveld.

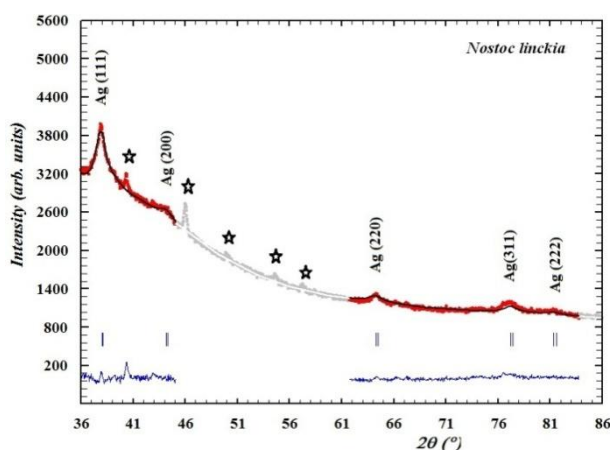


Fig. 4.15. Difractograma paternului de nanoparticule de argint în biomasa de nostoc.

Difractograma demonstrează prezența cristalelor de argint de formă cilindrică cu parametrii structurii de $4.098 \pm 0.004 \text{ \AA}$, caracteristic argintului. Rezultatele obținute arată clar că nanoparticulele de argint formate prin reducerea ionilor de Ag (I) sunt de natură cristalină.

Astfel, la concentrația soluției de azotat de argint de 100 mg/L utilizate pentru procesul de sinteză a nanoparticulelor de către cianobacteria *Nostoc linckia* mărimea nanoparticulelor care sunt cilindrice este de $\approx 4-5$ nm. Generalizând datele referitoare la modificarea conținutului de argint în biomasa reziduală de nostoc și în amestecul reactant „soluție de azotat de argint+biomasă reziduală”, celor de spectrometrie și microscopie electronice de baleiaj se poate afirma cu siguranță, că biomasa reziduală de *Nostoc linckia* rămasă după extragerea produselor cu proprietăți antioxidante este o matrice potrivită pentru producerea nanoparticulelor de argint. Nanoparticulele obținute prin procedura de biosinteză cu utilizarea biomasei reziduale de nostoc pot fi folosite atât în stare pură, cât și în componența biomasei. Utilizarea nanoparticulelor în stare pură presupune extragerea și purificarea lor, ceea ce implică cheltuieli suplimentare.

În linii generale, rezultatele obținute indică asupra posibilității utilizării biomasei reziduale de *Nostoc linckia* după extragerea componentelor antioxidante în calitate de matrice pentru sinteza nanoparticulelor de argint. Timpul optimal de contact al reziduului cu soluția ce conține ioni de argint este de 24 de ore, deoarece în continuare nu mai are loc acapararea argintului din mediu.

4.3. Utilizarea biomasei reziduale de *Nostoc linckia* în calitate de biosorbent

Biosorbția este un proces rapid și reversibil de recuperare a metalelor din soluții, care amintește adsorbția ori chiar schimbul de ioni [79]. Începând cu anii 90 ai secolului trecut biosorbția începe a fi recunoscută drept metodă biologică științific argumentată de epurare a apelor reziduale, utilă în special pentru recuperarea metalelor grele din soluții diluate. Primele lucrări în acest domeniu au fost consacrate selectării materialelor biologice cu proprietăți de biosorbent. Unele tipuri de biosorbenți, cum ar fi biomasa de cianobacterii, alge, mușgaiuri, drojdii, bacterii pot lega cantități foarte mari de poluanți din mediu, în unele cazuri de până la 50% sau chiar egale cu greutatea biomasei [248]. Unii biosorbenți pot lega și colecta o gamă largă de metale grele fără priorități specifice, în timp ce alții posedă specificitate pentru anumite tipuri de metale. În calitate de biosorbenți poate fi utilizată biomasa reziduală a proceselor industriale, biomasa organismelor disponibile în cantități mari în natură; și biomasa organismelor cu creștere rapidă, în special cultivate în scopuri concrete. În exemplele de mai sus cheltuielile pentru obținerea unui biosorbent eficient sunt minimale, ceea ce asigură un interes practic față de biosorbție.

Procesul de biosorbție al metalelor implică faza solidă – materialul biologic și faza lichidă – apa cu poluanții dizolvați în ea. Fixarea ionilor metalici are loc prin mai multe căi: prin adsorbție, schimbul de ioni; complexarea ionilor cu componentele biomasei, atracția

electrostatică sau microprecipitarea. Adsorbția fizică a poluanților, în special a metalelor cu sarcină pozitivă, are loc prin implicarea unor interacțiuni intermoleculare (van der Waals forces) fără formarea legăturilor chimice. Acest mecanism are o contribuție modestă în procesul de biosorbție și elimină doar o mică parte a metalelor din soluții [45, 259]. Schimbul de ioni se produce prin înlocuirea unor ioni mobili de alții (de exemplu cei metalici) cu aceeași sarcină. Schimbul de cationi are loc în biopolimeri, iar cele mai convenabile grupuri funcționale, capabile să formeze legături cu aceștia sunt grupurile carboxil, fosfații organici, sulfații organici. Schimbul de anioni în biopolimeri pot avea loc pe variate grupuri organice cu conținut de azot. În structura proteinelor aminogrupurile, grupurile imidazol și guanidina sunt centre cu sarcină pozitivă. Rolul acestui mecanism poate fi demonstrat prin mai multe exemple. Astfel în cazul interacțiunii succesive a biosorbentului cu soluțiile diferitor metale, indiferent de ordinea în care acestea se succed, o parte a metalului care a interacționat primul este reîntoarsă în soluție, atunci când sorbentul intră în contact cu al doilea metal. Acest lucru este posibil doar în condițiile unui schimb de ioni [183, 259]. Efectul pozitiv al pretratării biosorbentului cu acid asupra capacității de biosorbție a metalelor este de asemenea o dovadă a rolului schimbului de ioni în acest proces [159]. Formarea compușilor complecși ai metalelor – complexarea - se produce prin legarea lor cu grupurile funcționale ale membranei celulare, peretelui celular și capsulei. Acest proces are loc prin formarea unui complex din părți componente mai simple. În cazul metalocomplexelor, una dintre componentele participante este un ion metalic. Atunci când între ionul metalic și grupurile vecine se formează legături covalente structura formată este un compus coordinativ al metalului cu componentele celulare [165].

Un alt proces implicat în recuperarea metalelor din soluțiile apoase este precipitarea. Venind în contact cu metalele toxice microorganismele pot reacționa prin formarea unor compuși specifici (ca de exemplu metionina, fitochelatinele ș.a) [219]. Precipitarea de asemenea mai poate fi cauzată și de interacțiunea între metale și compușii prezenți pe suprafața celulelor.

În dependență de tipul de biomasă care acționează ca biosorbent în procesul de biosorbție poate fi inclus oricare din mecanismele menționate independent ori în paralel. Toate mecanismele descrise mai sus pot avea loc simultan, completându-se reciproc și asigurând eficiența procesului de acumulare a ionilor metalici din soluții.

Deoarece procesul de biosorbție este realizat de biomasa moartă/inactivă, acesta are loc extracelular. În acest caz grupurile funcționale anionice prezente în peptidoglicanul, fosfolipidele și lipopolizaharidele cianobacteriilor sunt componentele primare responsabile pentru caracterul anionic al procesului de legare a ionilor metalici pe peretele celular. Exopolizaharidele care

formează capsula celulară la bacterii abundă de grupări funcționale anionice, datorită cărora sunt considerate factori de chelare pentru recuperarea ionilor din soluțiile hidrice [55, 214, 217].

Factorii determinanți ce afectează biosorbția sunt concentrația inițială a metalelor, temperatura, pH-ul și concentrația biomasei în soluție. Temperatura nu influențează biosorbția dacă variază în limitele 20-35°C. Unul din factorii determinanți ai procesului de biosorbție este pH-ul, care influențează activitatea grupelor funcționale ale biomasei și competiția ionilor metalici [107, 199, 247].

Modificarea pH-ului duce la substituirea cationilor pe site-urile active și afectează gradul de ionizare a biomasei de spirulină în timpul biosorbției. Mediul acid, pH=1,5, facilitează absorbția practic totală a Cr(VI) din mediu de către biomasa de spirulină, 50% din cantitatea cromului fiind absorbită în primele minute de contact a biomasei cu metalul [85]. Biomasa cianobacteriei *Nostoc muscorum* acumulează cromul la pH-ul= 3 [95]. Pentru Cr(III), condiția optimală pentru sorbția lui de către biomasa de spirulină este pH=6. De pH-ul soluției depinde și biosorbția Ag(I) în biomasa de spirulină, astfel, la pH=8,6 constanta biosorbției o depășește pe cea determinată pentru pH=5,5, iar capacitatea de biosorbție este de 1,5 ori mai mare [80]. Biosorbția rapidă a plumbului până la 74%, are loc în primele 12 min, apoi în 24 ore ajunge la concentrația de 95% a ionilor adsorbiți. Înlăturarea mai eficientă a ionilor de plumb din mediu (<81,18%) și crom (<98,8%) are loc la t=45°C, pH=4 și pH=2, respectiv. Biosorbția plumbului depinde de concentrația lui în soluție și de pH, astfel, concomitent cu creșterea concentrației metalului scade capacitatea de absorbție. pH-ul determină activitatea grupelor funcționale în procesul sorbției Cu²⁺, Cd²⁺ și Cr³⁺ în biomasa de spirulină. Astfel pH 2–5 facilitează activitatea grupurilor carboxil; pH 5–9 — a grupurilor carboxil și grupurilor fosfate și pH 9–12 — a grupurilor carboxil, fosfate și hidroxilice (or aminice).

Activitatea și prezența grupărilor funcționale depinde în mare măsură de condițiile de obținere a biomasei. Astfel a fost demonstrată eficiența net superioară a biomasei obținute în condiții fotoautotrofe de a fixa ionii de Cu²⁺, Cd²⁺ și Cr³⁺ [45]. Tot pentru Cd a fost demonstrată ca o condiție optimă de fixare a ionilor în biomasa de spirulină este pH-ul de 7,0, când în primele 5 min se acumulează 78% metal. La *Spirulina platensis* și *Aphanothece flocculosa* sorbția ionilor de mercur are loc la pH-ul=6,0. Prezența ionilor de Co²⁺, Ni²⁺ și Fe³⁺ facilitează sorbția mercurului în biomasa cianobacteriilor. Biosorbția Pb²⁺ în celulă este un proces rapid, ionii fiind adsorbiți la suprafața celulei [50, 86]. Asimilarea rapidă a metalelor grele de către celulele vii este foarte semnificativă atunci când celulele sunt implicate în procesele de bioremediere [43].

Procesul de sorbție depinde în mare măsură de raportul dintre concentrația metalului și conținutul de biomasă. Astfel, *Spirulina platensis* în concentrația de 1-2 g/l absoarbe eficient

cadmiul din soluția cu concentrația metalului 100-200 mg/l, iar pentru 4 g biomasă fac față unei concentrații a metalului de 600-800 mg/l [225, 226]. Concentrația cromului de 141.96 mg/l este fixată complet de cantitatea de 2,45 g/L biomasă de spirulină, iar pentru fixarea a 100 mg Cr(VI) este nevoie de 2,4 g biomasă de spirulină [85].

Este foarte important tipul de biomasă selectat pentru procesul de biosorbție. Forma rehidratată a biomasei de spirulină este superioară formei uscate de biomasă în sorbția Cr(III) [145] și Cu(II) [226]. Biosorbția metalelor este strâns dependentă de tipul ionilor metalici, numărul de sarcini, afinitatea și legăturile cu acest metal. Statutul biomasei, tipul biomaterialelor, proprietățile metalelor, condițiile mediului ambiant, pH-ul, toate influențează mecanismul biosorbției metalelor. Ionii metalelor legate pe suprafață pot fi înlocuiți cu alți ioni, agenți de chelatare sau acizi, ceea ce face posibilă reciclarea biosorbentului și utilizarea lui repetată. Astfel, biosorbția metalelor de către diferite tipuri de biomasa prezintă un fenomen cu înalt potențial de aplicare în tehnologiile de biopurificare și bioremediere a mediului, în special a apelor contaminate.

4.3.1. Utilizarea biomasei reziduale de *Nostoc* în calitate de biosorbent pentru purificarea apelor reziduale contaminate cu crom și nichel.

Cromul și nichelul nimeresc în mediul înconjurător din mai multe procese tehnologice, așa ca mineritul, industriile de rafinare, industria de galvanizare, industria de prelucrare a pielii, conservarea lemnului, producerea de oțel inoxidabil, aliaje și catalizatori. Cromul este un poluant metalic care persistă în mediul acvatic în cea mai mare parte în formă hexavalentă [Cr (VI)] și trivalentă [Cr (III)]. Cromul hexavalent este foarte solubil în apă și carcinogenic pentru om. Nichelul este un element esențial pentru om și animale, datorită importanței sale în căile metabolice. Deși, acesta este un micronutrient și / sau cofactor esențial, nichelul este unul dintre cele mai toxice metale grele la concentrație mare și este un cancerigen uman bine-cunoscut [95].

Scopul cercetărilor, rezultatele cărora sunt prezentate în continuare a constituit stabilirea capacității de biosorbție a biomasei reziduale de *Nostoc linckia* comparativ cu biomasa nativă față de crom și nichel, dar și față de microcomponentele metalice prezente în apele reziduale.

Experiențele au fost efectuate în colaborare cu cercetătorii Institutului Unificat de Cercetări Nucleare, Dubna. Apele reziduale utilizate în cercetare au fost colectate de la Asociația Științifică de producere ATOM din Dubna. Primul tip de ape contaminate predominant cu crom conțineau acest metal în cantitate de 9,4 mg/L, iar cel de-al doilea tip de ape, contaminate cu nichel, conțineau metalul în cantitate de 14,1 mg/L. Au fost efectuate două serii de experiențe – cu biomasă nativă de *Nostoc* și cu biomasă reziduală obținută după extragerea principiilor

antioxidante din ea [264]. În ambele cazuri condițiile de lucru au fost următoarele. 25 ml biomasă de nostoc (cu concentrația de 6,5 g/L) s-au introdus în baloane de sticlă cu volumul de 250 ml, care conțineau 100 ml ape reziduale. Baloanele s-au plasat pe agitator orbital setat la 100 rotații per minut. Probele au fost colectate la 5, 15 și 30 min de contact. Biomasa a fost centrifugată, după care a fost determinat nivelul de metale în ea. Determinarea metalelor în biomasă a fost efectuată de către colegii din Dubna cu aplicarea metodei de analiză multielementală cu activarea neutronilor. Rezultatele obținute pentru apele reziduale cu conținut înalt de crom sunt prezentate în Tabelul 4.5.

Tabelul 4.5. Conținutul elementelor în biomasa nativă și reziduală de nostoc în dependență de timpul de contact cu apele reziduale ce conțin crom

Conținutul elementului în biomasă, $\mu\text{g/g}$	Timpul de contact, min			
	0; Martor	5 min	15 min	30 min
Biomasa nativă (Ziniovscia 2014)				
Cr	12.5 $\pm$ 1.3	745 $\pm$ 56	806 $\pm$ 67	798 $\pm$ 33
Fe	159 $\pm$ 11	990 $\pm$ 69	967 $\pm$ 67	937 $\pm$ 65
Ni	50 $\pm$ 4.5	260 $\pm$ 23	300 $\pm$ 27	303 $\pm$ 27
Zn	9.3 $\pm$ 0.8	70 $\pm$ 6.3	80 $\pm$ 7.2	82 $\pm$ 7.3
K	21300 $\pm$ 2532	3777 $\pm$ 447	3500 $\pm$ 420	2906 $\pm$ 348
Biomasa reziduală				
Cr	10.5 $\pm$ 2.3	812 $\pm$ 67	826 $\pm$ 82	830 $\pm$ 23
Fe	150 $\pm$ 33	1016 $\pm$ 64	1088 $\pm$ 34	1100 $\pm$ 45
Ni	32 $\pm$ 3	295 $\pm$ 33	345 $\pm$ 43	348 $\pm$ 47
Zn	6.8 $\pm$ 1.1	76 $\pm$ 4.2	85 $\pm$ 2.2	92 $\pm$ 3.7
K	4501 $\pm$ 436	4334 $\pm$ 276	4409 $\pm$ 328	4396 $\pm$ 284

Din rezultatele prezentate în tabel se observă, că ambele tipuri de biomasă sunt biosorbenți eficienți pentru crom. Conținutul cromului în biomasa de nostoc este foarte neînsemnată și constituie 12,5 $\mu\text{g/g}$ de biomasă nativă și 10,5 $\mu\text{g/g}$ de reziduu de biomasă. În primele 5 min de contact al biomasei cu apele reziduale ce conțin crom concentrația acestui metal în biomasa nativă crește de 59,6 ori iar în cea reziduală – de 80 ori. Prolongarea timpului de contact al biomasei cu soluția metalică în ambele cazuri este inefficientă, deoarece cantitatea metalului nu mai crește în continuare. Merită a fi menționat faptul, că nici procesul de desorbție la contactul de durată nu are loc. Aceasta sugerează concluzia, că biomasa de nostoc reține eficient și stabil cromul în componența sa și deci, ar putea fi un biosorbent eficient pentru ape reziduale de acest tip. Analiza chimică a apelor reziduale utilizate în experiențe a arătat, că acestea mai conțin de asemenea și cantități considerabile de fier, nichel și zinc, cantitatea cărora a fost și ea

monitorizată în cadrul experiențelor de biosorbție. Rezultatele obținute demonstrează, că în paralel cu cromul din ape, biomasa nativă și reziduală de nostoc acumulează activ și aceste 3 metale. Astfel în biomasa reziduală de nostoc după 5 min de contact cu apele reziduale ce conțin crom, concentrația de fier crește de 6,8 ori, cantitatea de Ni – de 9,2 ori, iar cea de zinc – de 11,2 ori față de aceeași biomasă până la contactul ei cu poluanții.

Astfel, biomasa reziduală de *Nostoc linckia* acționează în calitate de biosorbent pentru metalele grele practic identic cu biomasa nativă utilizată în același scop, ceea ce este foarte important în tehnologiile de producere a antioxidanților, oferind o soluție foarte convenabilă de utilizare a materialelor secundare, care de fapt, constituie deșeuri ale producerii. Diferențele evidente care sunt observate în aceste două cazuri se referă la conținutul de potasiu în biomasă, cantitatea căruia în biomasa nativă este de 5 ori mai mare ca în cea reziduală. Acest fapt are explicație foarte simplă, deoarece acest element este tipic pentru celulele vii, fiind concentrat în ele pentru a asigura potențialul membranar. Odată cu moartea celulelor, pompele membranare își încetează activitatea, ceea ce duce la eliberarea potasiului în mediu.

Același tip de cercetare a fost realizat și pentru apele reziduale contaminate preponderent cu nichel. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.6.

Tabelul 4.6. Conținutul elementelor în biomasa nativă și reziduală de nostoc în dependență de timpul de contact cu apele reziduale ce conțin nichel

Conținutul elementului în biomasă, $\mu\text{g/g}$	Timpul de contact, min			
	0; Martor	5 min	15 min	30 min
Biomasa nativă (Zinicovscaia 2014)				
Ni	50 ± 4.5	652 ± 23	696 ± 32	701 ± 28
Fe	159 ± 11	490 ± 19	512 ± 27	520 ± 26
Cr	$12,5 \pm 1.3$	48.6 ± 2.3	52.4 ± 3.1	52.3 ± 2.8
Zn	9.3 ± 0.8	82 ± 4.5	86 ± 6.5	88 ± 7.0
K	21300 ± 2532	3623 ± 507	3700 ± 518	3226 ± 451
Biomasa reziduală				
Ni	$32,0 \pm 3,0$	708 ± 22	726 ± 39	730 ± 54
Fe	150 ± 33	512 ± 31	520 ± 2	534 ± 43
Cr	$10,5 \pm 3$	$54 \pm 2,4$	$56 \pm 4,6$	$60 \pm 3,7$
Zn	6.8 ± 1.1	79 ± 4.3	84 ± 5.2	88 ± 1.7
K	4501 ± 436	4505 ± 316	4475 ± 353	4507 ± 291

Datele din tabel demonstrează, că atât biomasa nativă, cât și cea reziduală de nostoc acumulează activ pe durata primelor 5 minute de contact cu metalele grele. Astfel, în biomasa nativă concentrația nichelului crește de 13,8 ori, iar în cea reziduală – de 22,1 ori. De asemenea, în biomasa de nostoc crește și concentrația celorlalte elemente monitorizate pe durata

experienței. În biomasa reziduală conținutul de fier cterște de 3,4 ori, cel de crom – de 5,1 ori, iar cel de zinc – de 11,6 ori.

Generalizând rezultatele analizate mai sus putem concluziona, că biomasa reziduală de *Nostoc linckia*, obținută în rezultatul extragerii componentelor antioxidante, este un biosorbent eficient pentru crom și nichel din apele reziduale contaminate cu metale grele. În paralel, biomasa acumulează și alte elemente poluante prezente în soluția de contact. Pornind de la faptul, că biosorbția în general este un proces biotehnologic ieftin, și ținând cont, că în acest subcapitol noi propunem utilizarea biomasei reziduale, care de fapt este un deșeu al producerii de bază, putem afirma, că o asemenea utilizare a nostocului este foarte rentabilă pentru includere în calitate de element al tehnologiilor de bioremediere a mediilor acvatice poluate cu metale grele.

4.3.2. Bioacumularea microcomponentelor metalice din soluții polimetalice

În cadrul proiectului bilateral ”Bioacumularea si recuperarea microcomponentelor metalice din șlamul rezultat la solubilizarea alcalină a uraniului din minereu, cu ajutorul cianobacteriilor si microalgelor” a fost studiată capacitatea culturilor de microalge și cianobacterii de a acumula ionii uranil din reziduurile industriei de prelucrare a minereului uranifer. În paralel a fost studiată compoziția complexă a apelor și a fost stabilit, că acestea, suplimentar la elementele radioactive mai conțin și metale simple în cantități ce depășesc substanțial dozele maximal admisibile. În cadrul proiectului au fost elaborate tehnologii de utilizare a biomasei native a microalgelor și cianobacteriilor pentru recuperarea microcomponentelor metalice din aceste ape. Pornind de la faptul, că procesul de biosorbție este pur chimic, de scurtă durată și poate derula atât pe culturi vii, cât și pe material organic neviu, în acest compartiment al lucrării am decis să evaluăm capacitatea de biosorbție a reziduului de biomasă de nostoc rămasă după extragerea componentelor bioactive cu efect antioxidant în soluții polimetalice, ce simulează după componență apele rezultate de la solubilizarea alcalină a uraniului. Variantele experimentale au conținut doar soluțiile sărurilor de metale, în care metalele sunt prezente în cantități echivalente celor, care au fost determinate în condiții reale.

Au fost efectuate experiențe în care a fost modificată durata de contact a biomasei reziduale cu soluția, ce conține microcomponente metalice. Contactul între soluțiile studiate și biomasa de nostoc a fost realizat prin adăugare la soluția de cercetat a biomasei reziduale de nostoc în cantitate de 10 g biomasă absolut uscată la un litru de soluție de cercetat. După expirarea timpului de contact biomasa reziduală de nostoc a fost separată de soluția reactantă.

Pentru a determina cantitatea de fier, 5g probă supusă cercetării s-a trecut într-un balon cotate cu capacitatea de 10 ml, dizolvat în 5 ml apă, volumul s-a adus la cotă cu apă și s-a

amestecat. 0,25 ml soluție obținută s-a trecut într-un pahar Berzelius din sticlă termorezistentă și s-a adăugat 0,5 ml de soluție HClO_4 de 57 % și 0,25 ml de HNO_3 concentrat, după care s-a încălzit la baie de nisip la o temperatură de 135°C timp de 2-3 ore, până când soluția a devenit transparentă. Pentru a oxida Fe(II) în Fe(III) , la soluția mineralizată s-a adăugat 0,2 ml HCl concentrat, 0,1 ml HNO_3 concentrat și 0,05 ml H_2O_2 de 30% și s-a amestecat. La proba oxidată s-au adăugat 3,0 ml soluție de HCl (1:1) și 1,0 ml soluție KSCN (20%) și s-au amestecat. Soluția colorată în roșu s-a citit la spectrofotometru la lungimea de undă 495 nm.

Cantitatea de Fe în preparat s-a determinat conform formulei :

$$\% \text{ Fe} = (A_x * 0,053) / (m_1 - W) * 100\% , \quad (10)$$

unde: A_x - absorbanta soluției de cercetat; m- masa preparatului, g; W- pierderea în masă la uscare,%; 0,053 – coeficient de recalcul a cantității de fier, obținut din curba de calibrare.

Construirea curbei de calibrare. Într-o serie de baloane cotate cu volumul de 10 ml s-au luat de la 0,25-3,5 ml soluție standard de $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ce conține Fe 0,02 mg/ml și s-au adăugat câte 3,0 ml soluție de HCl (1:1) și 1,0 ml soluție de KSCN de 20% și s-au amestecat. S-a restabilit volumul soluției din fiecare balon cotat, după care densitatea optică a probelor a fost determinată la lungimea de undă de 495 nm.

Pentru a determina cantitatea de zinc, biomasa reziduală de nostoc s-a resuspendat în apă distilată până la concentrația finală a biomasei de 10 g/l. Masa celulară s-a supus dezintegrării prin acțiunea ultrasunetului la o frecvență de 22 kHz, timp de 30 sec de 4 ori. Într-un pahar Berzelius din sticlă termorezistentă s-au luat 0,1 ml de biomasă dezintegrată, la care s-a adăugat 0,1 ml de soluție HClO_4 de 57 % și 0,1 ml de HNO_3 concentrat, apoi s-a încălzit la baie de nisip la o temperatură de 135°C timp de 80 min, până când soluția a devenit transparentă. După răcire la temperatura camerei proba s-a adus la un volum de 1 ml. După, la 1 ml de soluție supusă cercetării s-a adăugat în scopul separării zincului de ceilalți cationi prezenți în soluție 2 ml soluție de mascare constituită din: tampon acetat – tiosulfat (se prepară prin adăugarea la 1 ml soluție tampon acetat 2M cu pH 5 a 25 ml soluție de tiosulfat de sodiu de concentrație 50%). După ce s-a amestecat, s-a adăugat 2 ml soluție de ditizonă în tetraclorura de carbon de $5 \cdot 10^{-5}$ M cu conținut de ionol de 0.15% cu rol de agent de solubilizare pentru ditizonă în tetraclorura de carbon. Proba s-a agitat timp de un minut, după ce faza organică de culoare roșu-aprins s-a separat și citit la spectrofotometru utilizând lungimile de undă, respectiv: 538 nm pentru ditizonatul de zinc și 620 nm pentru ditizonă pură (pondere de participare). Utilizarea celor două lungimi de undă: maximumul de la 538 nm și cel de la 620 nm pentru stabilirea ponderii de participare a ditizonei a permis determinarea ditizonatului de zinc împreună cu ditizona.

Calculul cantității de zinc (mg/%) s-a efectuat în baza relației:

$$C^{Zn}(mg\%) = [A_{538}^{extract} - K A_{620}^{extract}] \cdot 100 / 33,3 \cdot m \quad (11)$$

unde: $A_{538}^{extract}$ - este densitatea optică a extractului la lungimea de undă 538 nm;

$A_{620}^{extract}$ - este densitatea optică a extractului la lungimea de undă 620 nm;

K – este constanta ce reprezintă raportul dintre densitatea optică la 538 nm și 620 nm pentru ditizonă pură (ponderea de participare); 33,3 - este coeficientul de recalcul al cantității de zinc, determinat din valorile seriei de diluții ale soluției-etalon de zinc în 0,3NHCl ce conține zinc în concentrația de 10mcg/cm³, preparată dintr-o soluție ZnCl₂ de 0,01%; m – masa probei luată pentru determinare în g.

Pentru a determina cantitatea de crom, într-o retortă Kjeldalh de 100cm³ s-au luat 0,5 ml biomasă cu concentrația de 10 g/dm, dezintegrată în prealabil sub acțiunea ultrasunetului de 22 kht/min, timp de 5 min., la care s-au adăugat 0,5 ml soluție HClO₄ 57% și 0,25 ml soluție HNO₃ concentrat apoi s-au supus mineralizării pe baia de nisip la o temperatură de 135 timp de 20-30 min. până când soluția a devenit transparentă, încălzirea a fost continuată încă 5-10 min până la evaporarea completă a soluției. Restul uscat s-a dizolvat în 10 ml în soluție (NH₄)₂S₂O₈ de 0,2%, s-a adăugat 1, 2 picături soluție H₂SO₄ și s-a fiert pe baia de apă timp de 30 min. Apoi s-au adăugat 0,2 ml soluție H₂SO₄ 2N, 0,2 ml soluție 0,1% difenilcarbazidă în alcool etilic de 96% și s-a agitat bine. După 15 min soluția colorată în roz-violet a fost determinată spectrofotometric la lungimea de undă 540 nm în cuve de 10 mm. Calculul cantității de Cr în mg/ml s-a efectuat după formula:

$$C = A_{540} \cdot k \quad (12)$$

unde: A - absorbanta probei la 540 nm; k - coeficientul de recalcul a cantității de crom determinat din curba de etalonare, utilizând K₂Cr₂O₇ în calitate etalon.

Cantitatea de cupru s-a determinat prin reacția de formare a compusului complex a cuprului cu reactivul dietilditiocarbamat de natriu de culoare galbenă. La 25 ml probă (care conține mai puțin de 0,1 mg cupru) s-au adăugat consecutiv: 8,0 ml citrat de natriu (50%); 1,25 ml trilon B (3%); 2,5 ml NH₄OH (25%); 0,63 ml gelatină (0,5%) (proaspăt pregătită); 2,5 ml dietilditiocarbamat de natriu (0,1%). După s-a determinat densitatea optică la 453 nm. Cantitatea de cupru s-a determinat după curba de calibrare.

Acumularea fierului (III) în biomasa reziduală de nostoc în dependență de perioada de contact poate fi urmărită pe Figura 4.16, în care bioacumularea este exprimată în procent din valoarea maximală obținută în seria dată de experiențe.

Din imagine se observă, că pe durata a primelor 5 min de contact a biomasei cu soluția ce conține metale, are loc o creștere constantă a părții de metal absorbit de către biomasă. Valoarea maximală a fierului acumulat în biomasă se atinge la 15 min de contact cu biomasa reziduală de nostoc. Contactul de mai departe a biomasei reziduale de nostoc cu soluția hidrică cu conținut de metale.

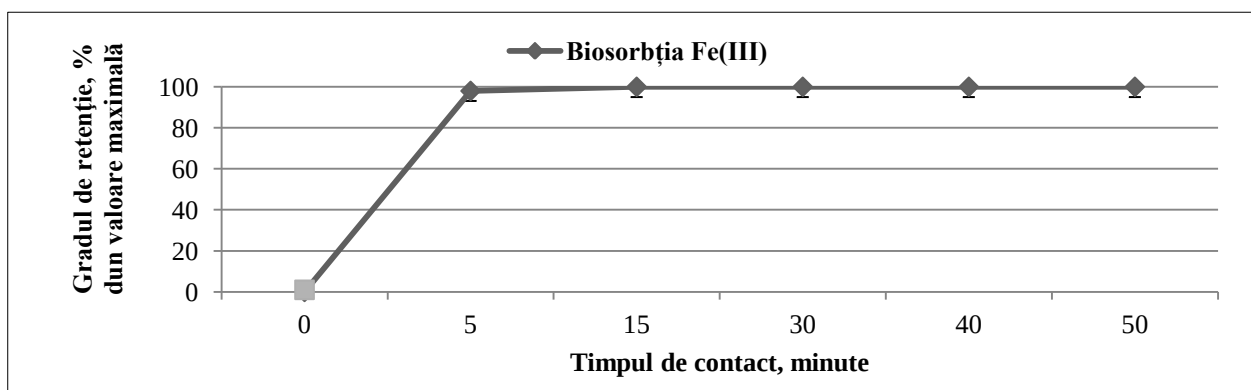


Fig. 4.16. Biosorbția Fe(III) în biomasa reziduală de nostoc în dependență de timpul de contact cu soluția de simulare.

Sorbția zincului se produce aproximativ la fel ca și acumularea fierului. Astfel, durata creșterii lente a cantității de zinc adsorbită de biomasa reziduală de nostoc este de 5 min. Cantitatea maximală a zincului acumulat înregistrându-se la 15 min de contact cu biomasa reziduală de nostoc (Figura 4.17).

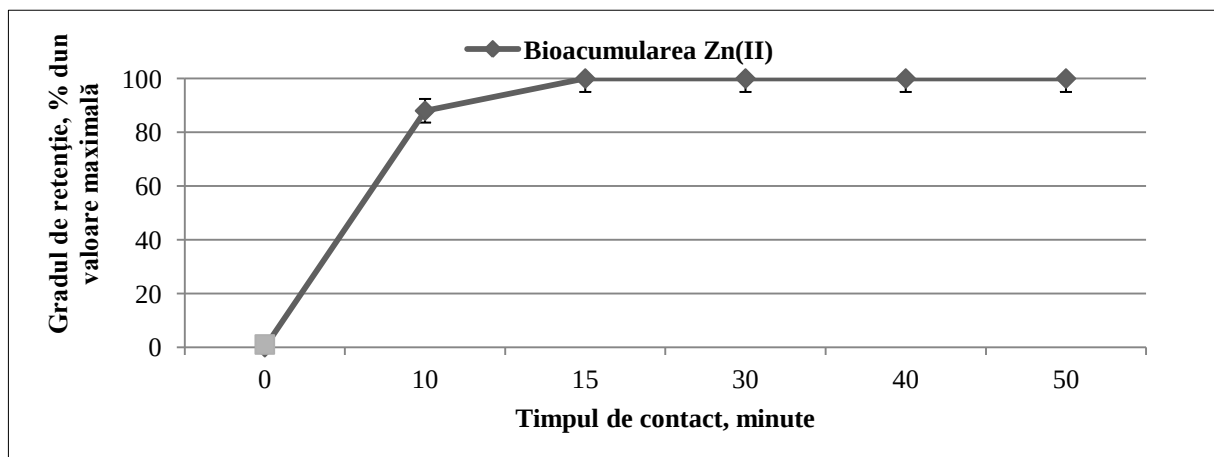


Fig. 4.17. Biosorbția Zn(II) în biomasa reziduală de nostoc în dependență de timpul de contact cu soluția de simulare.

Graficul care reflectă procesul de biosorbție a cromului (III) este asemănător ca formă cu cel care reflectă biosorbția fierului și zincului, maximum de retenție fiind înregistrat la 15 min contact cu biomasa reziduală de nostoc (Figura 4.18).

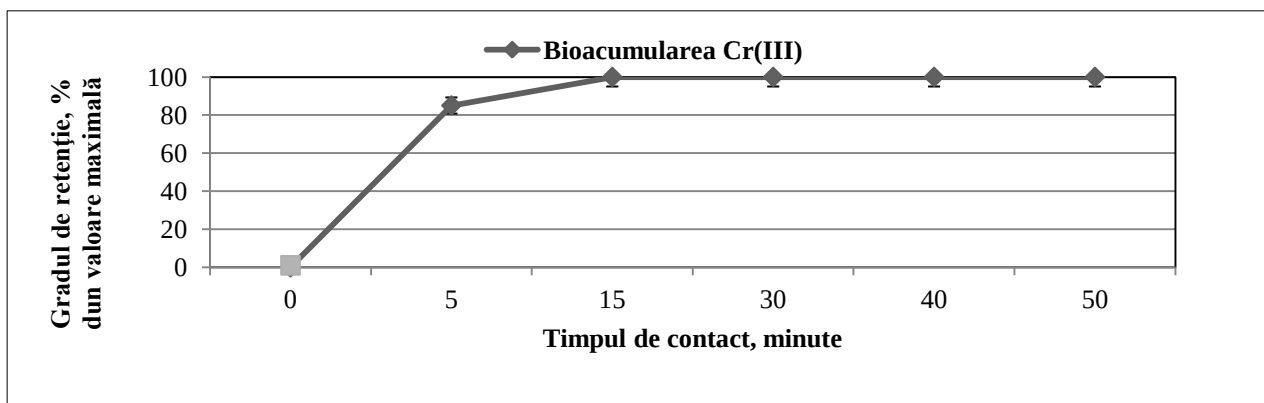


Fig. 4.18. Biosorbția Cr(III) în biomasa reziduală de nostoc în funcție de timpul de contact cu soluția de simulare.

Biosorbția cromului de către biomasa reziduală de nostoc atinge valoarea maximală deja la 15 min de contact și se prezintă a fi la fel de eficientă ca și bioacumularea elementelor studiate anterior la contactul de scurtă durată cu nostocul.

Procesul de biosorbție a Cu(II) este reflectat pe Figura 4.19.

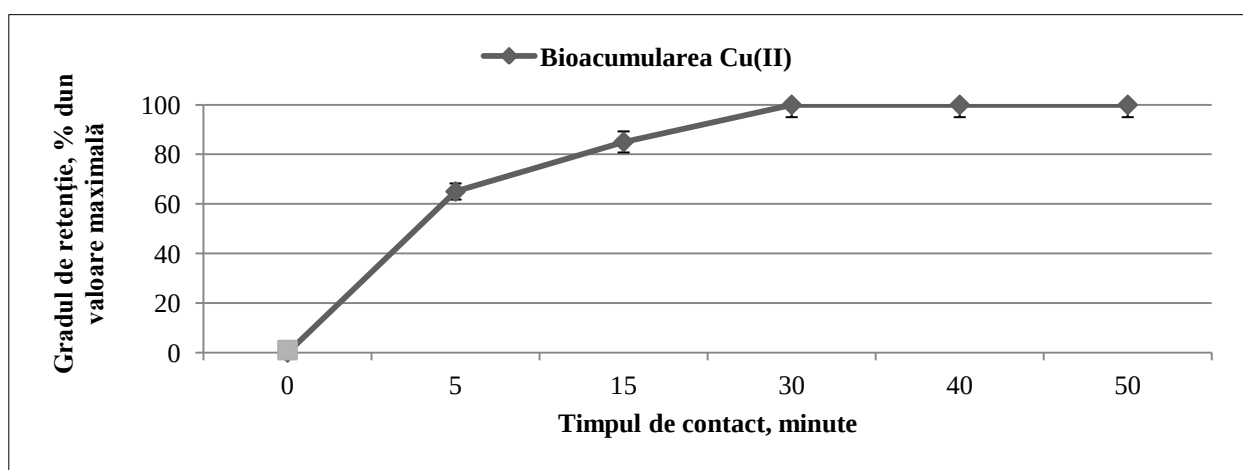


Fig. 4.19. Biosorbția Cu(II) în biomasa reziduală de nostoc în dependență de timpul de contact cu soluția de simulare.

Astfel, procesul de recuperare a ionilor de Cu^{2+} decurge mai lent, comparativ cu alte microelemente metalice studiate, atingând maximul de intensitate la 30 min de la punerea în contact a soluției cercetate cu biomasa de nostoc.

Din datele Tabelului 4.7, se poate deduce că cel mai înalt nivel de retenție se determină, pentru Cu(II). Pentru acest element biomasa reziduală de nostoc asigură acumularea a circa 90% din cantitatea prezentă în soluția reactantă, la timpul de contact de 15-30 min.

Tabelul 4.7. Conținutul de metale în soluție până la și după contactul cu biomasa reziduală de nostoc

Metalul	Concentrația inițială, mg/l	Concentrația finală, mg/l	Nivelul de recuperare, %	Timpul util de contact, min
Fe(III)	3190±322	1238±215	61,2	15
Zn(II)	88,6±2,2	24,20±1,9	72,7	15
Cr(III)	75,8±4,3	23,40±2,4	69,1	15
Cu(II)	148,4±24,6	20,84±0,2	85,9	30

În baza rezultatelor obținute a fost elaborat un regulament de recuperare a microcomponentelor metalice din soluții hidrice, care include două etape:

- ✓ Obținerea biomasei reziduale;
- ✓ Recuperarea microcomponentelor metalice prin contactul direct al biomasei reziduale de *Nostoc linckia* cu soluția ce conține microcomponentele metalice.

Contactul între soluțiile contaminate și biomasa reziduală de nostoc se face prin adăugare la soluția contaminată a biomasei reziduale de nostoc în cantitate de 10g biomasă absolut uscată la un litru de soluție. Timpul de contact este de 30 min, deoarece el asigură o retenție maximală a fierului (III), zincului (II), cromului (III) și a cuprului (II). După expirarea timpului de contact biomasa de nostoc se filtrează.

Așa dar, procedeul de bioacumulare și recuperare a microcomponentelor metalice de biomasă reziduală de *Nostoc linckia*, asigură conform regulamentului elaborat, acumularea în biomasă a 61,2% din fier (III), 72,7% din zinc (II), 69,1% din crom (III) și 85,9% din cupru (II) prezente în soluția contaminată.

4.4. Tehnologia complexă de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia*, de obținere a preparatelor antioxidante și de utilizare a reziduului de biomasă

Rezultatele investigațiilor expuse în această lucrare au permis a integra toate componentele și operațiunile tehnologice într-un flux tehnologic complex de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia*, de obținere a preparatelor antioxidante din biomasa acesteea și de utilizare a reziduului de biomasă.

Componenta tehnologica principală în cadrul fluxului tehnologic integrat elaborat este redată de procedeele de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* care permit obținerea cantității maxime de biomasă cu un statut antioxidant înalt. În expunerea rezultatelor acestei lucrări s-a

demonstrat că atingerea acestui obiectiv este posibilă datorită utilizării unor compuși coordinativi noi: 1-($\Delta^{8,13}$ -Biciclohomo-farnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol și N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenolamino) carbazol, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (unde L1 - hidrazida acidului izonicotinic) și $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (unde L2 - hidrazida acidului inicotinic), compuși care suplimentați la mediul de cultivare al nostocului asigură creșterea potențialului antioxidant al biomasei acestei cianobacterii.

Cea de a doua componentă a fluxului tehnologic este redată de etapele de obținere din biomasa de nostoc cu un potențial antioxidant înalt a noilor preparatelor antioxidante. Aceste etape includ extragerea componentelor antioxidante din biomasă, standardizarea și condiționarea preparatelor NostocAntiOx-1, NostocAntiOx-2, NostocAntiOx-3 și NostocAntiOx-4.

Cea de a treia componentă tehnologică reprezintă biomasa reziduală care rezultă din primele două etape tehnologice de obținere a biomasei și a complexelor antioxidante și constituie un agent eficient de purificare a apelor reziduale cu conținut de metale, asigurând recuperarea componentelor metalice: fier (III), zinc (II), crom (III) și cupru (II), precum și o matrice conformă pentru biosinteza nanoparticulelor de argint.

Astfel, rezumativ principiile tehnologice care asigură eficacitatea acestor etape sunt:

- Utilizarea în calitate de producător a tulpinii cianobacteriei *Nostoc linckia* CNM-CB-03.
- Mediul nutritiv pentru cultivarea tulpinii cianobacteriei *Nostoc linckia* CNM-CB-03 care asigură necesitățile fiziologice a culturii pentru o creștere și dezvoltare și respectiv, producere bună de biomasă cianobacteriană;
- Aplicarea metodelor de intensificare a statutului antioxidant al biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia* CNM-CB-03 prin utilizarea compusului 1-($\Delta^{8,13}$ -Biciclohomo-farnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol în cantitate de 0,05-0,06mg/l; a compusului N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenolamino) carbazol în cantitate de 0,06-0,1mg/L; a compusului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (unde L1 - hidrazida acidului izonicotinic) în cantitate de 15 mg/L și a compusului $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (unde L2 - hidrazida acidului inicotinic), în cantitate de 20 mg/L.

Caracteristica producătorului: Cianobacteria *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flah. CNM-CB-03 formează trihomi rectilinii sau curbați, solitari sau reuniți în mănunchiuri flotante, iar pe mediul agarizat formează colonii gelatinoase în care trihomii sunt dispuși dens sau lax. Trihomii sunt înconjurați de o teacă mucilaginoasă incoloră. Celulele vegetative au formă de butoiașe cu lungimea de 4,0-5,0 μ , de culoare albastră - verzuie cu nuanță cafenie slab pronunțată. Sunt prezenți heterociștii, de obicei intercalari, mai rar terminali, solitari, aproape sferici, de 6,5-7,5 μ

în diametru. Se înmulțește prin spori, hormogonii și fragmentarea trihomilor. Se reproduc numai indivizii maturi, dar și reprezentanții aflați la etapele intermediare de dezvoltare, formarea achinetelor observându-se chiar și în mugurii tineri ai hormogoniilor. În mugurirea achinetelor provoacă un nou ciclu de dezvoltare, care poate demara imediat sau după o perioadă de repaos. Tulpina poate fi păstrată și pe mediul mineral lichid la o iluminare de zi și la temperatura camerei, reinocularea culturii efectuându-se peste 2 luni. Biomasa uscată de *Nostoc linckia* (Roth), cultivată pe mediul Gromov 6, conține proteină – 15-25%, polizaharide – 35-50%, ficoeritrină – 2,0-4,0%, ficocianină – 0,5-1,0%, aloficocianină – 0,5-1,0%, lipide 2%, caroten – 0,2-0,4%, xantofile -0,4-0,7%.

Etapele de producere a biomasei de nostoc și de obținere a preparatelor antioxidante sunt redate grafic de Figurile 4.20 și 4.21. Etapele procesului de recuperare a microcomponentelor metalice prin utilizarea biomasei reziduale de *Nostoc linckia* rezultată din primele două etape de producere a biomasei și a preparatelor antioxidante sunt redate grafic de Figura 4.22.

Astfel, etapele tehnologice de producere a biomasei de nostoc, de extragere a complexului antioxidant se derulează în succesiunea următoare:

1. Procesul tehnologic de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* în scopul obținerii biomasei cu un statut antioxidant înalt include realizarea procedurilor operaționale:

- Prepararea mediului nutritiv MN-1 cu următoarea compoziție: macroelemente: g/l: KNO_3 – 1,0, K_2HPO_4 – 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, CaCl_2 – 0,15, NaHCO_3 – 0,2; microelemente, mg/l: soluția 1- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22, MnSO_4 – 1,81, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,079, soluția 2 - $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2,63, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9,3, CaCl_2 – 1,2, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,02, EDTA – 10,0. 0,05; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; H_3BO_3 - 0,6; MoO_3 - 0,02. În cazul compușilor 1-2 compusul cu fier se exclude.

- Introducerea vectorilor de creștere a potențialului antioxidant al biomasei:

1. compusul coordinativ 1-($\Delta^{8,13}$ -Biciclohomo-farnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazol în cantitate de 0,050-0,060mg/l suplimentat în prima zi de cultivare;

2. compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino) carbazol în cantitate de 0,06-0,1mg/l adăugat în prima zi de cultivare;

3. compusul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (unde L^1 - hidrazida acidului izonicotinic) în cantitate de 15 mg/L adăugat în prima zi de cultivare;

4. compusul $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{L}^2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (unde L^2 - hidrazida acidului inicotinic), în cantitate de 20 mg/L adăugat în prima zi de cultivare.

- Inocularea suspensiei de nostoc în concentrație de 0,20-0,30g/l recalcul la biomasa absolut uscată;

- Cultivarea nostocului în fotobioreactor cu capacitatea de 50L volum cultură cianobacteriană cu menținerea parametrilor: temperatura – 20-25⁰C, iluminarea constantă – 2000-3000 lx și pH-ul-6,8-7,2;

- Separarea culturii de nostoc de mediul de cultură cu obținerea biomasei și standardizarea ei la concentrația de 50g/l.

2. Procesul tehnologic de obținere a preparatelor antioxidante NostocAntiOx-1 și NostocAntiOx-2 din biomasa de nostoc include realizarea procedurilor operaționale:

- Adăugarea la biomasa de nostoc a principiului extractant de componente antioxidante: alcool etilic de 70% în raport de 1:2v/v;
- Extragerea complexului de componente antioxidante din biomasa de nostoc prin agitare timp de 6 ore la întuneric;
- Centrifugarea complexului hidro-etanolic la 3000 rot/min timp de 15 min;
- Colectarea complexului hidro-etanolic de componente antioxidante;
- Standardizarea complexului hidro-etanolic la concentrația de 1,0%;
- Condiționarea complexului hidro-etanolic de componente antioxidante;
- Liofilizarea complexului de componente antioxidante.

În rezultatul acestor două procese tehnologice se obțin două noi preparate antioxidante: preparatul **NostocAntiOx-1** cu o capacitate de inhibiție a radicalului DPPH la nivelul de 60-67% și preparatul **NostocAntiOx-2** cu o capacitate de inhibiție a radicalului DPPH la nivelul de 71-76%.

3. Procesul tehnologic de obținere a preparatelor antioxidante NostocAntiOx-3 și NostocAntiOx-4 din biomasa de nostoc include realizarea procedurilor operaționale:

- Congelarea-decongelarea repetată a biomasei de nostoc în scopul facilitării extragerii hidrice a componentelor antioxidante
- Adăugarea la biomasa de nostoc a principiului extractant de componente antioxidante: apă distilată în raport de 1:2v/v;
- Extragerea antioxidanților din biomasa de nostoc prin agitare timp de 6 ore la întuneric;
- Centrifugarea complexului hidric de la 3000 rot/min timp de 15 min;
- Colectarea complexului hidric de componente antioxidante;
- Standardizarea complexului hidric de componente antioxidante la concentrația de 1,0%;
- Condiționarea complexului hidric de componente antioxidante;
- Liofilizarea complexului de componente antioxidante.

În rezultatul acestor două procese tehnologice se obțin două noi preparate antioxidante: preparatul **NostocAntiOx-3** cu o capacitate de inhibiție a radicalului cation ABTS la nivelul de 80-83% și preparatul **NostocAntiOx-4** cu o capacitate de inhibiție a radicalului cation ABTS la nivelul de 90-95%.

4. Procesul tehnologic de recuperare a microcomponentelor metalice prin utilizarea biomasei reziduale de *Nostoc linckia* include realizarea procedurilor operaționale.

- Prepararea sistemului reactant: “biomasă + soluție reactantă” prin adăugarea reieșind din cantitatea de 10g biomasă reziduală absolut uscată a 1,0 litru de soluție reactantă;
- Menținerea contactului maxim al biomasei reziduale de nostoc cu soluția reactantă prin agitare timp de 30 min;
- Separarea reziduului de biomasă de soluția reactantă prin centrifugare ori filtrare;
- Controlul calității filtratului și deversarea în caz de necorespondere normelor sanitare sau recuperare repetată în caz contrar.

Respectarea condițiilor tehnologice a procesului asigură un randament de recuperare la nivelul a 61,2% din fier (III), 72,7% din zinc (II), 69,1% din crom (III) și 85,9% din cupru (II)

5. Procesul tehnologic de biosinteză a nanoparticulelor de argint utilizând în calitate de matrice biomasa reziduală de nostoc include:

- Standardizarea biomasei reziduale la concentrația de 50 mg/ml;
- Prepararea soluției standard de AgNO_3 cu concentrația de 100mg/L.
- Prepararea sistemului reactant de contact: soluție de AgNO_3 + biomasă de nostoc. La 10 ml biomasă standardizată se adaugă 100 ml soluție standard de azotat de argint.
- Incubarea sistemului reactant plasat pe un agitator orbital setat la viteza de rotație de 200 rotații/min, la temperatura camerei timp de 24 ore;
- Prelevarea probelor de biomasă pentru aprecierea procesului de biosinteză a nanoparticulelor prin înregistrarea spectrului de absorbție.
- Separarea biomasei reziduale cu nanoparticule prin centrifugare și stocarea ei pentru utilizarea ulterioară.

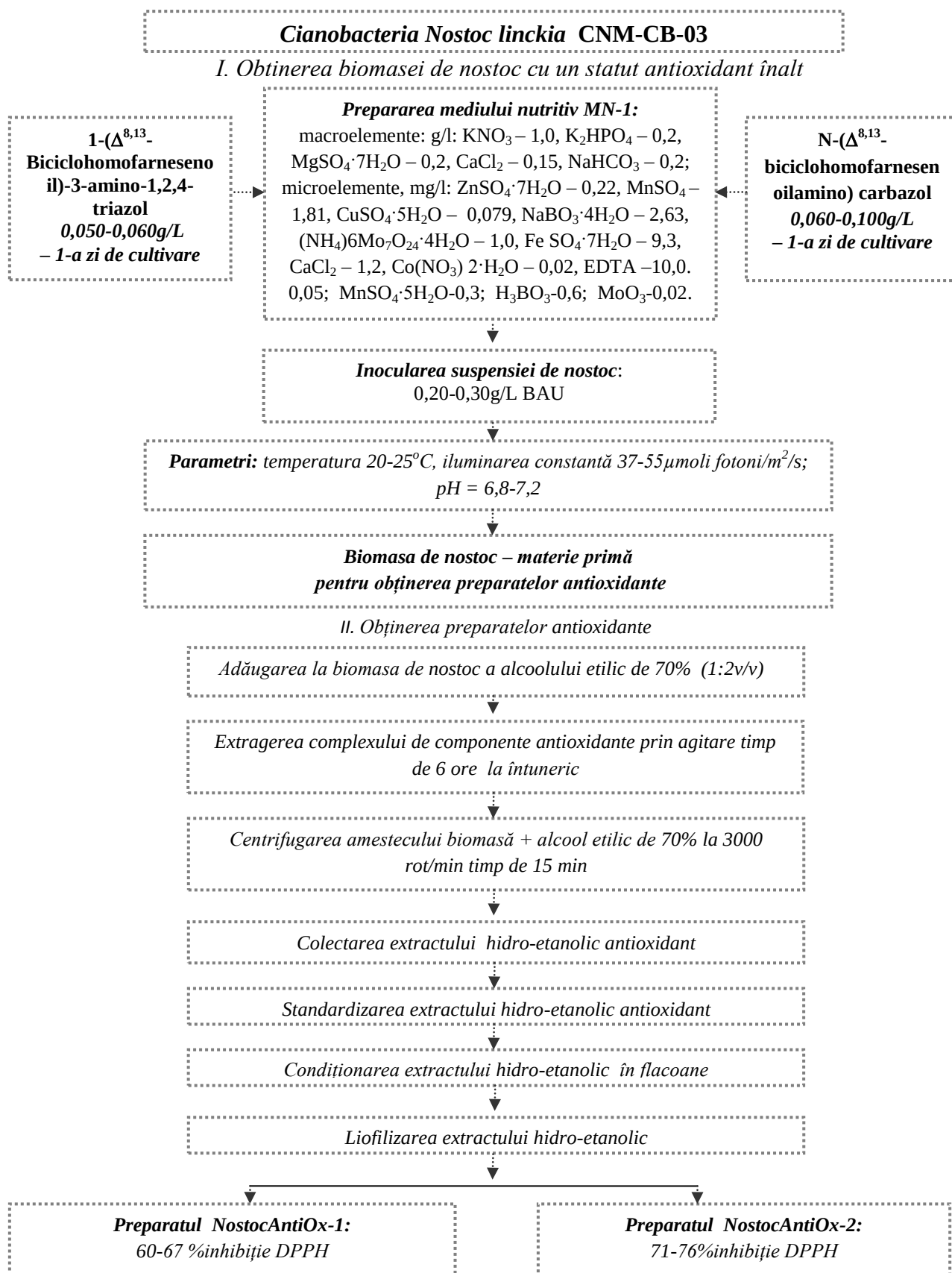


Fig. 4.20. Schema realizării tehnologiei complexe de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* și de obținere a preparatelor antioxidante *NostocAntiOx-1* și *NostocAntiOx-2*.

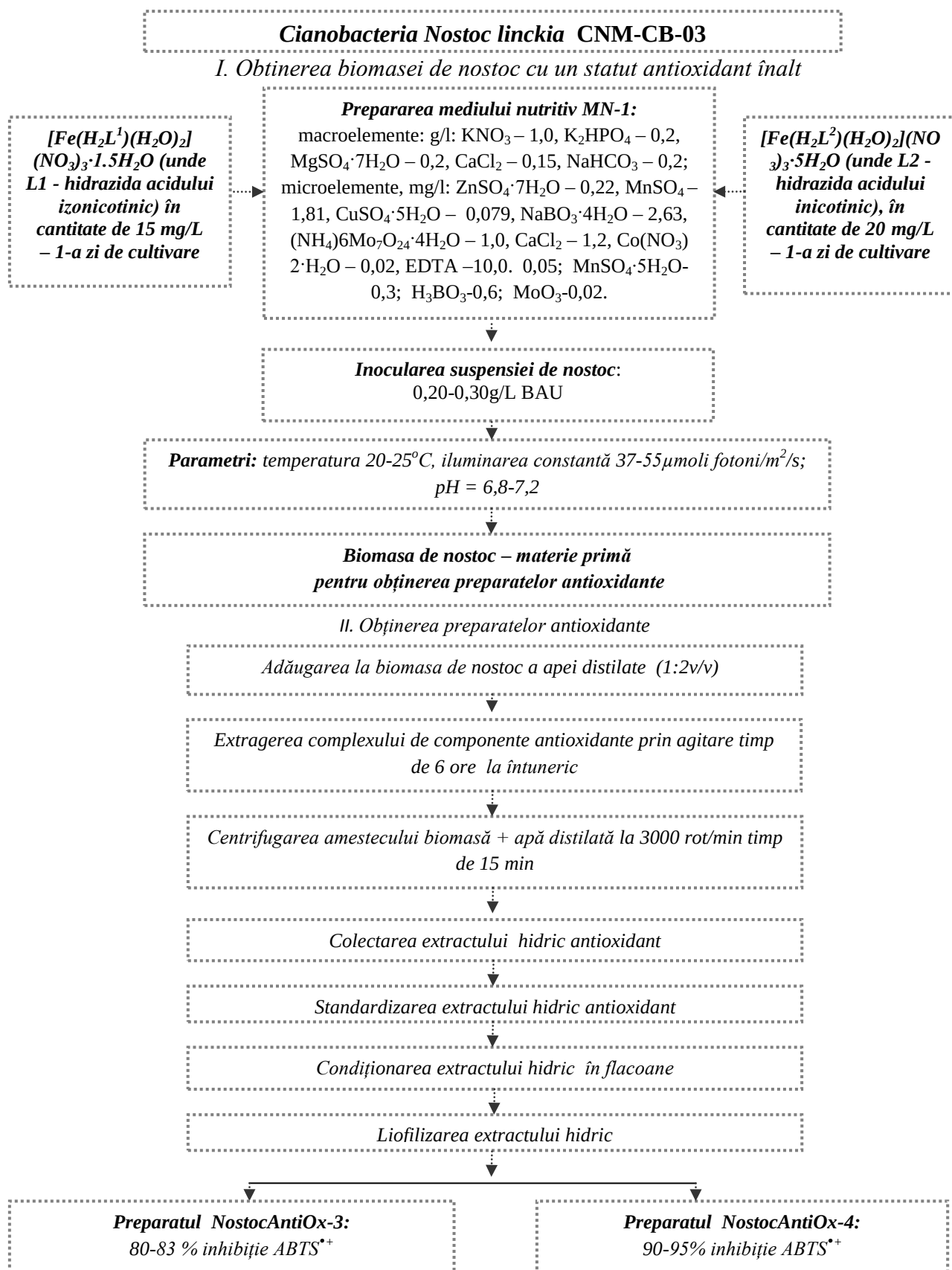


Fig. 4.21. Schema realizării tehnologiei complexe de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* și de obținere a preparatelor antioxidante *NostocAntiOx-3* și *NostocAntiOx-4*.

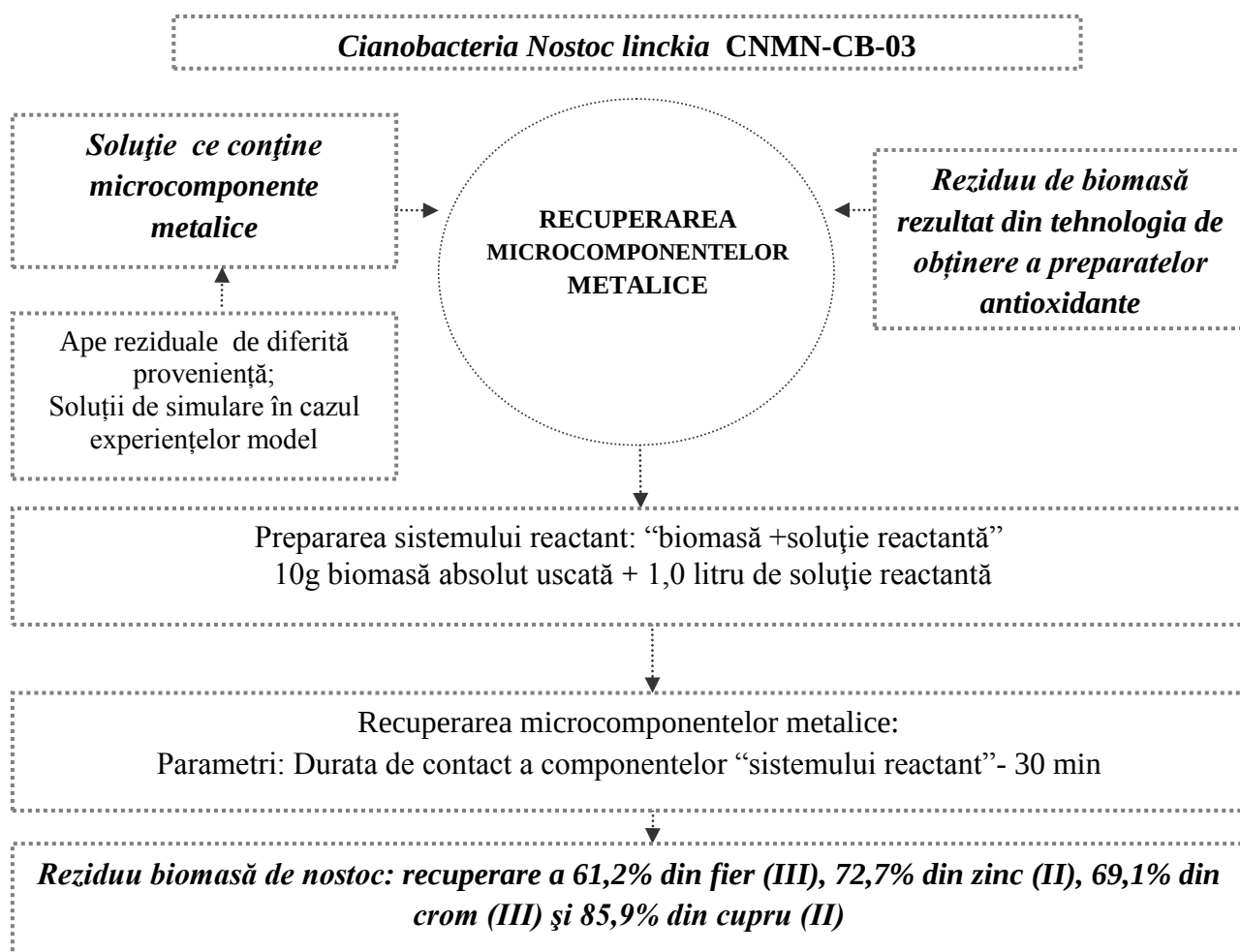


Fig. 4.22. Schema realizării procesului de recuperare a metalelor din șlamul rezultat la solubilizarea alcalină a uraniului prin aplicarea oxidării preventive.

4.4. Concluzii la capitolul 4

1. Compușii fierului cu bazele Schiff care au în componența ligandului hidrazidele acidului nicotinic și izonicotinic asigură o creștere semnificativă a activității antioxidante a biomasei, aceasta, în mare măsură, determinată de sporirea conținutului de ficobiliproteine, care constituie una din componentele majore ori chiar dominante a extractului hidric din biomasa de nostoc.
2. Proprietățile noilor compuși 1-($\Delta^{8,13}$ -Biciclohomo-farnesenol)-3-amino-1,2,4-triazolul și N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenol-amino)carbazolul prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulatori ai activității antioxidante a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*, măbind activitatea antioxidantă (extract hidro-etanolic) de 2,11-2,73 ori față de martor.
3. Biomasa reziduală de *Nostoc linckia* obținută după extragerea componentelor antioxidante poate fi utilizată în calitate de matrice pentru sinteza nanoparticulelor de argint.

4. Biomasa reziduală de *Nostoc linckia*, obținută în rezultatul extragerii componentelor antioxidante, este un biosorbent eficient pentru crom și nichel din apele reziduale contaminate cu aceste metale grele.
5. Biomasa reziduală a cianobacteriei *Nostoc linckia*, obținută în rezultatul tehnologiilor de obținere a complexelor antioxidante se prezintă în calitate de agent de purificare a apelor reziduale cu conținut de metale, asigurând acumularea în biomasă a 61,2% din fier (III), 72,7% din zinc (II), 69,1% din crom (III) și 85,9% din cupru (II).
6. Cele 4 noi preparate antioxidante: NostocAntiOx-1, NostocAntiOx-2, NostocAntiOx-3 și NostocAntiOx-4 se obțin conform unei biotehnologii originale complexe și promovează o capacitate de inhibiție înaltă a radicalilor liberi.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Realizarea cercetărilor și analiza rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctor „**Biotehnologia cultivării sursei de antioxidanți – cianobacteria *Nostoc linckia***” au condus la formularea următoarelor concluzii:

1. Modificările cantitative ale principalelor componente ale biomasei de nostoc pe durata ciclului vital se înscriu în limite destul de restrânse, ceea ce caracterizează *Nostoc linckia* ca o cultură cu grad ridicat al homeostaziei, ceea ce ușurează semnificativ manipularea culturii în condiții industriale și simplifică procedurile din cadrul tehnologiilor aplicate.

2. Cei mai stabili parametri pentru cultura de nostoc în condiții de laborator se obțin la începutul fazei staționare. Această perioadă se caracterizează prin cel mai înalt nivel al biomasei, cea mai stabilă activitate antiradicalică și antioxidantă și nivel jos al dialdehidei malonice, de aceea este recomandată pentru colectarea biomasei în scopul obținerii preparatelor antioxidante cu un grad înalt de siguranță.

3. Extractele hidrice și hidro-etanolicе cu conținut scăzut de etanol din biomasa de nostoc se caracterizează prin activitate antiradicalică pronunțată, iar stabilitatea lor poate fi asigurată de cantități minime de trolox ori acid ascorbic.

4. Stabilitatea extractelor hidro-etanoloce cu conținut înalt de etanol poate fi asigurată prin aplicarea tocoferolului.

5. Complexul antioxidant obținut prin extragere etanolică din biomasa de nostoc are capacitatea de a proteja uleiurile vegetale (în special de in și porumb) de oxidarea agresivă, indusă de condițiile de păstrare. Implicarea componentelor antioxidante din biomasa de nostoc în procesul de protecție oxidativă este susținută de testele antioxidante nespecifice care au demonstrat creșterea activității antioxidante a uleiurilor vegetale suplimentate cu complex antioxidant din nostoc.

6. Cultura de *Nostoc linckia* se caracterizează printr-un prag înalt de sensibilitate la acțiunea xenobioticelor, de aceea modificarea statutului antioxidant al biomasei poate fi realizată prin influența unor compuși cu potențial toxic înalt.

7. Compușii fierului cu bazele Shiff care au în componența ligandului hidrazidele acidului nicotinic și izonicotinic asigură o creștere semnificativă a activității antioxidante a biomasei, aceasta, în mare măsură, determinată de sporirea conținutului de ficobiliproteine, care constituie una din componentele majore ori chiar dominante a extractului hidric din biomasa de nostoc.

8. Proprietățile noilor compuși 1-($\Delta^{8,13}$ -Biciclohomo-farnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazol și N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil-amino)carbazolul prezintă interes pentru biotehnologia

cianobacteriei *Nostoc linckia* în calitate de stimulatori al activității antioxidante a biomasei, măbind activitatea antioxidantă a extractului hidro-etanolic de 2,11-2,73 ori față de martor.

9. Biomasa reziduală de *Nostoc linckia*, poate fi utilizată în calitate de matrice pentru procesul de biosinteză a nanoparticulelor de argint și ca biosorbent eficient pentru metalele grele în sisteme policomponente, ceea ce oferă soluții originale pentru realizarea tehnologiilor de remediere a mediului ambiant.

10. Tehnologia complexă de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* este bazată pe cunoașterea și aplicarea particularităților și necesităților specifice ale culturii, componentele ce asigură obținerea preparatelor antioxidante și este orientată spre siguranță și stabilitate, iar componentele de utilizare a biomasei reziduale în scopul bioremedierii mediului transformă această tehnologie în una durabilă și prietenoasă mediului.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare constă în identificarea elementelor-cheie a procesului biotehnologic de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu scopul producerii preparatelor cu efect antioxidant și valorificării reziduului de biomasă.

Aportul personal: În materialele care reflectă conținutul brevetelor de invenție autoarei îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor. Toate celelalte rezultate obținute, analiza lor, generalizările și concluziile aparțin autoarei.

Recomandări practice

1. Se recomandă utilizarea cianobacteriei *Nostoc linckia* în calitate de sursă ieftină și sigură de substanțe cu efect antioxidant.

2. Se recomandă utilizarea biomasei reziduale de nostoc, rămasă de la extragerea antioxidantilor în calitate de biosorbent eficient pentru metalele grele și ca matrice pentru sinteza nanoparticulelor de argint.

3. Se recomandă utilizarea preparatelor elaborate pentru prevenirea rănecizirii uleiurilor vegetale prețioase.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Este oportun de a realiza testarea *in vivo* a acțiunii preparatelor antioxidante și antiradicalice elaborate.

2. Este indicată elaborarea preparatelor în baza polizaharidelor sulfatate din biomasa de *Nostoc linckia*

BIBLIOGRAFIE

1. Brevet de invenție MD 4253 C1, MD, C07F15/06. Sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat și procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia / Rudic V., Danilescu O., Bulhac I., Cepoi L., Rudi L., Bologa O., Rija A., Miscu V., Chiriac T., **Valuța A.** (MD). Cererea depusă 11.05.2012, BOPI nr.10/2013.
2. Brevet de invenție MD 4326 B1, MD, C07D 209/86. Compusul N-(D^{8,13} -biciclohomofarnesenoilamino)carbazol și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia / Cucicova C., Rudic V., Arîcu A., Cepoi L., Rudi L., Secara E., **Valuța A.**, Barbă A., Miscu V., Vlad P., Chiriac T. (MD). Cererea depusă 22.10.2013,
3. Brevet de invenție MD 4327 B1, MD, C07D 249/14. Compusul 1-(D^{8,13} -biciclohomofarnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazol și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia / Cucicova C., Rudic V., Arîcu A., Cepoi L., Rudi L., Secara E., **Valuța A.**, Barbă A., Miscu V., Chiriac T. (MD). Cererea depusă 22.10.2013.
4. Brevet de invenție MD 146 Z, MD, C12N 1/12. Procedeu de extragere a astaxantinei din biomasa de *Haematococcus pluvialis*. Brevet/ Miscu V., Cepoi L., Rudi L., Cojocari A., Rudic V. (MD) Cererea depusă 09.09.2009.
5. Cepoi L. Pigmenții fotosintetici la *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus. In: Academos. 2014, vol. 4(35), p.116-120.
6. Cepoi, L. Statutul antioxidant în corelare cu componența biochimică a biomasei unor microalge în condiții de tehnologii intensive. In: V International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”. Chișinău, Moldova, November 3-5, 2014, p. 30-37.
7. Costache T. A. Investigarea potențialului de utilizare a populației autohtone de microalge pentru obținerea de biocombustibili: Rezumatul tezei de doctorat. București 2013, 32 p.
8. Iațco Iu. Tehnologii de obținere a preparatelor lipidice din biomasa algei verzi *Dunaliella salina*: Autoref. tezei dr. șt. biologice. Chișinău, 2012, 29 p.
9. Miscu V. Biotehnologii de obținere a preparatelor pe bază de astaxantină din *Haematococcus pluvialis*: Autoref. tezei dr. șt. biologice. Chișinău, 2010, 28 p.
10. Rudi L., Cepoi L., Miscu V., Chiriac T., **Valuța A.**, Djur S., Sadovnic D., Rudic V. Determinarea dependenței corelaționale dintre valorile testului ABTS și conținutul de carotenoizi în extractele etanolicе din biomasa algei verzi *Haematococcus pluvialis*. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, nr.3(321), p. 146-153.
11. Rudi L., Cepoi L., Miscu V., Chiriac T., **Valuța A.**, Codreanu S., Sadovnic D., Rudic V. Producerea de biomasă și carotenoizi de către alga verde *Haematococcus pluvialis* pe durata ciclului vital sub influența metalocomplexelor Co (II) cu bazele Schiff. În: Buletinul AȘM, Științele vieții. 2014, nr. 2 (323), p.163-171.
12. Rudic V. și alții. Ficobiotehnologie-cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău: Elena V.I., 2007. 364 p.
13. Rudic V., și alții. Evaluarea capacității unor remedii naturiste de a contracara oxidarea lipidelor *in vitro*. In: Medicina alternativă. 2010, vol.15, p.16-24.
14. Sadovnic D., Cepoi L., Rudi L., **Valuța A.**, Chiriac T., Codreanu S., Miscu V., Cojocari A. Activitatea antioxidantă a preparatului etanolic în baza biomasei de *Porphyridium*

- cruentum*. In: V International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”. Chişinău, Moldova, November 3-5, 2014, p. 89-94.
15. Sadovnic D. Tehnologii de obținere a preparatelor antioxidante și antiradicalice din biomasa algei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01. Teză de dr. în biologie. Chişinău, 2014, 159 p.
 16. **Valuța A.** Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice din biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia* CNM CB-03. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2014, nr. 1(322), p. 133-139.
 17. **Valuța A.** Activitatea antiradicalică a extractelor din cianobacteria *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, nr. 3(322), p.154-167.
 18. Abdulqader G. et al. *Arthrospira platensis* from lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. In: J. Appl. Phycol. 2000, Vol. 12, p. 493–498.
 19. Acien F. G., Fernandez Sevilla J.M., Molina Grima E. Photobioreactors for the production of microalgae. In: Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2013, vol.12, p.131-151.
 20. Acien F.G. et al. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. In: Biotechnol. Adv. 2012, vol. 30, nr. 6, p. 1344–1353.
 21. Asan-Ozusaglam M., Cakmak Y.S., Kaya M. Bioactivity and Antioxidant Capacity of *Anabaenopsis* sp. (Cyanobacteria) Extracts. In: J. Algal Biomass Utiln. 2013, vol.4, nr. 3, p. 50–58.
 22. Astadi I. et al. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). In: Food Chemistry. 2009, vol.112, p. 659-663.
 23. Balazy M., Nigam S. Aging, lipid modifications and phospholipases—New concepts. In: Ageing Research Reviews. 2003, vol. 2, p. 209–291.
 24. Bar H., et al. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. In: Colloids Surf. A. 2009, vol. 339, p. 134–139.
 25. Becker E.W. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge University Press, 1994. 293 p.
 26. Behera B.C. et al. Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. In: LWT. 2006, vol. 39, p. 80-85.
 27. Borowitzka M.A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. In: J Appl Phycol. 2013, vol. 2, p.743–756.
 28. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: Lebensmittel-Wissenschaft and Technologies. 1995, vol. 28, p. 25-30.
 29. Bremus Ch., et al. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. In: Journal of Biotechnology. 2006, vol. 124, p. 196–205.
 30. Brito D., et al. Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. In: The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. 2013, Fascicle VI – Food Technology, vol. 37, nr.1, p. 85-97.
 31. Brown G. C., Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. In: Biochimica et Biophysica Acta, 2004, vol. 1658, p. 44–49.

32. Carballo-Cardenas E.C. et al. Vitamin E (a-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. In: Biomolecular Engineering. 2003, vol. 20, p. 139 – 147
33. Carocho M. et al. A Review on Anti- oxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and synthetic compounds. Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. In: Food and Chemical Toxicology. 2013, vol. 51, p. 15-25.
34. Cepoi L. et al. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. In: Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie. 2009, Tom XVI/2, p. 43-48.
35. Cepoi L. Antioxidant Activity in *Haematococcus pluvialis* Cells During the Vital Cycle. In: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology(2nd edition). Chișinău, Moldova, October 9-10, 2014, p. 25-28.
36. Cepoi L., Zinicovscaia I., Rudi L., Chiriac T., **Valuta A.**, Duca Gh., Kirkesali E. Biochemical changes in cyanobacteria during the synthesis of silver nanoparticles. In: Canadian Journal of Microbiology. 2015, vol. 61, nr. 1, p.13-21.
37. Cha K. et al. Optimization of Pressurized Liquid Ex- traction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010, vol. 58, nr. 2, pp. 793-797.
38. Chabrol E., Charonnet R. Une nouvelle reaction pour l’etude des lipides. In: Presse Med. 1937, vol. 45, p. 1713-1714.
39. Chacon T.L., Gonzalez-Marino G.E. Microalgae for “Healthy” food – possibilities and chal- lenges. In: Comprehensive reviews in food sciences and food safety. 2010, vol. 9, p. 655-675.
40. Chandra P.S., et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. In: Biotechnol. Progr. 2006, vol. 22, p. 577–583.
41. Chang C.J. et al. A novel phycobiliprotein alleviates allergic airway inflammation by modulating immune responses. In: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2011, vol. 183, p. 15-25.
42. Cheirsilp B., Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed- batch cultivation. In: Bioresource Technology. 2012, vol. 110, p. 510–516.
43. Chen H, Pan S. Bioremediation potential of spirulina: toxicity and biosorption studies of lead. In: J Zhejiang Univ. 2005, vol. 6B, nr. 3, p.171-174.
44. Chen H., Jiang J.G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. In: J. Cell. Physiol. 2009, vol. 219, p. 251–258.
45. Chojnacka K., Chojnacka A., Gorecka H. Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue- green algae *Spirulina sp.*: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. In: Chemosphere. 2005, vol. 59. p. 75–84.
46. Choochote W., Suklampoo L., Ochaikul D. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. In: Journal of Applied Phycology. 2013, vol. 26, nr. 1, p. 43-48.
47. Christaki E. et al. Functional Properties of Carotenoids Originating from Algae. In: Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013, vol. 93, nr. 1, p. 5-11.

48. Cifuentes A.S. et al. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (*Chlorophyceae*): growth and pigment content across a salinity gradient. In: Journal of Phycology. 2001, vol. 37, p. 334–344.
49. Clapco S. et al. The effect of some metal complexes of oxime ligands on proteolytic activity of *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 strain. In: Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie, 2013, Tom XX/1, p. 53-58.
50. Converti A., Lodi A., Solisio C. *Spirulina platensis* biomass as adsorbent for copper removal. In: Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2005, vol. 5, nr. 002, p. 85-88.
51. Cornish M.L., Garbary D.J. Antioxidants from macroalgae: potential application in human health and nutrition. In: Algae. 2010, vol. 25, nr.4, p. 155-171.
52. Cysewski G.R. Commercial production of *Spirulina*. In: 2nd Algae World. Brussels, Belgium, 31th May–1st June 2010.
53. Danxiang H., Yonghong B., Zhengyu H. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential: *Nostoc*. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology (ed. Richmond A.). Blackwell Publishing 2004, p. 304–311.
54. Danxiang H., et al. Biology and biotechnology of edible *Nostoc*, In: Handbook of Microalgal Culture: In: Applied Phycology and Biotechnology, 2nd edition (ed. Richmond A., Hu Q.). 2013, p.433-444.
55. De Philippis R., Colica G., Micheletti E. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. In: Applied Microbiol Biotechnol. 2011, vol. 92, p. 697-708.
56. Delavari Amrei H., et.al. Using fluorescent material for enhancing microalgae growth rate in photobioreactors. In: J. Appl. Phycol. 2015, vol. 27, p. 67–74.
57. Deng R. T., Chow T.J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. In: Cardiovascular Therapeutics, 2010, vol. 28, nr. 4, 2010, p.33-45.
58. Desai S. H., Atsumi S. Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. In: Current Opinion in Biotechnology. 2013, vol. 24, p. 81-86.
59. Dufour J., Moreno J., Rodríguez R. Life Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae Oil: Effect of Algae Species and Cultivation System. In: M. Finkbeiner (ed) Towards Life Cycle Sustainability Management. Springer Science+Business Media B.V., 2011. p. 437- 442.
60. Duracková Z. Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: Gvozdjaková, A., Ed., Mitochondrial Medicine. New York: Springer Science+ Business Media, 2008. p. 19-54.
61. Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*) in nitrogen limitation. In: Aquaculture. 2007, vol. 272, p. 717–722.
62. Duval B., Shetty K., Thomas W.H. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. In: Journal of Applied Phycology. 2000, vol.11, p. 559–566.
63. Faize M. et al. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. In: Journal of Experimental Botany. 2011, vol. 62, p.2599–2613.

64. Fasseas M.K. et al. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. In: Food Chemistry. 2007, vol. 106, 88-1194.
65. Fauchot J. et al. Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. In: Journal of Phycology. 2000, vol. 36, p. 484–496.
66. Fernandez F.G.A., Fernandez-Sevilla J.M., Grima E.M. Photobioreactors for the production of microalgae. In: Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 2013, vol. 12, p. 131–151.
67. Fernandez-Sevilla J.M., Fernandez F.G.A., Grima E.M. Biotechnological production of lutein and its applications. In: Applied Microbiology and Biotechnology. 2010, vol. 86, p. 27–40.
68. Ferreira L.S. et al. *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* cultivation in tubular photobioreactor: use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. In: Appl. Energy. 2012, vol. 92, p. 379–385.
69. Fistarol G.O., Legrand C. and Grane'li E. Allelopathic effect on a nutrient-limited phytoplankton species. In: Aquatic Microbial Ecology. 2005, vol. 41, p. 153–161.
70. Fournadzhieva P., Pillarsky P. Mass culture and application of algae in Bulgaria. In: Abstracts of the 6th Int. Conf. on Applied Algology. Ceske Budejovice, Czech Republic. 1993, p. 20.
71. Foyer C. H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. In: Plant, Cell and Environment. 2005, vol. 28, p. 1056–1071.
72. Frankenberg N., Lagarias J.C. Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC 7120. In: The J of Biol Chem. 2003, vol. 278, nr. 11, p. 9219-9226.
73. Fraser J.M. et al. Photophysiological and Photosynthetic Complex Changes during Iron Starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. In: PLOS ONE. 2013, vol. 8, nr. 3, p. 1-11.
74. Fulda S. et al. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: Plant Biol. 2011, vol. 13, nr. 632–642.
75. Gaber A. et al. Glutathione peroxidase-like protein of *Synechocystis* PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. In: Physiologia Plantarum, 2006, vol. 128, p. 251-262.
76. Gantar M. et al. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnithrix* sp. strain 37-2-1. In: Journal of Biotechnology. 2012, vol. 159, p. 21– 26.
77. Gantt E., Lipschultz C.A. Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum* pigments analysis. In: Biochemistry. 1974, vol.13, p.14-20.
78. Garcia-Malea M.C. et al Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors. In: Biotechnol. Bioeng. 2009, vol. 102, p. 651–657.
79. Gavrilescu M. Removal of Heavy Metals from the environment by biosorption. In: Engineering in Life Sciences. 2004, vol. 4, nr. 3, p. 219-232.
80. Gelagutashvili E. Comparative Study on Heavy Metals Biosorption by Different Types of In: Bacteria Open. Journal of Metal. 2013, vol. 3, p. 62-67.
81. Gericke M. Pinches A. Biological synthesis of metal nanoparticles. In: Hydrometallurgy. 2006, vol. 83, p. 132–140.
82. Ghadouani A. et al. Effects of *Microcystis aeruginosa* and purified microcystin-LR on the feeding behavior of *Daphnia pulex*. *Limnol.* In: Oceanogr. 2004, vol. 49, p. 666–679.

83. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. In: Plant Physiology and Biochemistry. 2010, vol. 4, p. 8909 – 8930.
84. Góiris K. et al. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. In: Journal of Applied Phycology. 2012, vol. 24, p.1477–1486.
85. Gokhale S.V., Jyoti K.K., Lele S.S. Kinetic and equilibrium modeling of chromium (VI) biosorption on fresh and spent *Spirulina platensis*/*Chlorella vulgaris* biomass. In: Bioresources Technology. 2008, vol. 99, nr. 9, p. 3600-3608.
86. Gong R., Ding Y., Liu H. Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. In: Chemosphere. 2005, vol. 58, p. 125-130
87. Gopinathan P., Ashok A. M., Selvakumar R. Bacterial flagella as biotemplate for the synthesis of silver nanoparticle impregnated bionanomaterial. In: Applied Surface Science 2013, vol. 276, p. 717–722.
88. Gray M.I. et al. Development of liquid chromatography/mass spectrometry methods for the quantitative analysis of herbal medicine in biological fluids: a review. In: Biomedical Chromatography. 2010, vol. 24, nr.1, p. 91–103.
89. Greve C. B., Pulz O. The Biotechnology of Cyanobacteria. In: Ecology of cyanobacteria II. Their diversity in space and time (ed. Whitton B.A), Springer. 2012, p.707-739.
90. Grobbelaar J. Physiological and technological considerations for optimising mass algalcultures. In: Journal of Applied Phycology. 2000, vol. 12, p. 201–206.
91. Grobbelaar J. Algal nutrition (mineral nutrition), In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology (ed. Richmond A.). 2004, p. 97-116.
92. Grobbelaar J. Factor's governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate. In: Journal of Applied Phycology. 2009, vol. 21, p. 489 –492.
93. Grobbelaar J. Mass production of microalgae at optimal photosynthetic rates. In: Agricultural and Biological Sciences: "Photosynthesis", (ed Zvy Dubinsky). 2013, p.357-371.
94. Gupta V. et al. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) - Prospects and challenges. In: Algal Research. 2013, vol. 2, p. 79–97.
95. Gupta V.K., Rastogi A. Sorption and desorption studies of chromium (VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass. In: Journal of Hazardous Materials. 2008, vol. 154, p. 347–354.
96. Hajimahmoodi M. et al. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. In: Journal of Applied Phycology, 2010, vol. 22, p. 43–50.
97. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford: Oxford University Press, 2002. 936 pp.
98. Han P-P. et al. Comparative metabolomic analysis of the effects of light quality on polysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. In: Algal Research. 2015, vol. 9, p. 143-150.
99. Hashtroudi M.S. et al. Analysis of *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* from Northern Iran, as rich sources of major carotenoids. In: Food Chemistry. 2013, vol. 136, nr. 3–4, p. 1148-1155.
100. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. In: Archives of Biochemistry Biophysics, 1968, vol. 125, p. 180-198.

101. Heining M. et al. Internal illumination of photobioreactors via wireless light emitters: a proof of concept. In: Journal of Applied Phycology, 2015, vol. 27, p. 59–66.
102. Hernández I. et al. Antioxidant Defenses Against Drought Stress. In: R. Aroca (ed.), Plant Responses to Drought Stress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012, p. 231-258.
103. Herrero M. et al. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. In: Food Chemistry. 2005, vol. 93, p. 417–423.
104. Herrero M. et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of *Spirulina platensis* proteins obtained by pressurized liquid extraction. In: Electrophoresis. 2005, vol. 26, p. 4215–4224.
105. Hibertson B.M. et al. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. In: Molecular Aspects of Medicine. 2011, vol. 32, Issues 4–6, p. 234–246.
106. Hirata T. et al. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. In: Journal of Applied Phycology. 2000, vol. 12, nr. 3-5, p. 435-443.
107. Hiren D., Arabinda R., Kothari I.L. Biosorption of Cadmium by Live and Dead *Spirulina*: IR Spectroscopic, Kinetics, and SEM Studies. In: Current Microbiology. 2007, vol. 54, p. 213-218.
108. Hosikian A. et al. Chlorophyll extraction from Microalgae: a Review on the process engineering aspects. International Journal of Chemical Engineering. 2010, Article ID 391632, 11 pages. doi: 10.1155/2010/391632 .
109. Hu R. et al. Metallic nanostructures as localized plasmon resonance enhanced scattering probes for multiplex dark field targeted imaging of cancer cells. In: J. Physical Chemistry. C Nanomaterials and Interfaces. 2009, vol.113, p. 2676–2684.
110. Huang J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. In: Nanotechnology. 2007, vol.18, p. 1–11.
111. Ibanez E. et al. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In: M. Hayes (ed.), Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications, Springer Science+Business Media, 2012, p.55-90
112. Inouye L.S., Lotufo G. R. Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods. In: Talanta. 2006, vol. 70, nr. 3, p. 584–587.
113. Jahns P., Holzwarth A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photo-protection of photosystem II. In: Biochimica et Biophysica Acta. 2012, vol.1817, p.182–193.
114. Jamuna B.A., Rai V. R. Evaluation of the antimicrobial activity of three medicinal plants of South India. In: Malaysian Journal of Microbiology. 2011, vol.7, p. 14-18.
115. Janknegt P.J. et al. A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. In: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2007, vol. 87, p. 218–226.
116. Jebali A., Ramezani F., Kazemi B. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Geotricum* sp. In: Journal of Cluster Sciences. 2011, vol. 22, p.225–232.
117. Jesus Raposo M. F., Morais R.M.S.C., Morais A.M.M.B. Health application of bioactive compounds from marine microalgae. In: Life Sciences. 2013, vol. 93, p.479-486.
118. Ji L.L., Cui G.Y, Zhao X.X. Antioxidant activities of phycobiliproteins isolated from wild *Nostoc commune*. In: Advances in Biomedical Engineering. 2011, vol. 3-5, p. 34-43.

119. Johnson E.M., Kumar K., Das D. Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc* sp. In: *Bioresource Technology*. 2014, vol. 166, p. 541-554
120. Johnson K., Admassu W. Mixed algae cultures for low cost environmental compensation in cultures grown for lipid production and wastewater remediation. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2013, p. 992–998.
121. Johnson K.R., Ellis G., Toothill C. The sulfophosphovanillin reaction for serum lipids: a reappraisal. In: *Clinical Chemistry*. 1977, vol. 23, nr. 9, p. 1669–1678.
122. Kaçka A., Dönmez G. Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. In: *Bioresources Technology*. 2008, vol. 99, p.8348–8352.
123. Kancheva V.D. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study. In: *European Journal of Lipid Science and Technology*., 2009, vol.111, p.1072–1089.
124. Karawita R.et al. Protective effect of enzymatic extracts from microalgae against DNA damage induced by H₂O₂. In: *Marine Biotechnology*. 2007, vol. 9, p.479–490.
125. Ke P. J., Woyewod A. D. Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. In: *Analytica Chimica Acta*. 1979, vol. 106, nr. 2, p. 279 -284
126. Kelman D. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. In: *Marine Drugs*. 2012, vol.10, nr.2, p. 403-416.
127. Kepekçi R.A., Saygideger S.D. Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. In: *Journal of Applied Phycology*, 2012, vol. 24, p.897–905.
128. Kesheri M., Richa K.M, Sinha R.P. Antioxidants as natural arsenal against multiple stresses in cyanobacteria. In: *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011, vol.2, nr.2, p. B168-B187.
129. Klein B.C. et al. Microalgae as natural sources for antioxidative compounds. In: *Journal of Applied Phycology*. 2012, vol. 24, nr. 1133–1139.
130. Klejdus B.L. et al. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography*. 2010, vol. A 1217, nr. 51, p. 7956–7965.
131. Ku C.S. et al. Health Benefits of Blue-Green Algae: Prevention of Cardiovascular Disease and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Journal of Medicinal Food*. 2013, vol. 16, nr. 2, p. 103-111.
132. Kumar A.S. et al. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalisation with amine group. In: *Journal of Nanoparticles Researches*. 2010, vol.12, p. 1667–1675.
133. Kumar M. et al. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata*, (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) to salinity induced oxidative stress. In: *Journal of Experimental Biology and Ecology*. 2010, vol. 391, p.27-34.
134. Lafka T. I. et al. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. In: *Food Chemistry*. 2011, vol. 125, p. 92-98.
135. Latifi A., Ruiz M., Zhang C. C. Oxidative stress in cyanobacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews*. 2009, vol. 33, p. 258–278

136. Lee Y.K. Algal nutrition (Heterotrophic carbon nutrition). In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology (ed. Richmond A.), Blackwell Publishing, 2004. p. 116-125.
137. Lee Y.K. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific. In: Journal of Applied Phycology. 1997, vol. 9, p. 403–11.
138. Lee Y.K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. In: Journal of Applied Phycology. 2001, vol. 13, p. 307–315.
139. Lee Y.K. et al. Design and performance of an a-type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. In: Journal of Applied Phycology. 1995, vol. 7, p. 47–51.
140. Leopoldini M., Russo N., Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. In: Food Chemistry. 2011, vol.125, nr.2, p.288-306.
141. Leya T. et al. Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology. In: FEMS Microbiology Ecology. 2009, vol. 67, p. 432–443.
142. Li H., et al. Antioxidant and moisture-retention activities of the polysaccharide from *Nostoc commune*. In: Carbohydrate Polymers. 2011, vol. 83, p. 1821–1827.
143. Li H.B. et al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. In: Food Chemistry. 2007, vol. 102, p.771–776.
144. Liu Z.Y., Wang G.C., Zhou B.C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. In: Bioresources Technology. 2008, vol. 99, p. 4717–4722.
145. Lodi A. et al. Chromium (III) removal by *Spirulina platensis* biomass. In: Chemical Engineering Journal. 2008, vol. 136, nr. 2-3, p. 151-155.
146. López A. et al. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. In: Food Chemistry. 2011, vol. 125, p. 1104–1109.
147. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: Journal of Biological Chemistry. 1951, vol. 193, p. 265–275.
148. Lushchak V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. In: Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 2011, vol. 153, p.175– 190.
149. Macías-Sánchez M.D. et al. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. In: Talanta. 2009, vol. 77, nr.3, p. 948–952.
150. Magalhaes M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. In: Analytica chimica acta. 2008, vol. 613, p. 1–19.
151. Mahdi E., Fariba K. Cancer treatment with using cyanobacteria and suitable drug delivery system. In: Annals of Biological Research. 2012, vol.3, nr. 1, p.622-627.
152. Manivannan K., Anantharaman P., Balasubramanian Th. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). In: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012, vol. 2, nr.1, p.S342-S346.
153. Mao L. C. et al. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. In: European Food Research and Technology. 2006, vol. 222, nr.3-4, p 236-241.
154. Markou G., Nerantzis E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. In: Biotechnology Advances. 2013, vol. 31, p. 1532–1542.

155. Martinez-Castanon G.A. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. In: J. Nanopart. Res. 2008, vol.10, p.1343–1348.
156. Maurya S.S., Maurya J.N., Pandey V.D. Factors regulating phycobiliprotein production in cyanobacteria. In: International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014, vol. 3, nr. 5, p. 764-771.
157. McCarty M.F., Barroso-Aranda J., Contreras F. Oral phycocyanobilin may diminish the pathogenicity of activated brain microglia in neurodegenerative disorders. In: Medical Hypotheses. 2010, vol. 74, nr. 3, p. 601-605.
158. Menzhanova N. G. et al. Season variability of iron effects on periodic culture of microalgae *Dunaliella viridis* Teod. In: Frontiers of Biology in China. 2009, vol.4, nr. 3, p. 328–336.
159. Micheletti E. et al. Selectivity in the heavy metal removal by exo-polysaccharide-producing cyanobacteria. In: Journal of Applied Microbiology. 2008, vol. 105, p. 88–94.
160. Min T. Production of *Spirulina* in Myanmar (Burma). In: Bulletin de l'Institut de Oceanographie de Monaco. 1993, vol. 12, p.175–78.
161. Moheimani N.R, Borowitzka M.A Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. In: Biotechnology and Bioengineering. 2007, vol. 96, p. 27–36.
162. Moreno J. et al. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. In: Biomolecular Engineering. 2003, vol. 20, p. 191–197.
163. Morgan-Kiss R.M. et al. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2006, vol. 70, p. 222–252.
164. Munir N. et al. Algae: A potent antioxidant source. In: Sky Journal of Microbiology Research. 2013, vol. 1, nr.3, p. 22 – 31.
165. Naja G., Volesky B. The Mechanism of Metal Cation and Anion Biosorption. Chapter 3. In: P. Kotrba et al. (eds.), Microbial Biosorption of Metals, © Springer Science-Business Media B.V. 2011, DOI 10.1007/978-94-007-0443-5-3.
166. Nayak R.R. et al. Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: the process and optimization. In: Journal of Nanoparticles Research. 2011, vol.13, p. 3129–3137.
167. Ngo D. H. et al. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. In: Food Research International. 2011, vol. 44, p. 523–529.
168. Nicolaisen K., Schkeiff E. Iron dependency of, and transport by, cyanobacteria. In: Iron uptake and homeostasis in microorganisms (ed.Cornelis P., Andrews S.C.), 2010. p. 203-229.
169. Nieto A. F. et al. Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. In: TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2010, vol 29, p. 752–764.
170. Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I., Murata N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. In: Physiology of Plants. 2011, vol.142, p.35–46.
171. Ogura R. et al. Biochemical characterization of an L-tryptophan dehydrogenase from the photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. In: Enzyme and Microbial Technology. 2014, vol. 60, p. 40-46

172. Olaizola M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. In: Journal of Applied Phycology. 2000, vol.12, p. 499–506.
173. Olvera-Ramirez R., et al. Antioxidant effect of phycobiliproteins on proteins and DNA exposed to a reactive oxygen species generating system. In: The FASEB Journal. 2013, vol. 27, p.890- 895.
174. Onofreiová T. et al. Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. In: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010, vol.51, nr.2, p. 464–470.
175. Oren A. et al. Microalgae and cyanobacteria of the Dead Sea and its surrounding springs. In: Isr. J. Plant. Sci. 2008, vol. 56, p.1–13.
176. Oxidative Stress and Diseases. Edited by Volodymyr I. Lushchak and Dmytro V. Gospodaryov, Publisher: InTech. 2012, p. 367-410.
177. Pade N., Hagemann M. Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. In: Life (Basel, Switzerland). 2014, vol. 5, nr. 1, p. 25-49.
178. Pandey S., Goswami G. K., Nanda K. K. Green synthesis of biopolymer–silver nanoparticle nanocomposite: an optical sensor for ammonia detection. In: International Journal of Biological Macromolecules. 2012, vol. 51, p. 583–589.
179. Pandey U., Pandey J. Enhanced production of biomass, pigments and antioxidant capacity of a nutritionally important cyanobacterium *Nostochopsis lobatus*. In: Bioresource Technology. 2008, vol. 99, p. 4520–4523
180. Pandey V. D., Pandey A., Sharma V. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. In: International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2013, vol. 2, nr. 9, p. 89-97.
181. Pangestuti R., Kim S. K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. In: Journal of Functional Foods. 2011, vol.3, p. 255 – 266.
182. Park H. J. et al. Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Establish the Effects of *Spirulina* in Elderly Koreans. In: Annals of Nutrition and Metabolism. 2008, vol. 52, nr. 4, p. 322-328.
183. Pereira S. et al. Using extracellular polymeric substances (EPS) – producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? In: Microbiology. 2011, vol. 157, p. 451-458.
184. Perez-Garcia O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. In: Water Resources. 2011, vol. 45, nr. 1, p.11–36.
185. Pinto E. et al. Heavy metal - induced oxidative stress in algae. In: Journal of Phycology. 2003, vol. 39, p.1008 – 1018.
186. Philip D. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. In: Spectrochimica Acta, part A. 2009, vol. 73, p. 374–381.
187. Platenik J. et al. Quinolinic acid iron(II) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction. In: Free Radicals Research. 2001, vol. 34, p. 445-459.
188. Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E. In the search of new functional food ingredients from algae. In: Trends in Food Science and Technology. 2008, vol. 19, p. 31-39.

189. Pokorny' J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? In: Eur. Journal of Lipid Science and Technology. 2007, vol. 109, p. 629–642.
190. Posten C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. In: Engineering and Life Science. 2009, vol. 9, p. 165–177.
191. Pourova J. et al. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. In: Acta Physiologica, 2010, vol. 198, p. 15-35.
192. Pradedova E.F., Isheeva O.D., Salyaev R.K. Classification of the Antioxidant Defense System as the Ground for Reasonable Organization of Experimental Studies of the Oxidative Stress in Plants. In: Russian Journal of Plant Physiology. 2011, vol. 58, nr.2, p.210-217.
193. Prasanna R. et al. Rediscovering Cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. In: Applied Biochemistry and Microbiology. 2010, 46(2), p. 133–147.
194. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. In: Analytical Biochemistry. 1999, vol. 269, p. 337-341.
195. Pulz O., Broneske J., Waldeck P., IGV GmbH Experience Report, Industrial production of microalgae under controlled conditions: innovative prospects, In: Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 2nd edition (ed. Richmond A., Hu Q.), 2013, p. 445-460.
196. Pulz O., Scheibenbogen K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. In: Advances in biochemical engineering/biotechnology (ed. T. Scheper), Springer 1998, p. 123–152.
197. Pulz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. In: Applied Microbiology and Biotechnology. 2001, vol. 57, p. 287–293.
198. Radmann E.M., Reinehr C.O., Costa J.A.V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. In: Aquaculture. 2007, vol. 265, p. 118–126.
199. Rajiv K. A. et al. Biosorption of Pb^{2+} and Zn^{2+} by Non-Living Biomass of *Spirulina* sp. In: Indian Journal of Microbiology. 2011, vol. 50, nr. 4, p. 438–442.
200. Ramel F. et al. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. In: Plant Physiology, 2012, vol. 158, p.1267–1278.
201. Re R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: Free Radical Biology & Medicine. 1999, vol.10, p. 1231-1237.
202. Ramirez D., Ledon N. Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic response. In: Mediators Inflamm. 2002, nr. 11, p. 81-85.
203. Richa K.M., Sinha R.P. Antioxidants as natural arsenal against multiple stresses in cyanobacteria. In: International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2011, vol. 2, nr. 2, p. 168-187.
204. Richa K.M. et al. Biotechnological potentials of phycobiliproteins. In: International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2011, vol. 2, nr. 4, p. 446-454.
205. Richa Rastogi R.P. et al. Biotechnological potential of mycosporine-like amino acids and phycobiliproteins of cyanobacterial origin. In: Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering. 2011, vol. 1, nr. 2, p. 159-171.

206. Richmond A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. In: *Hydrobiologia*. 2004, vol. 512, p. 33–37.
207. Richmond A., Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae, In: *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 2nd edition (ed. Richmond A., Hu Q.), 2013, p.169-204.
208. Richmond A., Cheng-Wu Z. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp.outdoors. In: *Journal of Biotechnology*. 2001, vol. 85, nr. 3, p. 259–269.
209. Rodriguez-Garcia I., Guil-Guerrero J.L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. In: *Food Chemistry*. 2008, vol. 108, p. 1023–1026.
210. Romero D. M., Rios de Molina M.C., Juarez A.B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011, vol. 74, p.741–747.
211. Roney B.R. et al. Consumption of *Nostoc* soup: a potential for BMAA exposure from *Nostoc* cyanobacteria in China? In: *Amyotroph. Lateral. Scler.* 2009, vol. 10(S2), p. 44–49.
212. Saha G. M. Design and Analysis for Bioassays. In: *Design Workshop Lecture Notes*, ISI, Kolkata 2002, p. 61-76.
213. Scanlan D.J. et al. Ecological genomics of marine picocyanobacteria. In: *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2009, vol. 73, p. 249–299.
214. Schiewer S., Wong M.H. Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae. In: *Chemosphere*.2000, vol. 41, p. 271-282.
215. Schreckenbach K. et al. Der ein fluss von mikroalgen (*Spirulina platensis*) in trockenmischfutter auf karpfen (*Cyprinus carpio*). In: *Fischer Teichwirt.* 2001, vol. 1, p. 10–13.
216. Sekar S., Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. In: *Journal of Applied Phycology*. 2008, vol. 20, p.113–136.
217. Shailendra P., Beronda L. Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. In: *Trends in Microbiol.* 2011, vol. 19, p. 278-285.
218. Shanab S. et al. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. In: *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012, p. 608-615.
219. Sharma G. et al. Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. In. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2014, vol. 6, nr. 4, p. 202-206.
220. Sharma N.K. et al. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. In: *Journal of Applied Phycology*. 2010, vol. 23, nr.6, p. 1059–1081.
221. Shebis Y. et al. Natural Antioxidants: Function and Sources. In: *Food and Nutrition Sciences*. 2013, vol.4, p.643-649.
222. Simeunović J. et al. Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. In: *Journal of Applied Phycology*. 2013, vol. 25, p. 597–607.
223. Singleton V. L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. In: *American J Enology and Viticulture*. 1965, vol. 16, p. 144-158.

224. Sivonen K., Börner T. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: The cyanobacteria. Molecular biology, genomics and evolution (ed. Herrero A., Flores E.). 2008. Norfolk: Caister Academic Press, 2008, p. 159–197.
225. Solisio C., Lodi A., Torre P. Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. In: Bioresource Technology. 2006, vol. 97, p. 1756-1760.
226. Solisio C. et al. Cadmium biosorption on *Spirulina platensis* biomass. In: Bioresource Technology. 2007, vol. 99, nr. 13, p. 5933-5937.
227. Sonani R.R. et al. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. In: Process Biochemistry. 2014, vol. 49, nr. 10, p. 1757–1766.
228. Spolaore P. et al. Commercial applications of microalgae. In: Journal of Biosciences and Bioengineering. 2006, vol. 101, p. 87–96.
229. Steidinger K.A., Garces E. Importance of Life Cycles in the Ecology of Harmful Microalgae. In: Ecological Studies (Edna Graneli and Jefferson T. Turner (Eds.). vol. 189: Ecology of Harmful Algae. 2006. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2006, p. 37-49.
230. Steinbrenner J., Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. In: Plant Physiology. 2001, vol. 125, p. 810–817.
231. Su J., Jia S., Chen X., Yu H. Morphology, cell growth, and polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* in liquid suspension culture at different agitation rates. In: Journal of Applied Phycology. 2008, vol. 20, nr. 3, p. 213–217.
232. Sulaiman Sh. F. et al. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. In: Journal of Food Composition and Analysis. 2011, vol. 24, p. 506–515.
233. Sumazian Y. et al. Antioxidant activities, flavonoids, ascorbic acid and phenolic contents of Malaysian vegetables. In: Journal of Medicinal Plants Research. 2010, vol. 4, nr. 10, p. 881-890.
234. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. In: Marine Drugs. 2011, vol. 9, p. 1101–1118.
235. Tang D. et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. In: Bioresource and Technology. 2010, vol. 102, p. 3071-3076.
236. Teo C.C. et al. Pressurized hot water extraction (PHWE). In: Journal of Chromatography. 2008, vol. A 1217, p. 2484–2494.
237. Tian J., Yu J. Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation. In: Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology. 2009, vol. 97, p. 152–160.
238. Torzilo G. et al. A two-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*, In: Biotechnology and Bioengineering. 1993, vol. 42, p. 891.
239. Tredici M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology (ed. Richmond A.). Blackwell Science, 2004, p. 178-215.
240. Tredici M.R., Chini Zittelli G. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. In: Biotechnology and Bioengineering. 1998, vol. 57, p. 187–197.

241. Tripathi B.N. et al. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu^{2+} and Zn^{2+} . In: *Chemosphere*. 2006, vol. 62, p.538–544.
242. Turner C., Ibañez E. Pressurized hot water extraction. In *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry* (ed. N. Lebovka, E. Vorobiev, and F. Chemat). Boca Ratón FL: Taylor & Francis Group, LLC, 2011. p.65-74.
243. Tyszka M., Fraser S.E, Jacobs R.E. Magnetic resonance microscopy: recent advances and applications. In: *Current Opinion in Biotechnology*. 2005, vol. 16, nr. 1, p. 93–99.
244. Ugwu C.U., Ogbonna J.C., Tanaka H. Improvement of mass transfer characteristics and reductivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, vol. 58, p. 600–607.
245. **Valuta A.** et al. Phycobiliprotein accumulation in cyanobacterium *Nostoc linckia* and modification of antioxidant activity. In: *The Annals of Oradea University, Biology Fascicle*. 2015, Tom XXII, nr. 1, p. 13-19.
246. **Valuța A.** et al. Impact of iron (III) Schiff base complexes on phycobiliprotein accumulation in cyanobacterium *Nostoc linckia*. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology* (2nd ed.). Chișinău, Moldova, October 9-10, 2014, p. 90-92.
247. Vannela R., Verma S. Co^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*. In: *Biotechnology Progress*. 2006, vol. 22, nr. 5, p. 1282-1293.
248. Vijayaraghavan K., Yun Y.S. Bacterial biosorbent and biosorption. In: *Biotechnology Advances*. 2008, vol. 26, p. 266-291.
249. Vonshak A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: *Handbook of microalgal mass culture* (ed. Richmond A.). CRC Press, 1986. p. 117-145.
250. Wada N., Sakamoto T., Matsugo S. Multiple roles of photosynthetic and sunscreen pigments in cyanobacteria focusing on the oxidative stress. In: *Metabolites*. 2013, vol. 3, p. 463-483.
251. Wang P., Wong M.H., Tam N.F.Y. Antioxidant responses of two microalgae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella* sp., to estradiol and ethinylestradiol. In: *Journal of Applied Phycology*. 2013, vol. 25, p.891 – 903.
252. Wang H.M. et al. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. In: *Process Biochemistry*. 2010, vol.45, p. 1865–1872.
253. Wang S. et al. Ionic-liquid-assisted facile synthesis of silver nanoparticle-reduced graphene oxide hybrids by gamma irradiation. In: *Carbon*. 2013, vol.55, p. 245–252.
254. Wijngaard H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. In: *Food Research International*. 2012, vol. 46, nr. 2, p. 505–513.
255. Yin B. et al. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles under protection of poly(N-vinylpyrrolidone). In: *Journal Physical Chemistry, part B*. 2003, vol. 107, p. 8898–8904.
256. Ying Z., Han X., Li J.. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. In: *Food Chemistry*. 2011, vol.127, p. 1273–1279.
257. Yoshimura H. et al. The role of extracellular polysaccharides produced by the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HK-01 in NaCl tolerance. In: *Journal of Applied Phycology*. 2012, vol. 24, p. 237–243.

258. Yu H., Jia S., Dai Y. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. In: Journal of Applied Phycology. 2009, vol. 21, nr. 1, p. 127–133.
259. Zabochnicka-Swiatek M, Krzywonos M. Potential of Biosorption and Bioaccumulation Processes for Heavy Metal Removal. In: Polish Journal of Environmental Studies. 2014, vol. 23, nr. 2, p. 551-561.
260. Zhang L. X. et al. Anti-cancer effects of polysaccharide and phycocyanin from *Porphyra yezoensis*. In: Journal of Marine Science and Technology. 2011, vol. 19, nr. 4, p. 377-382.
261. Zhang Z. et al. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*). In: Aquaculture. 2001, vol. 195, p. 35–49.
262. Zhekisheva M. et al. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. In: Journal of Phycology. 2002, vol. 38, p. 325-331.
263. Zhongrui Li et al. Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. In: Journal of Applied Phycology. 2012, vol. 24, nr. 6, p. 1527-1536.
264. Zinicovscaia I., Cepoi L., **Valuta A.**, Rudi L., Culicov O., Frontasyeva M., Kirkesali E., Pavlov S., Mitina T. Nostoc Linckia as Biosorbent of Chromium and Nickel from Electroplating Industry Wastewaters. In: Journal of Materials Science and Engineering. 2014, vol. 4, nr. 8, p. 242-247.
265. Zittelli G.C. et al. Photobioreactors for mass cultivation of microalgae, In: Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 2nd edition (ed. Richmond A., Hu Q.). 2013, p. 225-266.
267. Береговая Н.М., Гудвилович И.Н. Хранение водно-спиртового экстракта С-фикоцианина, полученного из микроводоросли *Spirulina platensis*. В: Экология моря. 2010, Вып. 81, с. 17 - 22.
268. Борш З., Степанова Г. Применение антронового реактива для микроопределения углеводов в водорослях. В: Известия АН МССР. 1966, с. 96-98.
269. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции. В: Вестник Харьковского национального аграрного университета. 2007, Вып. 3, № 12, с. 6-26.
290. Патент 2151403, Российская Федерация, G01N33/92. Способ определения резистентности к окислению липопротеинов низкой плотности сыворотки крови. Рагино Ю.И., Душкин М.И., Никитин Ю.П.; Заявитель патента: Институт терапии СО РАМН. Опубл. 20.06.2000.
291. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М: КДУ, 2007. 140 с.
292. Филиппович Ю., Егорова Т., Севастьянова Л. Практикум по общей биохимии. Москва: Просвещение, 1975. 411 с.

ANEXE



MD 4253 B1 2013.10.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4253** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07F 15/06* (2006.01)
C07D 213/88 (2006.01)
C07D 213/50 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face oposiție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2012 0099 (22) Data depozit: 2012.11.05	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.10.31, BOPI nr. 10/2013
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; DANILESCU Olga, MD; BULHAC Ion, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; BOLOGA Olga, MD; RIJA Andrei, MD; MISCU Vera, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; VALUȚA Ana, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat și procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și biotehnologie, și anume la sinteza unui nou compus coordinativ al cobaltului(II) și la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia.

Conform invenției, se revendică un compus coordinativ – sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin(2-)cobalt(II) monometanol trihidrat.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05;

2
K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,00027;
5 ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005, compusul sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat
10 - 0,019...0,021 g/L și apă distilată până la 1L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitarea lentă periodică.

15 Rezultatul constă în majorarea activității antioxidante a extractului etanolic obținut din biomasa de microalgă.

Revendicări: 2

MD 4253 B1 2013.10.31



MD 4326 B1 2015.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4326** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07D 209/86* (2006.01)
C07C 13/47 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2013 0078 (22) Data depozit: 2013.10.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.02.28, BOPi nr. 2/2015
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: CUCICOVA Caleria, MD; RUDIC Valeriu, MD; ARICU Aculina, MD; CEPOI Lilișana, MD; RUDI Liudmila, MD; SECARA Elena, MD; VALUȚA Ana, MD; BARBĂ Alic, MD; MISCU Vera, MD; VLAD Pavel, MD; CHIRIAC Tatiana, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Compusul N-($\square^{8,13}$ -bicidohomofarnesenoilamino)carbazol și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la sinteza unui nou compus coordinativ cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic și la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia.

Conform invenției, se revendică compusul coordinativ N-($\square^{8,13}$ -bicidohomofarnesenoilamino)carbazol.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KNO_3 - 0,51; K_2HPO_4 - 0,45; NaHCO_3 - 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2
- 0,1; CaCl_2 - 0,11; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; MnSO_4 - 0,002; H_3BO_3 - 0,0085; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,00225; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,004; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,00009; EDTA - 0,00475; compusul N-($\square^{8,13}$ -bicidohomofarnesenoilamino)carbazol 0,060 $\square$ 0,062 și apă distilată până la 1 L, la temperatura de 23 $\square$ 25°C și iluminarea de 2000 $\square$ 3000 lx.

Rezultatul constă în majorarea activității antioxidante a biomasei de cianobacterie.

Revendicări: 2

MD 4326 B1 2015.02.28



MD 4327 B1 2015.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4327** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07D 249/14* (2006.01)
C07C 13/47 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2013 0079 (22) Data depozit: 2013.10.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.02.28, BOPI nr. 2/2015
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CUCICOVA Caleria, MD; RUDIC Valeriu, MD; ARICU Aculina, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; SECARA Elena, MD; VALUȚA Ana, MD; BARBĂ Alic, MD; MISCU Vera, MD; VLAD Pavel, MD; CHIRIAC Tatiana, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Compusul 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la sinteza unui nou compus coordinativ cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic și la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia.

Conform invenției, se revendică compusul coordinativ 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KNO_3 - 0,51; K_2HPO_4 - 0,45; NaHCO_3 - 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2
- 0,1; CaCl_2 - 0,11; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; MnSO_4 - 0,002; H_3BO_3 - 0,0085; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,00225; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,004; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,00009; EDTA - 0,00475; compusul 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol 0,062...0,064 și apă distilată până la 1 L, la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx.

Rezultatul constă în majorarea activității antioxidante a biomasei de cianobacterie.

Revendicări: 2

MD 4327 B1 2015.02.28

Act de implementare a tehnologiei de obținere a preparatului antioxidant **NostocAntiOx**.



Ficotehfarm S. R. L.

MD 2028, str. Miorița 3/5, Chișinău, R. Moldova, tel/fax. 373(22) 73 50 07
e-mail: ficotehfarm@yahoo.com, c/f 1004600074352, c/d 222470303639, BC „Banca Socială” SA
BSOCMD2X, cod TVA 0205964

Act de implementare

Nr. 04/11

din 20 noiembrie 2014

Denumirea propunerii pentru implemetare

Tehnologie de obținere a preparatului antioxidant NostocAntiOx.

Autorii elaborării

dr. biol., conf. cercet. Cepoi Liliana, dr. biol., conf. cercet. Rudi Ludmila; cerc. șt. Valuța Ana;
Laboratorul Ficobiotehnologie, Institutul de Micropobiologie și Biotehnologie al AȘM, tel. 72 53 06;

Locul și perioada desfășurării lucrărilor de implementare:

FICOTEHFARM SRL, Bloc PRODUCERE, Compartiment biotehnologic

Subiectul, conținutul și concluziile lucrărilor de implementare:

Obiectul lucrărilor de implementare:

Flux tehnologic de obținere a preparatului antioxidant **NostocAntiOx**.

Conținutul lucrărilor de implementare

Testarea tehnologiei de obținere a 2 variante de preparat NostocAntiOx în bază de materie primă ficologică, sursa – biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia*, conform etapelor și operațiunilor tehnologice: Adăugarea la biomasa de nostoc a alcoolului etilic de 70% (1:2v/v); Centrifugarea amestecului biomasă + alcool etilic de 70% la 3000 rot/min timp de 15 min; Colectarea extractului hidro-etanolic antioxidant; Standardizarea extractului hidro-etanolic antioxidant; Condiționarea extractului hidro-etanolic în flacoane; Liofilizarea extractului hidro-etanolic.

Nr. Serie: 01.09.2014exp; 02.09.2014exp; 03.09.2014exp; 01a.09.2014exp; 02b.09.2014exp; 03b.09.2014exp.; Cantitate: 500mg câte 10 flacoane cu capacitate 10ml, eboșate cu dopuri din gumă, etanșate cu căpăcele din aluminu.

Concluzii asupra rezultatelor implementării:

Preparatul antioxidant **NostocAntiOx** (Seriile: 01.09.2014exp; 02.09.2014exp; 03.09.2014exp; și 01a.09.2014exp; 02b.09.2014exp; 03b.09.2014exp.; N 10 x500mg) nu prezintă modificări majore ale componentelor tehnologice și de calitate, rezultatele încadrându-se în limitele prevăzute de specificația pentru acest preparat. Astfel, fabricarea preparatului în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Director,
dr. în șt. biol.



V. Bogdan

Diplome la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale.



DIPLOMĂ

— se acordă —

INSTITUTULUI DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL AȘM

Procedeu de stabilire a toxicității nanoparticulelor cu ajutorul microalgei roșii
Porphyridium cruentum

Autor

Rudic V., Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Chiriac T., Valuța A., Sadovnic D.

cu ocazia celei de a 16-a editii a

SALONULUI DE INVENȚII ȘI INOVAȚII

INVENTIKA

15 - 18 OCTOMBRIE 2014 | București, România

Mihnea COSTOIU

Ministru delegat



MEDALIA
DE
ARGINT

Cătălin TRIFU

Director General



DIPLOMĂ

— se acordă —

INSTITUTULUI DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL AȘM

Astaxantin^{plus} – un nou preparat din alga verde *Haematococcus pluvialis*

Autor

Rudic V., Mîscu V., Rudi L., Cepoi L., Chiriac T., Valuța A., Sadovnic D., Djur S.

cu ocazia celei de a 16-a editii a

SALONULUI DE INVENȚII ȘI INOVAȚII

INVENTIKA

15 - 18 OCTOMBRIE 2014 | București, România

Mihnea COSTOIU

Ministru delegat



MEDALIA
DE
BRONZ

Cătălin TRIFU

Director General





EURO
INVENT
EUROPEAN EXHIBITION OF
CREATIVITY AND INNOVATION
EXPOZIȚIA EUROPEANĂ A
CREATIVITĂȚII ȘI INOVĂRII

IAȘI - ROMÂNIA



DIPLOMA



NEW ANTIOXIDANT COMPLEXES FROM THE BIOMASS OF
CYANOBACTERIUM Nostoc lincxia

Rudic V., Cucicova C., Arîcu A., Cepoi L., Rudi L., Secara E.,
Valuța A., Barbă A., Mîscu V., Vlad P., Chiriac T., Codreanu S.

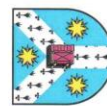
GOLD MEDAL

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU



EUROINVENT
2015



May 16, 2015

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Valuța Ana

Data

CV al autorului

Nume, prenume:

Valuța Ana

Data și locul nașterii:

22 noiembrie, s. Horodiște, r-ul Călărași, R. Moldova

Studii:

- 2000-2003 Institutul de Microbiologie al AȘM, doctorandă
specialitatea „Biotehnologie”.
- 2001-2003 Universitatea de Stat din Moldova, Institutul de Instruire
continuă, studentă
- 1995-2000 Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie
și Pedologie, studentă

Activitatea profesională:

- 2013-prezent Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, laboratorul
Ficobiotehnologie, cerc. șt.
- 2006-2013 Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, Colecția Națională de
Microorganisme Nematogene, cerc. șt.
- 2004-2006 Institutul de Microbiologie al AȘM, cerc. șt. st.

Domeniile de activitate științifică:

Ficobiotehnologie. Sinteza orientată a principiilor bioactive de către cianobacterii și microalge. Elaborarea tehnologiilor de obținere a biomasei microalgale cu conținut sporit de substanțe biologice active (pigmenți, polizaharide, lipide, ș.a.). Elaborarea tehnologiilor de obținere a preparatelor de origine microalgală cu multiple proprietăți terapeutice.

Lucrări științifice publicate 24, dintre care:

Articole: în reviste cu factor de impact – 2, în reviste recenzate - 5, dintre care 2 în monoautorat, în culegeri de articole -2, teze și rezumate la forurile științifice - 14;
Brevete de invenție: 3 .

Participări la foruri științifice internaționale:

1. V International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”, Chișinău, Moldova, November 3-5, 2014.
2. VI international young scientists conference „Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution.”, dedicated to 150 anniversary from the birth of Vladimir Lipskiy, may 13-17, 2013, Odesa, Ukraine.
3. International Interdisciplinary Scientific Conference „Biologically active substances and materials: Fundamental and Applied Problems”, May 27-June 1, 2013, Svet, AR Crimea, Ukraine.
4. Международная научно практическая конференция молодых ученых „PONTUS EUXINUS”, по проблемам водных экосистем, посвященной 50 летию образования Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины. Севастополь, Украина, 2013.
5. 2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Chisinau, Republic of Moldova, April 18-20, 2013.



6. The 6th Edition of European Exhibition of Creativity and Innovation "EUROINVENT 2014", Iasi, Romania, 22-24 mai 2014.
7. International Conference dedicated to the 55-th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova. Chişinău, Moldova, May 28-30, 2014.
8. Salonul Internațional de Invenții și Inovații INVENTIKA, București, România, 15-18 octombrie 2014.
9. Al III-lea Simpozion național cu participare internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, 24-25 octombrie 2013, Chişinău, Moldova.

Participări la proiecte științifice naționale și internaționale:

1. Stabilirea dinamicii activității antioxidante și acumulării radicalilor liberi pe durata ciclului de cultivare al spirulinei în condiții de laborator și de producere (2015-2018).
2. 14.518.02.02A Tehnologii cost eficiente de obținerea nanoparticulelor de argint cu utilizarea cianobacteriilor și microalgelor ca suport (2014-2015).
3. 11.817.08.18F Stabilirea mecanismelor de modificare a statutului oxidativ și a componenței biochimice a biomasei unor microalge sub acțiunea metalocomplexelor în scopul obținerii preparatelor antioxidante (2011-2014).
4. 11.817.04.11A Evaluarea și valorificarea potențialului microbiologic pentru elaborarea tehnologiilor agriculturii durabile (2011-2014).
5. 13.820.18.05/RoA Compusi coordinativi ai elementelor de tranziție pe baza de liganzi polidentati flexibili ca agenți biologic activi și precursori pentru materiale oxidice (2013-2014).
6. Organizarea unei infrastructuri experimentale pentru întreținerea și valorificarea colecției de microorganisme cu multiple utilități biotehnologice (2010).
7. 06.411.017A Valorificarea și conservarea resurselor microbiene prin biotehnologii competitive clasice și modern (2006-2010).
8. 08.819.04.03F Studiul procesului de metanogeneză și elaborarea tehnologiilor de sinteză a vitaminei B12 de uz furajer (2008-2009).

Premii și mențiuni:

1. **Bursa de excelență a Federației Mondiale a Savanților (FMS) (2002-2003).**
2. The 6th Edition of European Exhibition of Creativity and Innovation "EUROINVENT 2014", Iasi, Romania, 22-24 mai 2014.- Medalie de Aur.
3. Salonul Internațional de Invenții și Inovații INVENTIKA, București, România, 15-18 octombrie 2014. - Medalie de argint.
4. Salonul Internațional de Invenții și Inovații INVENTIKA, București, România, 15-18 octombrie 2014. - Medalie de bronz.

Date de contact:

Valuța Ana, cercetător științific,
 Laboratorul Ficobiotehnologie
 Institutul de Microbiologie și Biotehnologie
 al Academiei de Științe a Moldovei
 MD 2028, str. Academiei 1, bir.256
 Tel.: +373 (22) 72 57 54,
 e-mail: annavaluta@yahoo.com